

Organización del metabolismo: Localización subcelular de enzimas glicolíticas*

The Organization of Metabolism:
Subcellular Localization of Glycolytic Enzymes

TITO URETA

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653,
Santiago, Chile

The subject of cellular metabolic organization (with focus on carbohydrate metabolism) is reviewed. The existence of a "soluble" phase in the cell is considered unlikely. A note of caution regarding metabolic compartmentation as shown by isotope studies is presented. Emphasis is given to the description of experiments purporting to show the influence of protein crowding, interactions between glycolytic enzymes, and reversible association to structural proteins or to organelles. The transient nature of those associations is considered to be particularly relevant to the organization and regulation of glycolysis. The proposed role of isozymes as structural determinants of metabolic compartmentation is stressed. A few studies based on immunocytochemical observations of glycolytic enzymes are briefly described. A list of questions whose answers are badly needed is presented.

—Pero, entonces —me atreví a comentar—, aún estáis lejos de la solución...

—Estoy muy cerca, pero no sé de cuál.

—¿O sea que no tenéis una única respuesta para vuestras preguntas?

—Si la tuviera, Adso, enseñaría teología en París.

—¿En París siempre tienen la respuesta verdadera?

—Nunca, pero están muy seguros de sus errores.

—Y vos —dije con infantil impertinencia—, ¿nunca cometéis errores?

—A menudo —respondió—. Pero en lugar de concebir uno solo, imagino muchos, para no convertirme en el esclavo de ninguno.

Umberto Eco. Il nome della rosa, 1980.

INTRODUCCION

La operación del metabolismo celular requiere de una organización que debe disponer de enzimas, aporte de sustratos y cofactores y mecanismos para ajustar la velocidad de flujo. Pero, además, requiere

que las enzimas estén disponibles *en lugares y momentos específicos*. Los múltiples factores implicados en esta compleja organización recién empiezan a conocerse a pesar de (o quizás precisamente a causa de) la gran cantidad de información disponible sobre el metabolismo y los agentes catalíticos que lo hacen posible. Un buen número de páginas se imprimen cada año acerca de la regulación del metabolismo, pero algunos aspectos han sido muy poco analizados como, por ejemplo, las relaciones espaciales *in vivo* entre las enzimas.

Nuestro particular interés nos lleva a considerar las enzimas implicadas en el metabolismo hidrocarbonado. Pareciera que en este campo, y en particular en el de la glicólisis, no queda mucho por decir. En efecto, se han descrito las transformaciones químicas, se conoce la estructura terciaria y cuaternaria de casi todas las enzimas (*cf.* Phillips, Blake y Watson, 1981), la secuencia de aminoácidos de unas pocas, y

* Versión expandida de una conferencia presentada el 8 de noviembre de 1983 a la XIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Huerta Grande, Córdoba, República Argentina.

aún la secuencia de bases de algunos de los genes correspondientes. No obstante, el descubrimiento del éster fructosa-2,6-bisfosfato (Hers y Van Schaftingen, 1982) y sus relaciones con fosfofructoquinasa y fructosa-bisfosfatasa indica que en el campo del metabolismo hidrocarbonado todavía pueden producirse novedades.

En esta revisión se analizará la localización subcelular de la glicólisis considerando, en primer lugar, el concepto de fase soluble; luego, el microambiente espacio-temporal en que probablemente se desarrolla el proceso; en seguida, la idea de canalización del metabolismo por isoenzimas; finalmente se ilustrarán algunas observaciones histoquímicas de enzimas e isoenzimas de la glicólisis que permiten ofrecer una hipótesis de trabajo.

LA FASE SOLUBLE DE LA CELULA

En la literatura bioquímica es frecuente la designación "soluble" o "citosólica" para algunas enzimas y suele suponerse, sin mayor análisis, que la enzima en cuestión no se encuentra en asociación con estructuras y está por lo tanto libre en la fase acuosa de la célula. Desde su introducción por Lardy (1965), el término *citosol* ha adquirido gran popularidad (véase Clegg, 1984a). En general, se entiende por citosol aquel espacio de la célula intacta que no está ocupado por organelos. Sin embargo, la definición de Lardy (1965) dice así (mi traducción): "el término *citosol* se usará para designar aquella porción de la célula que se encuentra en la fracción sobrenadante después de centrifugar el homogeneizado a $105.000 \times g$ durante 1 hora. Se refiere específicamente al citoplasma menos mitocondrias y componentes del retículo endoplásmico". Esto es, el término *citosol* es de origen bioquímico y es puramente operacional. Por lo tanto, su utilización para indicar la localización subcelular *in vivo* de una enzima no tiene validez alguna.

Empero, aunque la expresión *citosol* no tenga correlación subcelular, el que ciertas enzimas, particularmente las glicolíticas, puedan recuperarse en la fracción así defi-

nida podría indicar que esas enzimas se encuentran en la fase acuosa de la célula. Sin embargo, la realidad de tal compartimiento está en plena revisión. Por ejemplo, los experimentos de Kempner y Miller (1968a, 1968b) en células centrifugadas, estratificadas pero viables, de *Euglena* (Fig. 1) mostraron que en el espacio amorfo "soluble" (banda V) no era posible demostrar la presencia de proteínas. Más aún, la tinción específica para 19 actividades enzimáticas fue negativa en la banda V, pero positiva en otras en las que era posible identificar organelos celulares. En las condiciones de ultracentrifugación del experimento y tomando en cuenta la longitud de la célula, una molécula de enzima "libre" con una constante de sedimentación de 3 s habría ocupado los intersticios entre los gránulos de paramylum. Por el contrario, si hubiera

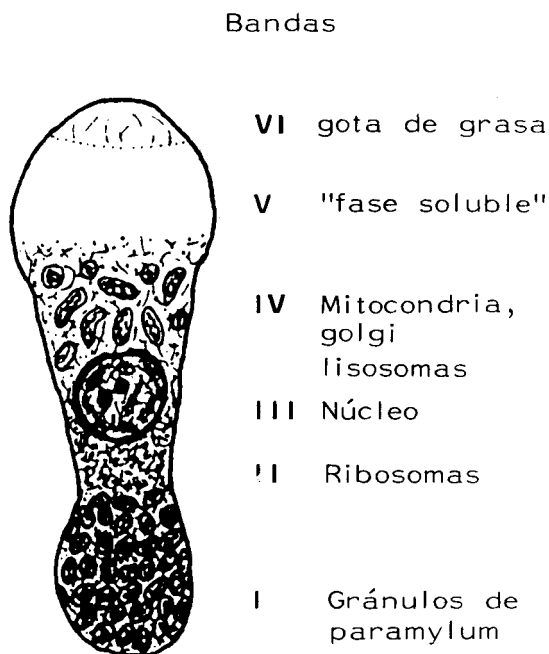


Fig. 1: Representación esquemática del experimento de Kempner y Miller (1968a, 1968b). Células de *Euglena gracilis* fueron centrifugadas a 40.000 rev/min durante 1 h, fijadas y seccionadas. Los cortes se sometieron a procedimientos de tinción específicos para una variedad de compuestos (proteínas, ácidos nucleicos, grasas, polisacáridos, etc.) incluyendo 19 actividades enzimáticas. También fueron examinados mediante técnicas citológicas convencionales y microscopía electrónica. La mayoría de las células, si se recultivaban, podían formar colonias viables. No fue posible demostrar la presencia de macromoléculas en la banda V. Adaptada de Clegg (1984a).

sido excluida de todos los intersticios debería aparecer en la banda V. Ninguna de esas situaciones ocurre, por lo cual debe inferirse la ausencia de proteínas "solubles" en el citoplasma acuoso.

En opinión de muchos autores (véase Atkinson, 1969; Sols y Marco, 1970; Clegg, 1984a) el citoplasma debe ser una estructura con una elevada concentración de proteínas, en la que las reacciones químicas deben estar gobernadas por leyes diferentes a las que rigen en el mundo del tubo de ensayo o de la cubeta del espectrofotómetro. En esta visión del citoplasma acuoso tiene especial relevancia el problema de la estructura del agua. Se han acumulado muchas observaciones que indican que el agua celular presenta una estructura diferente a la del agua en una solución salina diluida. Algunas de estas observaciones se refieren a las anomalías del punto de congelación y de los espectros de resonancia nuclear magnética del agua celular y los experimentos realizados con la técnica de la fase de referencia (para revisiones véase Ling, 1969; Clegg, 1981, 1982, 1984a). Limitaciones de espacio y ámbito de este artículo impiden describir, siquiera someramente, esas observaciones. Permiten concluir, sin embargo, que tales anomalías se deben a la influencia que tienen las superficies de alterar las propiedades físicas (calidad de solvente, por ejemplo) del agua. Esa influencia se extiende a aproximadamente 50 Å de distancia, lo que es equivalente a 17 capas monomoleculares de agua (Clegg, 1984a). En esas condiciones no es raro que una buena parte de las proteínas celulares prácticamente no difundan (Fulton 1982). En el músculo esquelético, la distancia promedio entre dos cadenas polipeptídicas es de 16,9 Å (Ling, 1969), espacio en el que caben menos de 7 capas monomoleculares de agua, lo que corresponde aproximadamente a la fase que Clegg (1981) ha denominado *agua vecinal* con alto grado de estructura.

Las investigaciones de Keith Porter y su grupo (Wolosewick y Porter, 1979; Schliwa *et al.*, 1981a; Porter y Anderson, 1982) ilustran la complejidad estructural, la cantidad de superficie y el grado extremo de empacamiento de los componentes celula-

res. Especial importancia tendrían las trabéculas proteicas, cuyo conjunto ha sido denominado "enrejado microtrabecular" o MTL (*microtrabecular lattice*), por sus conexiones con todas las ultraestructuras citoplásmicas. Según Porter y su grupo, no habría proteínas u otras macromoléculas en los espacios intertrabeculares y sería en ellos en donde se encontraría el "espacio rico en agua". Es cierto que todavía no hay acuerdo general acerca de la realidad del MTL (Heuser y Kirschner, 1980).

El problema de la estructura del citoplasma es de especial relevancia para la operación y regulación del metabolismo. Por razones de espacio no es posible entrar en mayores detalles. Sin embargo, existen adecuadas revisiones generales (Anderson y Green, 1967; Atkinson, 1969, 1977; Sols y Marco, 1970; Drost-Hansen y Clegg, 1979; Schliwa *et al.*, 1981b; Brinkley, 1981; Fulton, 1982; Clegg, 1984a).

COMPARTIMIENTOS EN EL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Por lo dicho hasta ahora, es posible suponer que muchas vías metabólicas, si no todas, ocurren en zonas discretas de la célula cinéticamente aisladas de otros procesos. Son antiguas y numerosas (pero no por ello definitivas) las sugerencias que tales compartimientos existen en el caso de la utilización de glucosa.

Muchos de los argumentos en favor de compartimientos en la glicólisis provienen de experimentos con mezclas de sustratos e intermediarios fríos o radiactivos. La radiactividad específica de hexosafosfatos al incubar un tejido con glucosa marcada sugiere, a menudo, la presencia de dos o más compartimientos no conectados entre sí (véase referencias en Ottaway y Mowbray, 1977). Después de lo expresado en la sección anterior es fácil mirar con simpatía la mayoría de esos resultados, pero debe reconocerse, asimismo, que en un número grande de casos las conclusiones se basan en demasiados supuestos y en la omisión inadvertida de otros. No es éste el lugar

para sistematizar las innumerables trampas que plagan el uso de trazadores radiactivos en el estudio de la regulación del metabolismo (véase Katz y Rognstad, 1976). Borowitz *et al.* (1977) y Blum (1978) lograron un buen ajuste de los datos de incorporación de sustratos marcados en intermediarios de la glicólisis y vía de las pentosafosfatos en *Tetrahymena* suponiendo un solo compartimiento homogéneo. Beutler y sus colaboradores (1978) pudieron demostrar un solo "pool" funcional de ATP en eritrocitos humanos.

Muchos de los resultados "anómalos", en estudios con precursores marcados, pueden deberse a varias causas, además de los compartimientos intracelulares que pudieren existir. Citaremos sólo a manera de ejemplo: *a*) la presencia de varias vías de utilización y formación de glucosa que pueden ocurrir simultáneamente; *b*) la destrucción de las células para el análisis de la radiactividad específica; *c*) la excesiva (aunque necesaria) simplificación de modelos del metabolismo glucídico que permitan simular los enmarañados flujos de metabolitos (Garfinkel y Hess, 1964; Rapoport *et al.*, 1974; Borowitz *et al.*, 1977; Larrabee, 1978, 1979; Garfinkel, 1981); *d*) la coexistencia en un mismo tejido de diversos tipos celulares con características metabólicas propias (Ross y Guder, 1982; Van Berkel, 1982) que podrían reflejarse en los resultados de experimentos con isótopos. En el caso del hígado, además de los hepatocitos, existen células sinusoidales, de Küpffer, etc., y su contribución relativa en diversas condiciones experimentales no siempre puede ser controlada (Van Berkel, 1982); *e*) la presencia, en una población, supuestamente homogénea, de células con distintos equipamientos enzimáticos y, por ende, funciones diferentes, como parece ocurrir en hepatocitos que difieren entre sí, según su posición relativa en el lobulillo hepático (Jungermann y Katz, 1982). En el caso del músculo esquelético, Lowry *et al.* (1978) han distinguido en bíceps humano cinco tipos de fibras en base a los niveles de actividad de 10 enzimas (Fig 2). Uno de estos grupos (tipo A de la Fig. 2) corresponde a las llamadas fibras blancas rápidas con niveles altos de enzimas de la glicogenólisis y

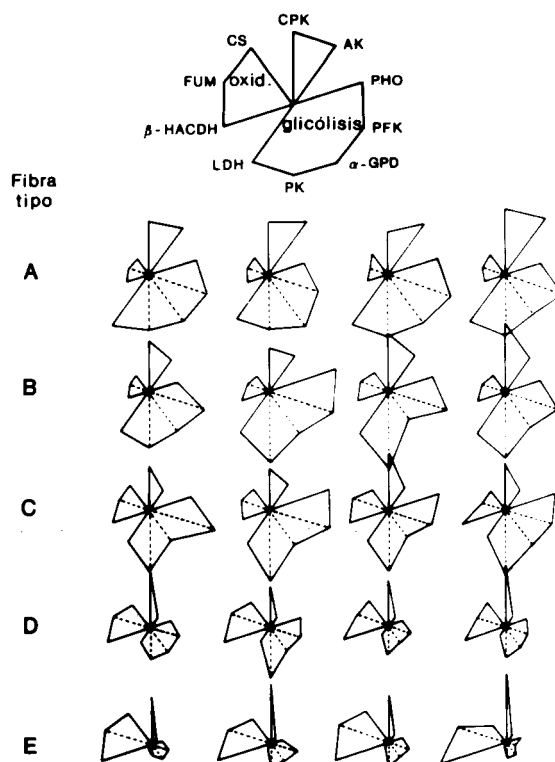


Fig. 2: Actividades relativas de 10 enzimas en 20 fibras de bíceps humano de un individuo. La actividad de cada enzima se representa por la distancia al centro. La escala para cada enzima se escogió en relación con el promedio de los valores encontrados en un total de cinco individuos. CPK, creatina-fosfoquinasa; AK, adenilato-quinasa; PHO, glicógeno-fosforilasa; PFK, fosfofructoquinasa; α -GPD, α -glicerofosfato-deshidrogenasa; PK, piruvato-quinasa; LDH, lactato-deshidrogenasa; β -HACDH, β -hidroxiacil-Co A-deshidrogenasa; FUM, fumarasa; CS, citratosintetasa. Ligeramente modificado de Lowry *et al.* (1978).

niveles bajos de enzimas oxidativas. Los grupos B y C corresponden a fibras rojas rápidas y los grupos D y E podrían corresponder a fibras rojas lentas. La heterogeneidad funcional de fibras musculares (véase, también, Spamer y Pette, 1977) presentes en el mismo músculo probablemente permite movimientos muy bien controlados en cuanto a velocidad y posición bajo cualquier circunstancia de carga. Como dicen Lowry *et al.* (1978): "producir un vibrato en una cuerda de violín puede requerir la contracción de fibras con una maquinaria metabólica diferente a las que necesita un boxeador profesional para una serie rápida de golpes".

Estas observaciones, por cierto, complican el análisis y obligan a aguzar el ingenio en la búsqueda de soluciones experimentales apropiadas. Para algunas de las dificultades es posible imaginar, por ejemplo, la aplicación de métodos no invasivos para el análisis (Chance *et al.*, 1978; Matschinsky *et al.*, 1978; Shulman *et al.*, 1979; Kohen *et al.*, 1979). Otras son más elusivas.

La presencia putativa de compartimientos se utiliza, a menudo, para explicar resultados que no se comprenden (en forma análoga al uso del término "cambio conformacional"). El debate sobre este tema puede ser muy instructivo (véase, por ejemplo, la discusión que sigue al artículo de Katz y Rognstad, 1978).

ESPACIO Y MICROAMBIENTE MACROMOLECULARES DE LAS ENZIMAS GLICOLITICAS

El concepto de estructura no homogénea del citoplasma que emerge de los estudios reseñados implica altas concentraciones locales de proteínas. Ahora bien, la actividad enzimática celular de una proteína no sólo es función de su propia concentración sino, además, de la de otras proteínas, aun cuando éstas no interactúen específicamente con la enzima en cuestión. Se ha observado que gliceraldehído-3-P deshidrogenasa existe en solución como una mezcla en equilibrio de monómeros y tetrámeros y que los monómeros poseen una actividad específica al menos 10 veces mayor que los tetrámeros. La adición de proteínas globulares (de 100 a 300 $\mu\text{g/ml}$) no relacionadas con la deshidrogenasa (*e.g.* ribonucleasa, seroalbúmina, β -lactoglobulina) promueve la formación de tetrámeros con la consiguiente disminución de la actividad específica (Minton, 1981; Minton y Wilf, 1981). Este "molecular crowding" inespecífico podría tener importancia en la regulación del flujo metabólico o para la formación de compartimientos.

Por otra parte, los parámetros cinéticos, alostéricos, etc., suelen medirse (por razones técnicas) en soluciones muy diluidas de enzimas, del orden de 10^{-7} a 10^{-10} moles/litro, en circunstancias que las concentra-

ciones *in vivo* son mucho más altas, del orden de 10^{-6} a 10^{-5} moles/kg de peso húmedo de tejido (Srere, 1967, 1970). Por lo tanto, la extrapolación de los valores obtenidos a la situación *in vivo*, debe mirarse con desconfianza (Sols y Marco, 1970). El problema ha sido abordado de dos maneras: una de ellas consiste en usar métodos apropiados para estimar parámetros relevantes a concentraciones altas de proteína. Otra consiste en realizar las mediciones en células enteras, permeabilizadas para permitir la adición de sustratos, cofactores, o ambos, o en células intactas, por microinyección directa de las sustancias apropiadas. En los pocos casos estudiados, los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ son aproximadamente los mismos tanto *in situ* como *in vitro* (Sols *et al.*, 1976; Gancedo y Bañuelos, 1976; Allende *et al.*, 1977; Matlib *et al.*, 1978; Aragón *et al.*, 1980), pero algunos efectos alostéricos no se reproducen cuali o cuantitativamente a concentraciones altas de proteína, o en preparaciones *in situ*. Por ejemplo, el clásico efecto inhibitorio de ATP sobre fosfofructoquinasa casi no se observa a concentraciones altas (7,5 $\mu\text{g/ml}$) de enzima (Hulme y Tipton, 1971; Hofer, 1971; véase, también, Reinhart y Lardy, 1980). La misma enzima, estudiada en eritrocitos tratados con agentes entrecruzantes y luego permeabilizados, mostró también propiedades alostéricas (efecto de AMP, P_i o NH_4^+) distintos a las de la enzima aislada (Aragón *et al.*, 1980). El efecto inhibitorio de ATP sobre citrato-sintetasa *in vitro* no se observa en levaduras *in situ* (Weitzman y Hewson, 1973).

Interacciones entre enzimas glicolíticas

Si bien el microambiente macromolecular parece tener importancia en el desempeño de la función catalítica *in vivo*, la asociación específica entre enzimas que catalizan reacciones sucesivas debería tener aún mayor influencia, principalmente porque reduce el tiempo de tránsito de moléculas de sustrato entre ellas. Muchos investigadores han tratado de documentar interacciones mutuas entre enzimas de la glicólisis, pero por razones de espacio se mencionarán

sólo algunos hallazgos. Desde luego, se sabe que algunas enzimas de la glicólisis tienden a copurificar aun hasta la etapa de cristalización (Czok y Bücher, 1960). Por otra parte, Pette *et al.* (1962) observaron que los niveles de un grupo de enzimas glicolíticas se encuentran en proporción constante entre sí en una gran variedad de tejidos, lo que implica una relación estequiométrica. Moses y su grupo (Mowbray y Moses, 1976; Moses, 1978) han anunciado el aislamiento, a partir de *Escherichia coli*, de un agregado de peso molecular $1,6 \times 10^6$ con actividad glicolítica. Este complejo putativo parece ser muy lábil ya que sólo una pequeña parte de la actividad glicolítica total se recupera en el agregado, y la cromatografía del complejo en columnas de exclusión resulta en pérdida de algunas de las actividades individuales. Como los propios autores señalan, se trata de una identificación tentativa.

Una de las primeras indicaciones de asociación entre enzimas que catalizan reacciones sucesivas de la glicólisis fue documentada por Kwon y Olcott (1965) para el par aldolasa-gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa. Este mismo sistema ha sido intensamente estudiado con métodos fisicoquímicos, especialmente por polarización de fluorescencia (Ovádi *et al.*, 1978; Patthy y Vas, 1978; Grazi y Trombetta, 1980) concluyéndose que ambas enzimas forman un complejo con una constante de disociación aparente de 0,1 a 0,3 μM . También se ha comunicado que glicerol-3-P deshidrogenasa puede asociarse con aldolasa (Ovádi *et al.*, 1983) y que gliceraldehído-3-P deshidrogenasa y 3-fosfoglicerato-quinasa forman un complejo (Weber y Bernhard, 1982).

Las interacciones entre enzimas glicolíticas no son unánimemente aceptadas. En un influyente artículo, de Duve (1972) ha expresado serias reservas acerca de las asociaciones mencionadas, entre otros argumentos, porque en fracciones sobrenadantes de hígado de rata varias enzimas (gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, fosfoglicerato-quinasa, aldolasa, fosfotriosa-isomerasa y lactato-deshidrogenasa) sedimentan como entidades individuales. Hess y Boiteux (1972) no pudieron encontrar evidencias de interacción entre varias enzimas de levadu-

ras (véase, también, Hübscher *et al.*, 1971; Melnick y Hultin, 1973). Las interacciones entre aldolasa y gliceraldehído-3-P deshidrogenasa comunicadas por Ovádi, Keleti y otros (*vide supra*) no pudieron ser confirmadas por Masters y Winzor (1981) usando métodos diferentes.

No obstante, conclusiones basadas en ausencia de evidencia no necesariamente implican evidencia de ausencia. Los experimentos de de Duve (1972) son criticables por haberse realizado en soluciones diluidas. Asimismo, es posible que Hess y Boiteux (1972) no hayan elegido apropiadamente los pares de (iso)enzimas para detectar interacciones. Indicaciones en ese sentido pueden encontrarse en experimentos en los que se intentó observar cambios en las propiedades de fructosa-1,6-bisfosfatasa o aldolasa al mezclar ambas proteínas puras (Pontremoli *et al.*, 1979; MacGregor *et al.*, 1980). Los resultados (Fig. 3) muestran que se forma un complejo al incubar ambas enzimas, si y sólo si se mezclan las enzimas provenientes del mismo tejido, es decir, si ambas enzimas provienen de hígado. No se produjo disminución de K_D al agregar aldolasa o fructosa-bisfosfatasa de músculo, o aldolasa de hígado tratada con subtilisina (que remueve un péptido del extremo carboxilo terminal de la proteína).

Aún así parece prudente concluir que las interacciones entre enzimas de la glicólisis no han sido todavía documentadas a satisfacción de todos y, que en cualquier caso, se trataría de uniones muy lábiles. Volveremos más adelante sobre este punto.

Asociación de enzimas glicolíticas a proteínas musculares

Varios investigadores han comunicado que algunas enzimas glicolíticas parecen unirse con facilidad a estructuras subcelulares (Green *et al.*, 1965; Cecchi *et al.*, 1971). Por ejemplo, los experimentos de Amberson *et al.* (1965) que utilizaban músculo esquelético o cardíaco prensados sin adición de líquidos, sugirieron que una fracción importante de la actividad de la mayoría de las enzimas de la glicólisis estaba

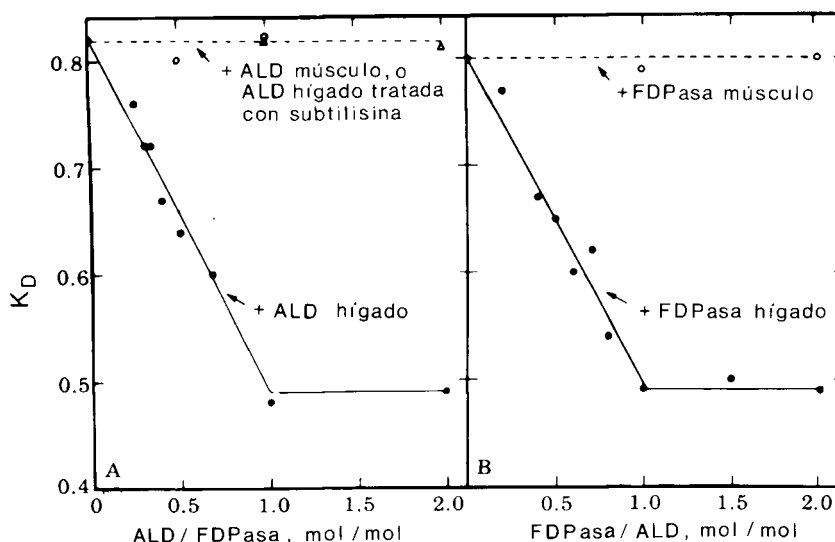


Fig. 3: Formación de un complejo aldolasa-fructosa-1,6-bisfosfatasa. Se muestran los valores de los coeficientes de distribución al equilibrio en Ultrigel para mezclas de aldolasa (ALD) y fructosa-1,6-bisfosfatasa (FDPasa). En *A*, las mezclas de reacción contenían 0,22 mg (1,5 nmol) de FDPasa pura de hígado de conejo; en *B*, 0,24 mg (1,5 nmol) de ALD de la misma fuente. Se agregaron otras proteínas en cantidad tal de obtener los cuocientes indicados. Los valores de coeficiente de distribución (K_D) se calcularon según la relación: $K_D = (V_{prot} - V_{aq}) / (V_{tot} - V_{aq})$, en que V_{prot} es el volumen de penetración (unidades agregadas / unidades por ml de solución sobrenadante), V_{aq} es el volumen de la fase excluida del gel (medido con azul dextrano) y V_{tot} es el volumen total. $K_D = 1$, corresponde a la penetración completa de la proteína en el gel; $K_D = 0$, corresponde a la exclusión completa. Δ , adición de ALD hepática digerida con subtilisina; \circ , adición de ALD de músculo de conejo. Nótese que tanto en *A* como en *B*, el valor mínimo de K_D (0,49) se obtuvo con cuocientes para ambas enzimas = 1. De McGregor *et al.* (1980), con autorización de los autores.

unida a proteínas estructurales de las miofibrillas. Arnold y Pette (1968) demostraron que fosfofructoquinasa, aldolasa y gliceraldehído-3-P deshidrogenasa se unen fuertemente a F-actina y que fosfogliceratoquinasa, piruvato-quinasa y lactato-deshidrogenasa también se unen aunque en menor grado. Investigaciones posteriores (Arnold y Pette, 1970; Arnold *et al.*, 1971) han confirmado esas asociaciones como también el hecho que glicógeno-fosforilasa, fosfoglucomutasa, fosfogliceromutasa y enolasa no se unen a F-actina. Estudios histoquímicos, ya sea por tinción de actividades enzimáticas o por medio de anticuerpos específicos, en fibras de músculo esquelético (que se ilustrarán más adelante, véase p. 25) muestran, sin duda alguna, que un número grande de enzimas glicolíticas (glicógeno-fosforilasa, fosfoglucomutasa, fosfoglicosa-isomerasa, aldolasa, fosfotriosa-isomerasa, gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa y lactato-

deshidrogenasa) se localizan en la banda I de la fibra muscular (véase el detallado estudio de Emmart *et al.* [1962] en gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa y la revisión general de Pette, 1975). Los estudios de Masters, Clarke y sus colaboradores (revisados por Clarke y Masters, 1976; Masters, 1981) han confirmado y extendido esas observaciones, al demostrar que la unión de aldolasa a F-actina aumenta notoriamente en presencia de los otros componentes de la banda I, *e.g.*, tropomiosina y troponina (Morton *et al.*, 1977; Walsh *et al.*, 1977, 1980). En estas condiciones el complejo formado es resistente a fuerzas iónicas consideradas como fisiológicas (Kuter *et al.*, 1981). La presencia de Ca^{2+} (0,1 mM) parece inducir un sitio adicional de unión (Walsh *et al.*, 1980). La unión a actina-tropomiosina parece no ser particular a aldolasa. Bronstein y Knull (1981) han observado que columnas de actina-tropo-

miosina-Sepharose son capaces de retener cinco enzimas glicolíticas, ya sea purificadas o de extractos crudos (miógeno). Las enzimas retenidas pueden ser eluidas con soluciones de alta fuerza iónica. Fosfoglucoosa-isomerasa, fosfotriosa-isomerasa, fosfoglicerato-mutasa o enolasa no se unen a la matriz, pero fosfoglicerato-mutasa lo hace si la columna se carga previamente con lactato-deshidrogenasa. Westrin y Backman (1983), mediante estudios de distribución por contracorriente, observaron unión de siete enzimas glicolíticas a actina.

Resulta casi impertinente destacar la importancia de la asociación de enzimas glicolíticas con actina ya que la ubicuidad de esta proteína indicaría que el fenómeno no está restringido a la célula muscular. En efecto, varias enzimas de la glicólisis se han encontrado unidas a fracciones particuladas de cerebro presumiblemente ricas en actina (Knull, 1978, 1980; Clarke y Morton, 1982).

Asociación de enzimas glicolíticas a membrana de eritrocitos

Otro sistema muy estudiado es el de los fantasmas de eritrocitos. En lisados a baja fuerza iónica, varias enzimas glicolíticas se encuentran asociadas con alta afinidad a la membrana. Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa se une al lado citoplásmico de la membrana y puede ser solubilizada por variaciones de fuerza iónica, pH, o concentración de algunos metabolitos relevantes (Kant y Steck, 1973; Shin y Carraway, 1973; McDaniel *et al.*, 1974; McDaniel y Kirtley, 1975). Estudios cinéticos han mostrado que hasta dos tercios de la actividad enzimática están unidos a membrana en el momento de la lisis (Kliman y Steck, 1980; véase también Keokitichai y Wrigglesworth, 1980; Solti *et al.*, 1981). El sitio de unión es el dominio amino-terminal (muy hidrofílico y expuesto hacia el lado citoplásmico) de una glicoproteína integral llamada banda 3 (Fairbanks *et al.*, 1971; Steck *et al.*, 1971; Steck, 1974; Williams *et al.*, 1979; Murthy *et al.*, 1981; Appel y Low, 1981). La misma proteína une aldolasa (Strapazon y Steck, 1976, 1977; Tsai *et al.*, 1982) y fosfofructoquinasa (Karadsheh

y Uyeda, 1977; Higashi *et al.*, 1979). Las tres enzimas mencionadas parecen competir por el mismo sitio de unión pero habría un exceso de moléculas de banda 3 (Higashi *et al.*, 1979; véase, sin embargo, Wilson *et al.*, 1982). Fosfogliceratoquinasa se une también a la membrana de eritrocitos, pero no se sabe si a la banda 3. También en este caso la unión es iónica e influida por cofactores de la glicólisis (De y Kirtley, 1977).

Las interacciones entre enzimas glicolíticas y membrana de eritrocitos parecen ser funcionalmente relevantes (véase, no obstante, Brindle *et al.*, 1982; Rich *et al.*, 1984). Desde luego, para las tres enzimas más estudiadas en este sistema se han descrito diferencias importantes en la conducta cinética de las enzimas según estén asociadas a la membrana o en solución. La Fig. 4 ilustra el caso de fosfofructoquinasa (Karadsheh y Uyeda, 1977). Una situación similar se ha descrito para la lactato-deshidrogenasa asociada a fracciones particuladas de músculo (Ehmann y Hultin, 1973). Parece prematuro intentar una interpretación funcional de los cambios en las propiedades cinéticas o regulatorias, o ambas, que se producen en las enzimas mencionadas por efecto de la unión a membranas (véase, sin embargo, la Tabla 1 de Kurganov y Loboda, 1979).

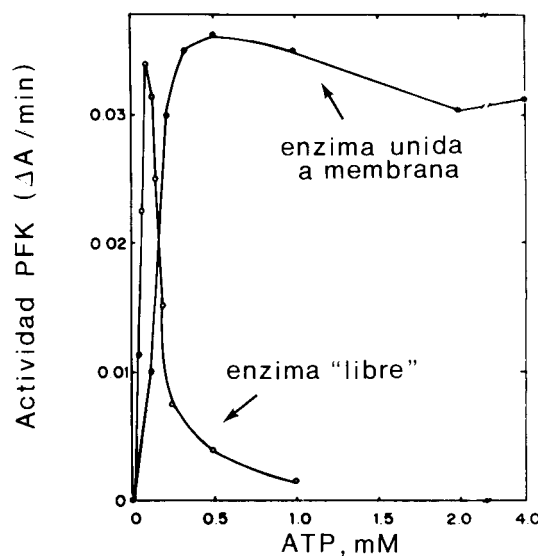


Fig. 4: Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad de fosfofructoquinasa en solución o unida a membrana de eritrocitos humanos. La concentración de fructosa-6-P era 0,2 mM. Adaptada de Karadsheh y Uyeda (1977), con permiso de los autores.

Otras interacciones

Quizás la más espectacular de las asociaciones entre enzimas glicolíticas y estructuras subcelulares es la de hexoquinasa con membrana externa de mitocondria de una gran variedad de tejidos (para revisiones, véase Wilson, 1980; Bessman y Geiger, 1980). La enzima unida puede liberarse por incubación de las mitocondrias con glucosa-6-P o ATP a concentraciones relativamente bajas. Mg^{2+} y Ca^{2+} tienen el efecto inverso. No existe una hexoquinasa especial para la mitocondria; según el tejido estudiado puede encontrarse hexoquinasa A o B, pero no C o D (Ureta *et al.*, 1983). La relevancia fisiológica de la localización mitocondrial reversible de hexoquinasa ha sido propuesta por varios investigadores (Knull *et al.*, 1974; Wilson, 1980; Bessman y Geiger, 1980). Hexoquinasa es la única enzima de la glicólisis cuya unión a mitocondria ha sido bien documentada. No obstante, otras enzimas se han descrito como mitocondriales (Agostoni *et al.*, 1966; Fahimi y Karnovsky, 1966; Skilleter y Kun, 1972). Se ha insistido en que fosfofructoquinasa tendría tal asociación (Poon y Wood, 1968; Eldan y Blum, 1973; Craven y Basford, 1974)¹.

Wilson (1980) ha acuñado el adjetivo "ambigua" para referirse a enzimas cuya distribución entre formas solubles y particuladas (unidas a membrana) puede variar según el estado metabólico de la célula, el que se reflejaría en los niveles de ciertos metabolitos capaces de influir en esa distribución. Hexoquinasa sería la enzima prototipo de tal ambigüedad, pero es posible que otras enzimas posean la propiedad. Más aún, quizás la variabilidad en las observaciones relacionadas con interacciones mutuas o a estructuras sea la consecuencia de factores no controlados del estado metabólico de las células con las que se trabaja.

Mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas se ha estimado que sobre el 60% de la actividad aldolasa se encuentra asociada al retículo endoplásmico de hígado de rata. Fructosa-1,6-bisfosfato 0,05 mM era capaz de solubilizar la enzima unida (Foemel *et al.*, 1975).

No debiera dejar de mencionarse la asociación doble, "citosol"-mitocondria, de fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa en algunas especies (Ballard y Hanson, 1969), pero en este caso la isoenzima mitocondrial no es ambigua. Una enzima relacionada, piruvato-carboxilasa, es exclusivamente mitocondrial (Böttger *et al.*, 1969; Ballard *et al.*, 1970). También es interesante mencionar la asociación a microsomas de glucosa-6-fosfatasa (Hers *et al.*, 1951; Arion *et al.*, 1975) de una isoenzima de glucosa-6-P-deshidrogenasa (Beitner y Naor, 1972; Cho-Chung y Berghoffer, 1974; Kimura *et al.*, 1979; Oka *et al.*, 1981), y de una isoenzima de 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (Beitner y Naor, 1972; Bublitz, 1981).

Existe abundante literatura acerca de la existencia de un aparato glicolítico en el núcleo de muchas células (para referencias, véase Georgiev, 1967; Ottaway y Mowbray, 1977). Asimismo, casi todas las enzimas de la glicólisis, gluconeogénesis y ciclo de las pentosa-fosfatos tienen en plantas una doble localización: "citosol" y cloroplastos (Gottlieb, 1982; Dennis y Miernyk, 1982; Schnarrenberger *et al.*, 1983).

Las observaciones presentadas en esta sección pueden resumirse de la manera indicada en la Fig. 5. Uno de los esquemas muestra la versión clásica de la célula considerada como una sopa diluida que contiene enzimas, espacio en el que las reacciones ocurrirían al azar según la probabilidad de colisiones efectivas entre sustratos y enzimas. Otro esquema muestra el concepto de complejo multienzimático soluble en el que los intermediarios no salen del agregado mientras no se haya realizado completamente la reacción global catalizada por el complejo. Finalmente, se muestran esquemas de complejos multienzimáticos asociados a proteínas estructurales (*e.g.*, actina-tropomiosina-troponina) o a proteínas integrales de membrana (*e.g.*, banda 3).

¹ Recientemente se ha comunicado que fosfofructoquinasa de *Saccharomyces* puede encontrarse como enzima "soluble" y particulada (Nadkarni *et al.*, 1982; Huse y Kopperschlager, 1983), pero la naturaleza de la asociación no ha sido aún definida. La enzima se ha encontrado unida a microsomas de músculo estriado de anfibio (Margreth *et al.*, 1967).

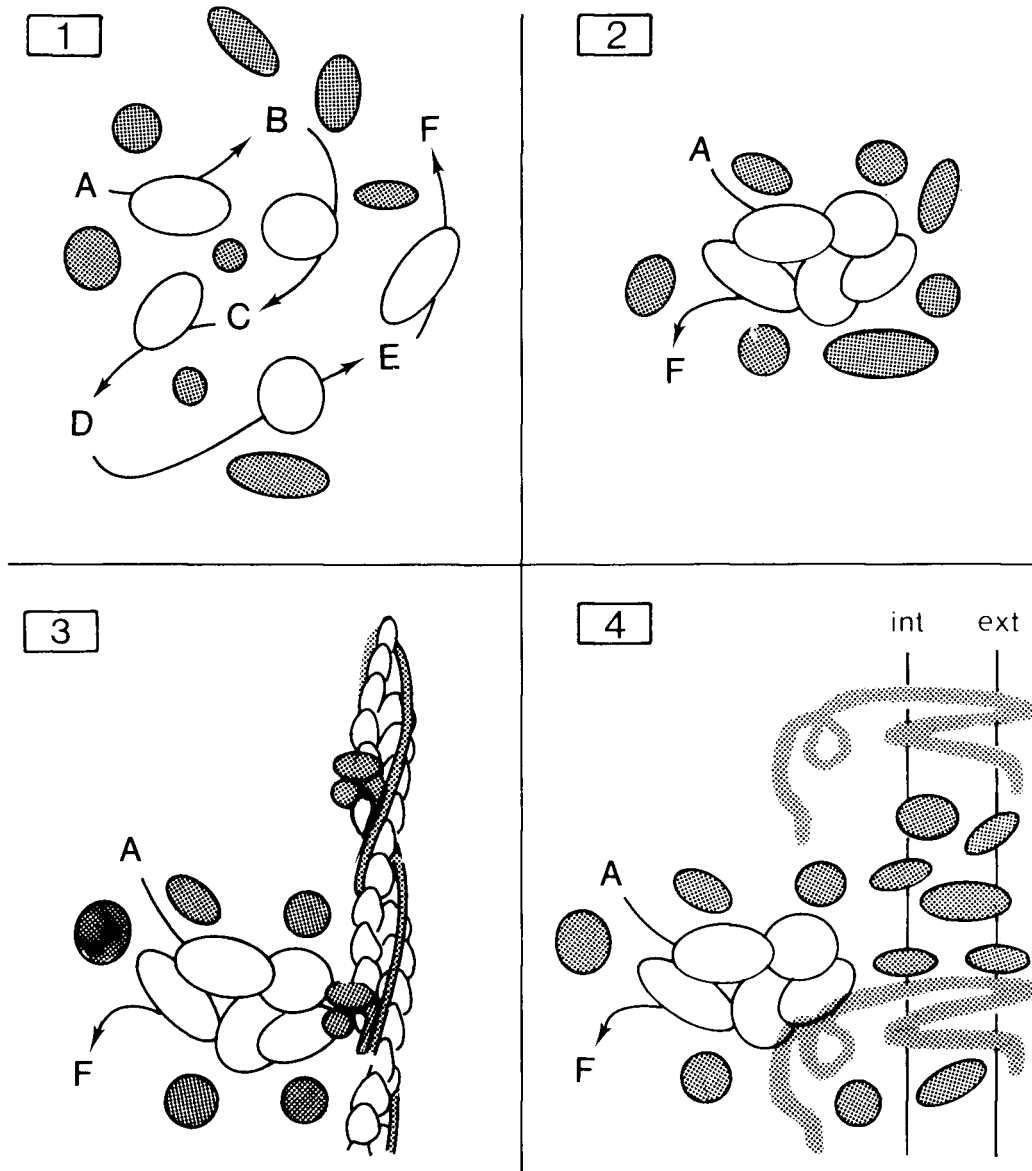


Fig. 5: Modelos de vías metabólicas. Se muestran cuatro esquemas para una vía metabólica hipotética de cinco reacciones sucesivas: 1) Modelo "soluble"; 2) Complejo multienzimático "libre"; 3) Complejo multienzimático asociado a proteínas fibrilares del tipo actina-tropomiosina-troponina; 4) Complejo multienzimático asociado a proteínas integrales de membrana del tipo banda 3. Los óvalos vacíos corresponden a las enzimas de la vía. Los símbolos sombreados corresponden a proteínas que pueden o no competir con las enzimas de la vía, o que pueden o no interactuar con ellas.

Complejos glicolíticos transitorios

Las consideraciones expuestas en las secciones precedentes sugieren que las enzimas glicolíticas no se encuentran libres en solución. Una posibilidad es, por cierto, que formen complejos multienzimáticos que catalizarían el conjunto (o parte) de la vía metabólica como en el caso, hasta ahora

único, del glicosoma de tripanosómidos (Opperdoes, 1982). Es conocida la presencia de complejos en varios procesos (para revisiones, véase Reed y Cox, 1966; Ginsburg y Stadtman, 1970; Srere y Mosbach, 1974; Lynen, 1980; Wombacher, 1983). La generalización de que *todas* las vías metabólicas son catalizadas por complejos multienzimáticos no ha sido siquiera inves-

tigada pero se apoya, además de los argumentos generales ya expuestos, en la demostración de que varios procesos son catalizados por agregados macromoleculares que, al revés de lo que ocurre en los complejos clásicos, son fácilmente disociables en sus componentes activos (Reed y Cox, 1966; Ginsburg y Stadtman, 1970; Kempner, 1975). En algunos casos se requiere la adición de efectores para mantener la integridad de los complejos (Kent *et al.*, 1975).

Como hemos visto, la glicólisis parece no estar organizada como un complejo multienzimático clásico. Sin embargo, la asociación lábil de la mayoría de las enzimas a proteínas de membrana (banda 3) o a proteínas del citoesqueleto (actina-tropomiosina-troponina) invita a pensar en complejos *sui generis* en los que las proteínas participantes no se unen entre sí, sino alrededor de proteínas nucleadoras o en sitios estructurales específicos lográndose, de esta manera, las relaciones de vecindad y microambiente necesarios para lograr la alta eficiencia del proceso y la presencia de compartimientos. La reversibilidad de las asociaciones (mediada por efectores específicos) sugiere, también, que esta organización es temporal, además de espacial, y que su formación podría ser inducida sólo cuando se la necesita. Indicaciones de esta transitoriedad se han observado en el caso de las enzimas del metabolismo de glicógeno (que se asocian fuertemente al polisacárido) cuya "solubilización" ocurre en el músculo por contracción tetánica (Di Mauro *et al.*, 1971) y en el hígado por ayuno (Tata, 1964). La imagen de la carretera urbana, propuesta por Moses (1978), para el complejo glicolítico de *Escherichia coli* podría, entonces, modificarse de acuerdo al poeta: "*Caminante, no hay camino, se hace camino al andar*".

ROL DE LAS ISOENZIMAS EN LA ORGANIZACION DEL METABOLISMO

La presencia de isoenzimas, en prácticamente todas las etapas del metabolismo intermediario, agrega otra complejidad al problema de la localización de las vías me-

tabólicas. En efecto, la multiplicidad de formas para una reacción dada implica, necesariamente, la idea de compartimientos (Ureta, 1978). Desde luego, los componentes de muchos sistemas isoenzimáticos están localizados en compartimientos celulares diferentes (véase Tabla IV en Ureta, 1978; Holmes y Masters, 1979). En vegetales, el número de isoenzimas de un sistema casi siempre refleja el número de compartimientos subcelulares en que la reacción enzimática es requerida (Gottlieb, 1982; Dennis y Miernyk, 1982).

La idea de compartimientos celulares producidos por isoenzimas puede expresarse bajo la forma de la siguiente definición de vía metabólica (Ureta, 1978):

Las vías metabólicas son reacciones secuenciales, unidireccionales, catalizadas por isoenzimas específicas asociadas en complejos poli-isoenzimáticos.

De acuerdo con la definición, el metabolismo hidrocarbonado debería ser considerado como el conjunto de varias vías metabólicas con muy pocos (o ninguno) puntos de contacto entre sí, como se esquematiza en la Fig. 6. Como se discutió antes, tales complejos no estarían formados por las enzimas mismas unidas laxamente entre sí, sino más bien por uniones lábiles de ellas con alguna proteína estructural (¿actina?, ¿banda 3?). La tarea de identificar vías paralelas casi idénticas parece formidable, pero no imposible (Shaw y Stadie, 1959; Coe y Strunk, 1970).

El modelo predice que cada isoenzima cataliza su reacción en una y sólo una vía metabólica. Esta predicción aún no ha sido estudiada experimentalmente, pero algunos ejemplos parecen indicar su verosimilitud: carbamilfosfato-sintetasas de *Neurospora* (Davis, 1967, 1972; Davis *et al.*, 1978), aspartoquinasas de *Escherichia coli* (Stadtman *et al.*, 1961; Stadtman, 1968), esfingomielininas de humano (Callahan *et al.*, 1974), fosfoglucomutasas de *Bacillus subtilis* (Maino y Young, 1974), glucosa-6-P deshidrogenasas de *Pseudomonas fluorescens* (Lessmann *et al.*, 1975), malato-deshidrogenasas de *Euglena* (Wolpert y Ernst-Fonberg, 1975).

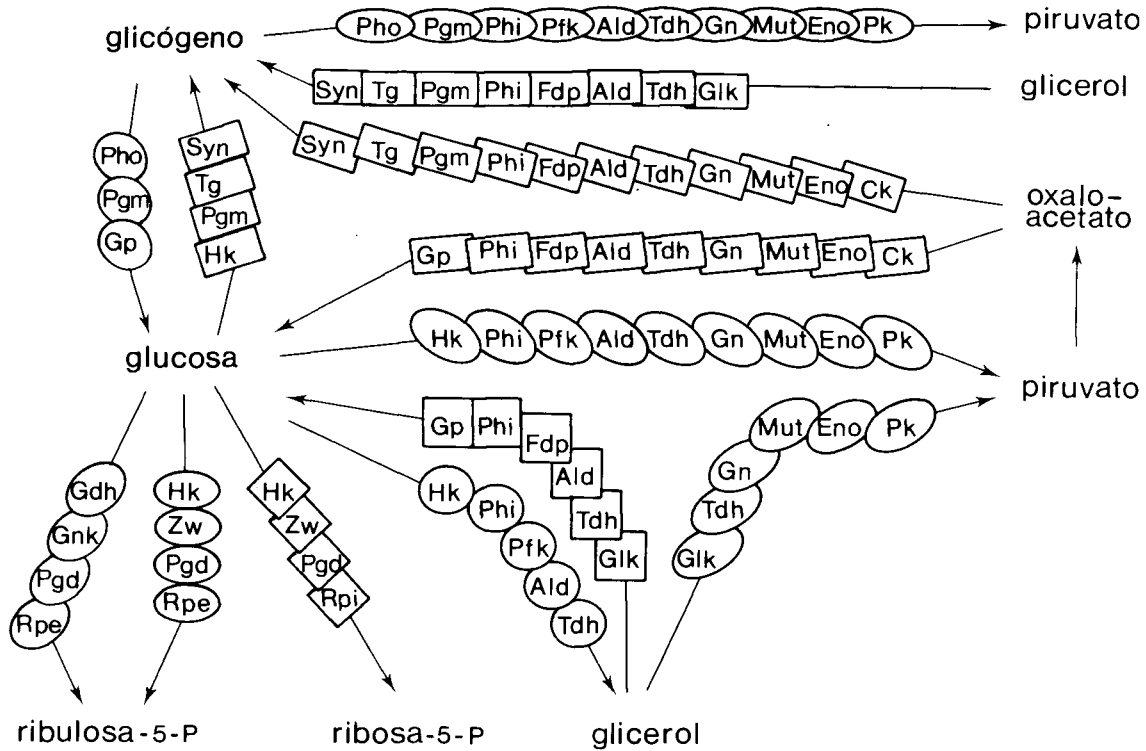


Fig. 6: Complejos poli-isoenzimáticos hipotéticos en el metabolismo de los hidratos de carbono. Las vías principales están dispuestas como reacciones unidireccionales. Ovalos y rectángulos con los nombres abreviados de las enzimas indican, respectivamente, reacciones catabólicas o biosintéticas. Nótese que una enzima dada está representada por símbolos de diversa forma, según el complejo en que aparece, para indicar que se trata de isoenzimas distintas: *Hk*, hexoquinasa; *Gp*, glucosa-6-fosfatasa; *Pgm*, fosfoglucomutasa; *Tg*, UDP-glucosa-pirofosforilasa; *Syn*, glicógeno-sintetasa; *Pho*, glicógeno-pirofosforilasa; *Zw*, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa; *Pgd*, 6-fosfogluconato-deshidrogenasa; *Rpe*, ribulosa-5-fosfato-epimerasa; *Rpi*, ribosa-5-fosfato-isomerasa; *Gdh*, glucosa-deshidrogenasa; *Gnk*, gluconato-quinasa; *Phi*, glucosa-6-fosfato-isomerasa; *Pfk*, fosfofructoquinasa; *Ald*, fructosa-fosfato-aldolasa; *Tdh*, triosas(P)-deshidrogenasa; *Gn*, fosfoglicerato-quinasa; *Mut*, fosfoglicerato-mutasa; *Eno*, enolasa; *Pk*, piruvato-quinasa; *Fdp*, fructosa-1,6-bisfosfatasa; *Glk*, glicerol-quinasa; *Ck*, fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa. Se indican algunos sustratos y productos. No se pretende en este esquema simbolizar la presencia de "pools" de sustratos o productos; por ejemplo, las vías que producen glucosa podrían mantener tres compartimentos separados de glucosa; la indicación de sólo uno se debe a razones de diseño del esquema.

La eventual presencia de complejos poli-isoenzimáticos es relevante para el problema de las interacciones mutuas entre enzimas de la glicólisis. Aunque el modelo no especifica el cómo se asocian las enzimas entre sí predice, no obstante, que las interacciones sólo son posibles entre aquellas isoenzimas vecinas que forman parte de un mismo complejo. Por ello resultan interesantes las observaciones de Pontremoli *et al.* (1979) y de MacGregor *et al.* (1980) que muestran interacciones entre fructosa-1,6-bisfosfatasa y aldolasa sólo cuando provienen del mismo tejido (Fig. 3). Es posible, como se mencionó antes, que resultados negativos en la búsqueda de aso-

ciaciones enzima-enzima se deban a esta causa.

Los complejos poli-isoenzimáticos no han sido demostrados (véase, sin embargo, Blomberg y Raftell, 1974; Raftell y Blomberg, 1974), pero la idea de canalización del metabolismo por isoenzimas parece ser un modelo internamente concordante (véase, también Davis, 1967; Datta, 1969; Jensen y Byng, 1981). La posible existencia de tales complejos proporciona un marco teórico apropiado para la interpretación de muchos resultados de la literatura (véase, por ejemplo, Lynch y Paul, 1983; Clegg, 1984b) y para el diseño de experimentos futuros (Ureta, 1978).

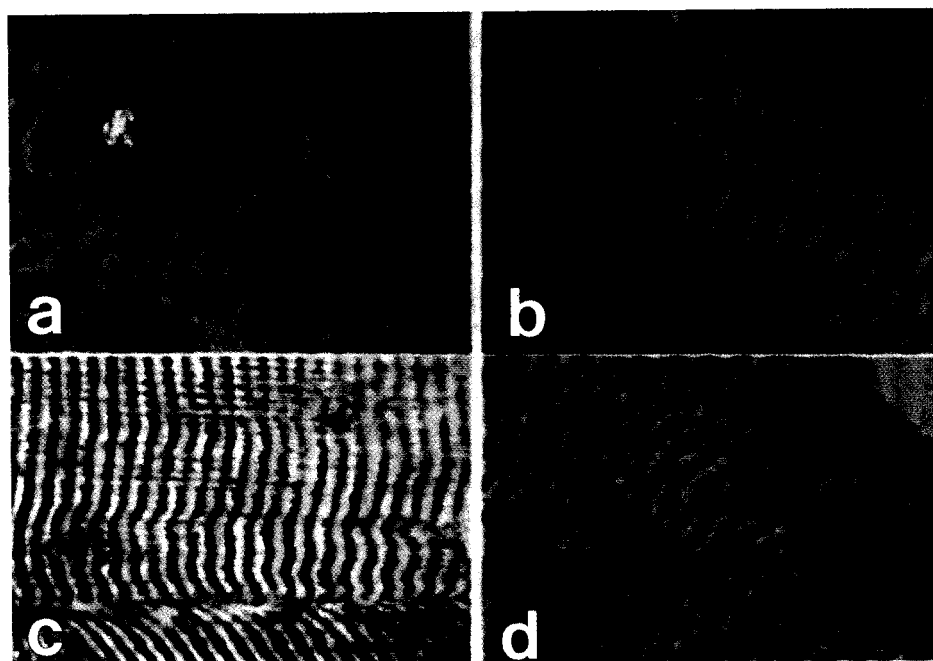
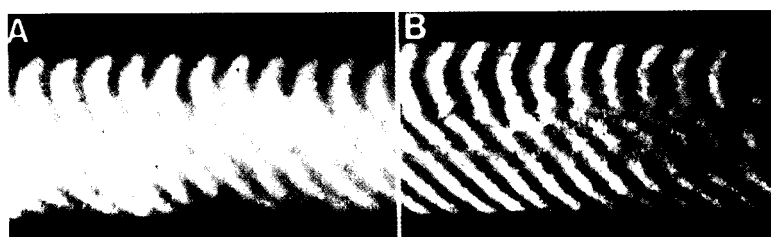


Fig. 7: Localización de actividades enzimáticas en secciones longitudinales de músculos psoas de conejo:
 a) Tinción de triosa-fosfato deshidrogenasa; b) la misma sección fotografiada con luz polarizada;
 c) Tinción de lactato-deshidrogenasa; d) Tinción de aldolasa. Tomada de Pette (1975), con autorización del autor.



*Fig. 8: Localización por inmunofluorescencia de fosfofructoquinasa en una sección longitudinal de músculo psoas. Aumento 1250x. A) Inmunofluorescencia; B) La misma sección vista con luz polarizada. Tomada de Dölken *et al.* (1975), con autorización de los autores.*

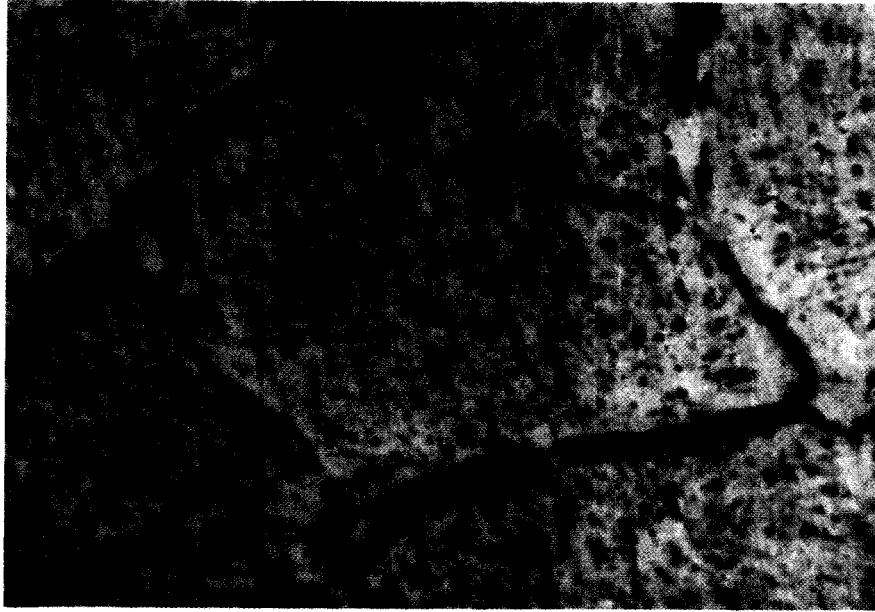


Fig. 9: Localización de actividad hexoquinasa. Sección transversal de músculo semitendinoso de conejo. Tomada de Pette (1975), con autorización del autor.

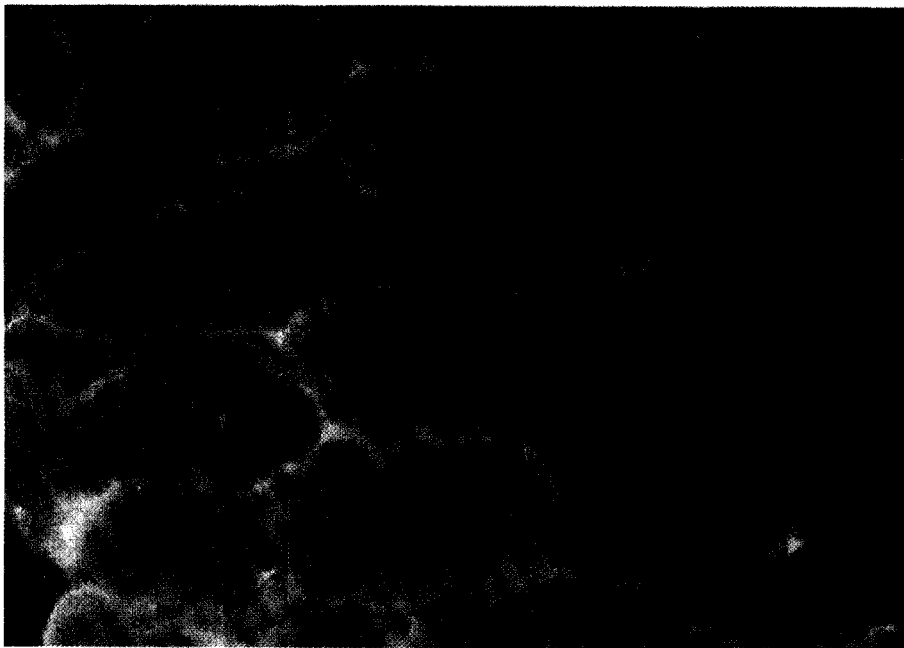
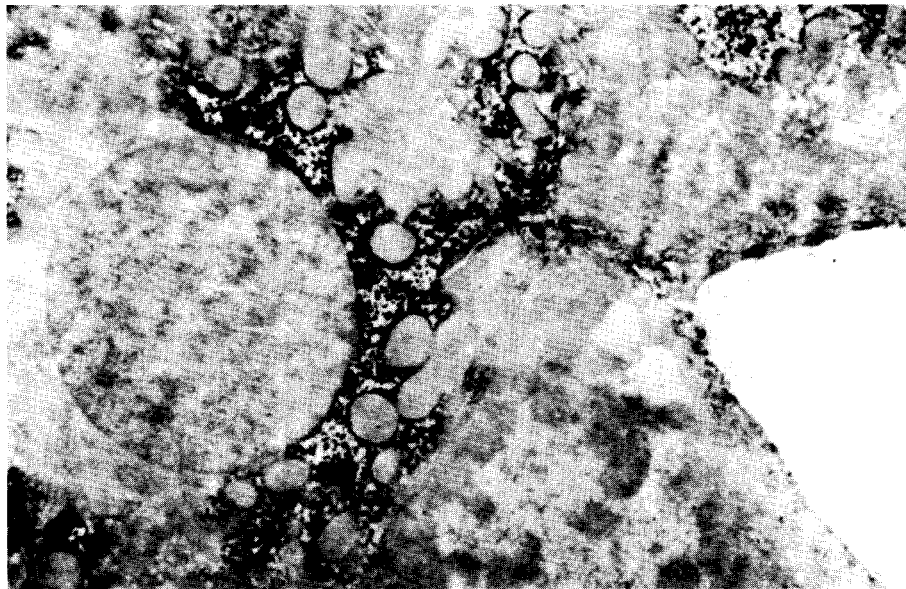


Fig. 10: Localización de hexoquinasa A por inmunofluorescencia. Sección transversal de psoas de rata. Tomada de Guixé (1978), con permiso de la autora.



*Fig. 11: Localización subcelular de lactato-deshidrogenasa en hígado de rata. Se utilizaron anti-sueros específicos anti-LDH-M₄ o anti-LDH-H₄. Los depósitos oscuros corresponden a la reacción peroxidasa unida a anti-IgG. Superior: Suero anti-LDH-M₄. Aumento 9600 x. Inferior: Suero anti-LDH-H₄. Aumento 7800 x. Tomada de Yamashita *et al.* (1979), con autorización de los autores.*

LOCALIZACION SUBCELULAR DE
ENZIMAS GLICOLITICAS

La localización subcelular de enzimas se aborda generalmente mediante estudios de centrifugación diferencial en medios que aseguren, hasta donde sea posible, la integridad de los diferentes organelos (de Duve *et al.*, 1955). Muchos estudios han mostrado que en esas condiciones las enzimas glicolíticas son "solubles". Debiera quedar claro, por el contexto general y las consideraciones ya expuestas en este trabajo, que tales estudios tienen un interés limitado. Como ha dicho McConkey (1982), el encontrar que una enzima es "soluble" no debiera hacernos olvidar la violencia cataclísmica aún del más suave procedimiento de homogeneización. En la misma línea de pensamiento, Clegg (1984a) ha expresado que no pasa de ser una declaración de buenas intenciones el pretender que los líquidos usados en la homogeneización "remedan" las condiciones intracelulares: tales condiciones nos son desconocidas.

Es posible estudiar la localización subcelular de enzimas mediante procedimientos menos destructivos. En efecto, las técnicas citoquímicas (Shnitka y Seligman, 1971), particularmente las que hacen uso de anticuerpos específicos (Wachsmuth, 1976; Farr y Nakane, 1981), permiten conocer el lugar en que se encuentran las enzimas en estudio. Tales técnicas no dejan de tener *caveats* importantes (Petrusz, 1983; Childs, 1983), pero aparecen por el momento como mejor alternativa de cualquier procedimiento que implique previa homogeneización celular.

La asociación de enzimas de la glicólisis con algunas proteínas estructurales del músculo (*e.g.* actina), resumida en una sección anterior, corresponde a la localización en las bandas isotrópicas, como puede demostrarse mediante estudios histoquímicos (Emmart *et al.*, 1962; Fahimi y Karnovsky, 1966; Sigel y Pette, 1969; Brosemer, 1972; Dölken *et al.*, 1975; Pette, 1975). La Fig. 7 muestra la tinción de actividad enzimática de gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (Fig. 7a y 7b), de lactato-deshidrogenasa (Fig. 7c) y de aldolasa (Fig. 7d)

en músculo psoas de conejo (Pette, 1975). Las actividades se localizan exclusivamente en las bandas isotrópicas, en las que actina es el principal componente proteico. La misma localización se observa para fosfoglucomutasa, fosfoglucosa-isomerasa y fosfofructoquinasa (Sigel y Pette, 1969). Resultados similares se encontraron en estudios inmunohistoquímicos usando antisueros específicos para glicógeno-fosforilasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, enolasa y lactato-deshidrogenasa de conejo (Dölken *et al.*, 1975) o en músculo de insectos, para el caso de glicerol-3-P-deshidrogenasa y fosfotriosa-deshidrogenasa (Emmart *et al.*, 1962; Brosemer, 1972). La Fig. 8, tomada de Dölken *et al.* (1975), ilustra el resultado obtenido con suero inmune antifosfofructoquinasa en secciones longitudinales de músculo estriado de conejo.

Parece claro que la gran mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono se encuentran localizadas en una zona discreta de la célula muscular. Hace excepción la hexoquinasa. En efecto, la tinción de actividad fosforilante de glucosa en cortes de músculo (Fig. 9) muestra que la actividad enzimática se encuentra mayormente asociada con el sarcolema (Pette, 1975). En nuestro laboratorio, Guixé (1978), utilizando la técnica de inmunofluorescencia, encontró que hexoquinasa A de músculo está localizada preferentemente en la zona periférica de la fibra, probablemente asociada con el sarcolema (Fig. 10).

En el caso de tejidos no musculares, la localización subcelular de enzimas glicolíticas no es clara. Por una parte, la localización de proteínas estructurales del citoesqueleto no es definida. Por otra parte, la coexistencia de varias isoenzimas no permite la interpretación de estudios basados en tinción de actividad enzimática. Se hace, entonces, necesario recurrir al uso de técnicas inmunocitoquímicas. No nos es posible aquí resumir la gran cantidad de información existente sobre localización de enzimas glicolíticas en tejidos específicos. Sin embargo, resultan interesantes algunos estudios en que se usaron antisueros específicos para algunos componentes

de sistemas isoenzimáticos. Por ejemplo, en un estudio de Hatzfeld *et al.* (1978), para el sistema aldolasa en hepatoma LF utilizando sueros inmune antialdolasa A, B o C se observó reacción difusa en el citoplasma con cualquiera de los antisueros. En el hígado normal, en cambio, no se observó reacción en cortes tratados con suero antialdolasa B. Los autores no distinguieron localización subcelular preferencial de algunas de las isoenzimas. En cambio, Foemmel *et al.* (1975), con una técnica similar, lograron mostrar que en hígado de rata la enzima está asociada con membranas del retículo endoplásmico. La demostración definitiva, sin embargo, requiere de controles más rigurosos que los usados por Foemmel *et al.* (1975).

La presencia de dos piruvato-quinasas (L y M) en hepatocitos de rata ha sido demostrada mediante inmunofluorescencia (Gali *et al.*, 1983) pero no se estudió con detalle su localización intracelular.

En el caso de las lactato-deshidrogenasas se ha estudiado, por microscopía electrónica, la localización diferencial de dos isoenzimas (LDH-M₄ y LDH-H₄) mediante el uso de anticuerpos específicos (Yamashita *et al.*, 1979). LDH-M₄ se encontró preponderantemente asociada a zonas ricas en glucógeno, en tanto que LDH-H₄ se reconoció en el citoplasma amorfo cercano a la membrana celular (Fig. 11). Pareciera que, en este caso, las isoenzimas se localizan en sitios diferentes del citoplasma, pero no es posible definir con precisión tales sitios.

CONSIDERACIONES FINALES

Cualquier teoría sobre la regulación del metabolismo debería considerar, en forma explícita, el problema del microambiente celular en que se realizan las reacciones enzimáticas. Por lo expuesto en las secciones precedentes debiera quedar claro que el autor considera que la inmensa mayoría de los estudios realizados en preparaciones celulares rotas, si bien interesantes *per se*, realmente no aportan información relevante acerca de la regulación y organización del metabolismo *in vivo*. No se pretende que esta declaración sea original; mentes

muchísimo más agudas ya lo han expresado anteriormente en forma inequívoca. No obstante, parece necesario repetirla y resumir periódicamente los avances en este campo. Es ello quizás la única justificación de esta revisión.

Pueden esperarse avances importantes en el tema en un futuro cercano. Una lista, necesariamente incompleta, debiera incluir: a) una mayor precisión acerca del porcentaje de agua celular libre y su participación, si alguna, en los procesos metabólicos; b) el análisis, mediante técnicas no-invasivas, del número de compartimientos metabólicos; c) la búsqueda de condiciones que permitan el aislamiento de complejos multienzimáticos —relacionados con el metabolismo hidrocarbonado— en asociación intrínseca o en relación con proteínas estructurales; d) conocimiento del rol metabólico que tienen las isoenzimas, especialmente en relación con la presencia de compartimientos; e) conocer la localización subcelular fina de (iso)enzimas en tejidos no musculares. Los estudios disponibles actualmente no poseen la resolución necesaria.

AGRADECIMIENTOS

Muchas de las ideas aquí expuestas han resultado aclaradas, filtradas y enriquecidas después de interminables charlas con Jasna Radojković, Anita Preller, Vicki Guixé, Jorge Babul, Rosalba Lagos, Octavio Monasterio y Hermann Niemeyer. Agradezco particularmente al Dr. J.E. Clegg su gentileza de enviarme varios de sus trabajos en etapa de prepublicación. Los experimentos del laboratorio del autor han sido financiados por el Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile (Proyecto B-1989), por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 1138) y por subvenciones de la Organización de los Estados Americanos. La asistencia a la XIX Reunión Anual de S.A.I.B. fue posible por una ayuda de viaje otorgada por el proyecto CHI 81/001 (PNUD-UNESCO).

REFERENCIAS

- AGOSTONI, A.; VERGANI, C. y VILLA, L. (1966) Intracellular distribution of the different forms of lactic dehydrogenase. *Nature* 209: 1024-1025.
 ALLENDE, C.C.; BRAVO, R. y ALLENDE, J.E. (1977) Comparison of *in vivo* and *in vitro* properties of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase of amphibian oocytes. *J. Biol. Chem.* 252: 4662-4666.
 AMBERSON, W.R.; ROISEN, F.J. y BAUER, A.C. (1965) The attachment of glycolytic enzymes to muscle structure. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66: 71-90.

- ANDERSON, N.G. y GREEN, J.G. (1967) The soluble phase of the cell. En *Enzyme Cytology* (Roodyn, D.B., ed.), pp. 475-509. Academic Press, London.
- APPELL, K.C. y LOW, P.S. (1981) Partial structural characterization of the cytoplasmic domain of the erythrocyte membrane protein, band 3. *J. Biol. Chem.* 256: 11104-11111.
- ARAGON, J.J.; FELIU, J.E.; FRENKEL, R.A. y SOLS, A. (1980) Permeabilization of animal cells for kinetic studies of intracellular enzymes: *In situ* behavior of the glycolytic enzymes of erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 77: 6324-6328.
- ARION, W.J.; WALLIN, B.K.; LANGE, A.J. y BALLAS, L.M. (1975) On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol. Cell. Biochem.* 6: 75-83.
- ARNOLD, H. y PETTE, D. (1968) Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur. J. Biochem.* 6: 163-171.
- ARNOLD, H. y PETTE, D. (1970) Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase. *Eur. J. Biochem.* 15: 360-366.
- ARNOLD, H.; HENNING, R. y 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.
- ATKINSON, D.E. (1969) Limitation of metabolite concentrations and the conservation of solvent capacity in the living cell. *Current Top. Cell. Reg.* 1: 29-42.
- ATKINSON, D.E. (1977) *Cellular Energy Metabolism and its Regulation*. Academic Press, New York.
- BALLARD, F.J. y HANSON, R.W. (1969) Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the cytosol fraction of rat liver and the immunochemical demonstration of differences between this enzyme and the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 244: 5625-5630.
- BALLARD, F.J.; HANSON, R.W. y RESHEF, L. (1970) Immunochemical studies with soluble and mitochondrial pyruvate carboxylase activities from rat tissues. *Biochem. J.* 119: 735-742.
- BEITNER, R. y NAOR, Z. (1972) Intracellular distribution of isoenzymes of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in rat adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 268: 761-765.
- BESSMAN, S.P. y GEIGER, P.J. (1980) Compartmentation of hexokinase and creatine phosphokinase, cellular regulation, and insulin action. *Current Top. Cell. Reg.* 16: 55-86.
- BEUTLER, E.; GUINTO, E.; KUHL, W. y MATSUMOTO, F. (1978) Existence of only a single functional pool of adenosine-triphosphate in human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 75: 2825-2828.
- BLOMBERG, F. y RAFTELL, M. (1974) Enzyme polymorphism in rat liver microsomes and plasma membranes. I. An immunochemical study of multienzyme complexes and other enzyme-active antigens. *Eur. J. Biochem.* 49: 21-29.
- BLUM, J.J. (1978) Influence of metabolic compartmentation on the quantitative analysis of intermediary metabolism. En *Microenvironments and Metabolic Compartmentation* (Srere, P.A. y Estabrook, R.W., eds.), pp. 65-82. Academic Press, New York.
- BOROWITZ, M.J.; STEIN, R.B. y BLUM, J.J. (1977) Quantitative analysis of the change of metabolite fluxes along the pentose phosphate and glycolytic pathways in *Tetrahymena* in response to carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 252: 1589-1605.
- BOTTGER, I.; WIELAND, O.; BRDICZKA, D. y PETTE, D. (1969) Intracellular localization of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 8: 113-119.
- BRINDLE, K.M.; CAMPBELL, I.D. y SIMPSON, R.J. (1982) A ^1H n.m.r. study of the kinetic properties expressed by glyceraldehyde phosphate dehydrogenase in the intact human erythrocyte. *Biochem. J.* 208: 583-592.
- BRINKLEY, B.R. (1981) Summary: organization of the cytoplasm. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46: 1029-1040.
- BRONSTEIN, W.W. y KNULL, H.R. (1981) Interaction of muscle glycolytic enzymes with thin filament proteins. *Can. J. Biochem.* 59: 494-499.
- BROSEMER, R.W. (1972) Immunofluorescent localization of two dehydrogenases in honeybee flight muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 20: 266-271.
- BUBLITZ, C. (1981) Physical separation of cytoplasmic and microsomal 6-phosphogluconate dehydrogenases from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98: 588-594.
- CALLAHAN, J.W.; KHALIL, M. y GERRIE, J. (1974) Isoenzymes of sphingomyelinase and the genetic defect in Niemann-Pick disease, type C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 384-390.
- CECCHI, X.; CANESSA-FISCHER, M.; MATURANA, A. y FISCHER, S. (1971) The molecular organization of nerve membranes. II. Glycolytic enzymes and ATP synthesis by plasma membranes of squid retinal axons. *Arch. Biochem. Biophys.* 145: 240-247.
- CHANCE, B.; BARLOW, C.; HASELGRÖVE, J.; NAKASE, Y.; QUISTORFF, B.; MATSCHINSKY, F. y MAYEVSKY, A. (1978) Microheterogeneity or redox states of perfused and intact organs. En *Microenvironments and Metabolic Compartmentation* (Srere, P.A. y Estabrook, R.W. eds.), pp. 131-148. Academic Press, New York.
- CHILDS, G.V. (1983) The use of multiple methods to validate immunocytochemical stains. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 168-176.
- CHO-CHUNG, Y.S. y BERGHOFFER, B. (1974) The role of cyclic AMP in neoplastic cell growth and regression. II. Growth arrest and glucose-6-phosphate dehydrogenase isozyme shift by dibutiryl cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 528-534.
- CLARKE, F.M. y MASTERS, C.J. (1976) Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes. *Int. J. Biochem.* 7: 359-365.
- CLARKE, F.M. y MORTON, D.J. (1982) Glycolytic enzyme binding in fetal brain. The role of actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 388-393.
- CLEGG, J.S. (1981) Intracellular water, metabolism and cellular architecture. *Collective Phenomena* 3: 289-212.
- CLEGG, J.S. (1982) Interrelationships between water and cell metabolism in *Artemia* cysts. IX. Evidence for organization of soluble cytoplasmic enzymes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46: 23-37.
- CLEGG, J.S. (1984a) Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries. *Am. J. Physiol.* 246: R-133 - R-151.
- CLEGG, J.S. (1984b) Metabolic compartmentation and "soluble" metabolic pathways. *Bio-Essays* 1, en prensa.
- COE, E.L. y STRUNK, R.C. (1970) The effect of oxamate on glycolysis in intact ascites tumor cells. I. Kinetic evidence for a dual glycolytic system. *Biochim. Biophys. Acta* 208: 189-202.
- CRAVEN, P.A. y BASFORD, R.E. (1974) ADP-induced binding of phosphofructokinase to the brain mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 354: 49-56.

- CZOK, R. y BUCHER, TH. (1960) Crystallized enzymes from the myogen of rabbit skeletal muscle. *Adv. Prot. Chem.* 15: 315-415.
- DATTA, P. (1969) Regulation of branched biosynthetic pathways in bacteria. *Science* 165: 556-562.
- DAVIS, R.H. (1967) Channeling in *Neurospora* metabolism. En *Organizational Biosynthesis* (Vogel, H.J.; Lampen, J.O. y Bryson, V. eds.), pp. 303-322. Academic Press, New York.
- DAVIS, R.H. (1972) Metabolite distribution in cells. *Science* 178: 835-840.
- DAVIS, R.H.; BOWMAN, B.J. y WEISS, R.L. (1978) Intracellular compartmentation and transport of metabolites. *J. Supramol. Struct.* 9: 473-488.
- DE, B.K. y KIRTLEY, M.E. (1977) Interaction of phosphoglycerate kinase with human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 252: 6715-6720.
- De DUVE, C. (1972) Is there a glycolytic particle? En *Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes* (Akeson, A. y Ehrenberg, A. eds.), pp. 715-728. Pergamon Press, Oxford and New York.
- De DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETTO, R.; WATTIAUX, R. y APPELMANS, F. (1955) Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 70: 604-617.
- DENNIS, D.T. y MIERNYK, J.A. (1982) Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 27-50.
- DI MAURO, S.; TROJABORG, W.; GAMBETTI, P. y ROWLAND, L.P. (1971) Binding of enzymes of glycogen metabolism to glycogen in skeletal muscle. *Arch Biochem. Biophys.* 144: 413-422.
- DOLKEN, G.; LEISNER, E. y PETTE, D. (1975) Immunofluorescent localization of glycogenolytic and glycolytic enzyme proteins and of malate dehydrogenase isozymes in cross-striated skeletal muscle and heart to the rabbit. *Histochemistry* 43: 113-121.
- DROST-HANSEN, W. y CLEGG, J.S. eds. (1979) *Cell-associated Water*. Academic Press, New York.
- EHMANN, J.D. y HULTIN, H.O. (1973) Substrate inhibition of soluble and bound lactate dehydrogenase (isoenzyme 5). *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 471-475.
- ELDAN, M. y BLUM, J.J. (1973) Localization of phosphofructokinase on the mitochondria of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* 248: 7445-7448.
- EMMART, E.W.; SPICER, S.S.; TURNER, W.A. y HENSON, J.G. (1962) The localization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase within the muscle of the roach, *Periplaneta americana*, by means of fluorescent antibody. *Exp. Cell Res.* 26: 78-97.
- FAHIMI, H.D. y KARNOVSKY, M.J. (1966) Cytochemical localization of two glycolytic dehydrogenases in white skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 29: 113-128.
- FAIRBANKS, G.; STECK, T.L. y WALLACH, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617.
- FARR, A.G. y NAKANE, P.K. (1981) Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. *J. Immunol. Meth.* 47: 129-144.
- FOEMMEL, R.S.; GRAY, R.H. y BERNSTEIN, I.A. (1975) Intracellular localization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* 250: 1892-1897.
- FULTON, A.B. (1982) How crowded is the cytoplasm? *Cell* 30: 345-347.
- GALL, P.; BROER, Y.; ROSSELIN, G. y HARTMANN, L. (1983) Hormone dependence of the L and M isozymes of pyruvate kinase in isolated rat hepatocytes. *Biol. Cell* 48: 133-142.
- GANCEDO, C. y BAÑUELOS, M. (1976) The glycolytic pathway in yeast. Study under *in situ* conditions. En *Metabolic Interconversion of Enzymes 1975* (Shaltiel, S. ed.), pp. 198-202. Springer, Berlin-Heidelberg, New York.
- GARFINKEL, D. (1981) Computer modeling of metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 6: 69-71.
- GARFINKEL, D. y HESS, B. (1964) Metabolic control mechanisms. VII. A detailed computer model of the glycolytic pathway in ascites cells. *J. Biol. Chem.* 239: 971-983.
- GEORGIEV, G.P. (1967) The nucleus. En *Enzyme Cytology* (Roodyn, D.B. ed.), pp. 27-102. Academic Press, London.
- GINSBURG, A. y STADTMAN, E. (1970) Multienzyme systems. *Annu. Rev. Biochem.* 39: 429-472.
- GOTTLIEB, L.D. (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373-380.
- GRAZY, E. y TROMBETTA, G. (1980) The aldolase-substrate intermediates and their interaction with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a reconstructed glycolytic system. *Eur. J. Biochem.* 107: 369-373.
- GREEN, D.E.; MURER, E.; HULTIN, H.O.; RICHARDSON, S.H.; SALMON, B. BRIERLY, G.P. y BAUM, M. (1965) Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzymes of red blood corpuscle and yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 112: 635-647.
- GUIXE, V. (1978) *Hexoquinasas de músculo: aspectos comparativos y localización celular*. Tesis. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago.
- HATZFELD, A.; FELDMANN, G.; GUESNON, J.; FRAYSSINET, C. y SCHAPIRA, F. (1978) Location of adult and fetal aldolases A, B, and C by immunoperoxidase technique in LF fast-growing rat hepatomas. *Cancer Res.* 38: 16-22.
- HERS, H.-G. y VAN SCHAFTINGEN, E. (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206: 1-12.
- HERS, H.G.; BERTHET, J.; BERTHET, L. y De DUVE, C. (1951) Le système hexose phosphatasique III. Localisation intracellulaire des ferments par centrifugation fractionnée. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33: 21-41.
- HESS, B. y BOITEUX, A. (1972) Heterologous enzyme-enzyme interactions. En *Protein-Protein Interactions* (Jaenicke, R. y Helmreich, E. eds.), pp. 271-296. Springer-Verlag, Berlin.
- HEUSER, J.E. y KIRSCHNER, M.W. (1980) Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 86: 212-234.
- HIGASHI, T.; RICHARDS, C.S. y UYEDA, K. (1979) The interaction of phosphofructokinase with erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 254: 9542-9550.
- HOFER, H.W. (1971) Influence of enzyme concentration on the kinetic behaviour of rabbit muscle phosphofructokinase. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352: 997-1004.
- HOLMES, R.S. y MASTERS, C.J. (1979) Subcellular localization of isozymes. *Isozymes. Current Top. Biol. Med. Res.* 3: 53-114.
- HUBSCHER, G.; MAYER, R.J. y HANSEN, H.J.M. (1971) Glycolytic enzymes as a multi-enzyme system. *Bioenergetics*, 2: 115-118.
- HULME, E.C. y TIPTON, K.F. (1971) The dependence of phosphofructokinase kinetics upon protein concentration. *FEBS Lett.* 12: 197-200.
- HUSE, K. y KOPPERSCHLAGER, G. (1983) Interactions of antibodies against soluble phosphofructokinase with the soluble and particulate enzymes from yeast. *FEBS Lett.* 155: 50-54.

- JENSEN, R.A. y BYNG, G.S. (1981) The partitioning of biochemical pathways with isozyme systems. *Isozymes. Current Top. Biol. Med.* 5: 143-174.
- JUNGERMANN, K. y KATZ, N. (1982) Metabolic heterogeneity of liver parenchyma. En *Metabolic Compartmentation* (Sies, H. ed.), pp. 411-435. Academic Press, London.
- KANT, J.A. y STECK, T.L. (1973) Specificity in the association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with isolated human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 248: 8457-8464.
- KARADSHEH, N.S. y UYEDA, K. (1977) Changes in allosteric properties of phosphofructokinase bound to erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 252: 7418-7420.
- KATZ, J. y ROGNSTAD, R. (1976) Futile cycles in the metabolism of glucose. *Current Top. Cell. Reg.* 10: 237-289.
- KATZ, J. y ROGNSTAD, R. (1978) Compartmentation of glucose metabolism in liver. En *Microenvironments and Metabolic Compartmentation* (Srere, P.A. y Estabrook, R.W. eds.), pp. 227-241. Academic Press, New York.
- KEMPNER, E.S. (1975) Properties of organized enzymatic pathways. *Sub-Cell. Biochem.* 4: 213-221.
- KEMPNER, E.S. y MILLER, J.H. (1968a) The molecular biology of *Euglena gracilis*. IV. Cellular stratification by centrifuging. *Exp. Cell. Res.* 51: 141-149.
- KEMPNER, E.S. y MILLER, J.H. (1968b) The molecular biology of *Euglena gracilis*. V. Enzyme localization. *Exp. Cell Res.* 51: 150-156.
- KENT, R.J.; LIN, R.-L.; SALLACH, H.J. y COHEN, P.P. (1975) Reversible dissociation of a carbamoyl phosphate synthase-aspartate transcarbamoylase-dihydroorotase complex from ovarian eggs of *Rana catesbeiana*: effect of uridine triphosphate and other modifiers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72: 1712-1716.
- KEOKITICHAI, S. y WRIGGLESWORTH, J.M. (1980) Association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the membrane of the intact human erythrocyte. *Biochem. J.* 187: 837-841.
- KIMURA, K.; ENDOU, H.; SUDO, J. y SAKAI, F. (1979) Glucose dehydrogenase (hexose 6-phosphate dehydrogenase) and the microsomal electron transport system. Evidence supporting their possible functional relationship. *J. Biochem.* 85: 319-326.
- KLIMAN, H.J. y STECK, T.L. (1980) Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human red cell membrane. A kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* 255: 6314-6321.
- KNOLL, H.R. (1978) Association of glycolytic enzymes with particulate fractions from nerve endings. *Biochim. Biophys. Acta* 522: 1-9.
- KNOLL, H.R. (1980) Compartmentation of glycolytic enzymes in nerve endings as determined by glutaraldehyde fixation. *J. Biol. Chem.* 255: 6439-6444.
- KNOLL, H.R.; TAYLOR, W.F. y WELLS, W.W. (1974) Insulin effects on brain energy metabolism and the related hexokinase distribution. *J. Biol. Chem.* 249: 6930-6935.
- KOHEN, E.; KOHEN, C.; THORELL, B. y BARTICK, P. (1979) A topographic analysis of metabolic pathways in single living cells by multisite microfluorometry. *Exp. Cell Res.* 119: 23-30.
- KURGANOV, B.I. y LOBODA, N.I. (1979) Regulation of enzyme activity in adsorptive enzyme systems. *J. Theor. Biol.* 79: 281-301.
- KUTER, M.R.; MASTERS, C.J.; WALSH, T.P. y WINZOR, D.J. (1981) Effect of ionic strength on the interaction between aldolase and actin-containing filaments. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 306-310.
- KWON, T.-W. y OLCOTT, H.S. (1965) Augmentation of aldolase activity by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19: 300-305.
- LARDY, H.A. (1965) On the direction of pyridine nucleotide oxidation-reduction reactions in gluconeogenesis and lipogenesis. En *Control of Energy Metabolism* (Chance, B. Estabrook, R.W. y Williamson, J.R. eds.), pp. 245-248. Academic Press, New York.
- LARRABEE, M.G. (1978) A new mathematical approach to the metabolism of [¹⁴C] glucose, with applications to sensory ganglia of chicken embryos. *J. Neurochem.* 31: 461-491.
- LARRABEE, M.G. (1979) Addendum to a new mathematical approach to metabolism of [¹⁴C] glucose: the pyruvate carboxylase reaction. *J. Neurochem.* 33: 123-131.
- LESSMANN, D.; SCHIMZ, K.-L. y KURZ, G. (1975) D-glucose-6-phosphate dehydrogenase (Entner-Doudoroff enzyme) from *Pseudomonas fluorescens*. Purification, properties and regulation. *Eur. J. Biochem.* 59: 545-559.
- LING, G.N. (1969) A new model for the living cell: a summary of the theory and recent experimental evidence in its support. *Int. Rev. Cytol.* 26: 1-61.
- LOWRY, C.V.; KIMMEY, J.S.; FELDER, S.; CHI, M.M.-Y.; KAISER, K.K.; PASSONNEAU, P.N.; KIRK, K.A. y LOWRY, O.H. (1978) Enzyme patterns in single human muscle fibers. *J. Biol. Chem.* 253: 8269-8277.
- LYNCH, R.M. y PAUL, R.J. (1983) Compartmentation of glycolytic and glycogenolytic metabolism in vascular smooth muscle. *Science* 222: 1344-1346.
- LYNEN, F. (1980) Structure and function of fatty acid synthetase. En *Cell Compartmentation and Metabolic Channeling* (Nover, L.; Lynen, F. y Mothes, K. eds.), pp. 125-134. VEB Gustav Fischer, Verlag, Jena.
- MACGREGOR, J.S.; SINGH, V.N.; DAVOUST, S.; MELLONI, E.; PONTREMOLI, S. y HORECKER, B.L. (1980) Evidence for formation of a rabbit liver aldolase-rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 77: 3889-3892.
- MAINO, V.C. y YOUNG, F.E. (1974) Regulation of glucosylation of teichoic acid. II. Partial characterization of phosphoglucomutase in *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* 249: 5176-5181.
- MARGRETH, A.; CATANI, C. y SCHIAFFINO, S. (1967) Isolation of microsome-bound phosphofructokinase from frog skeletal muscle and its inhibition by calcium ions. *Biochem. J.* 102: 35c-37c.
- MASTERS, C.J. (1981) Interactions between soluble enzymes and subcellular structure. *CRC Critical Revs. Biochem.* 11: 105-143.
- MASTERS, C.J. y WINZOR, D.J. (1981) Physicochemical evidence against the concept of an interaction between aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 185-190.
- MATLIB, M.A.; BOESMAN-FINKESLSTEIN, M. y SRERE, P.A. (1978) The kinetics of rat liver citrate synthase *in situ*. *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 426-430.
- MATSCHINSKY, F.M.; HINTZ, C.S. REICHLMEIER, K.; QUISTORFF, B. y CHANCE, B. (1978) The intralobular distribution of oxidized and reduced pyridine nucleotides in the liver of normal and diabetic rats. En *Microenvironments and Metabolic Compartmentation* (Srere, P.A. y Estabrook, R.W. eds.), pp. 149-166. Academic Press, New York.
- McCONKEY, E.H. (1982) Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 79: 3236-3240.

- McDANIEL, C.F. y KIRTLEY, M.E. (1975) Cooperativity in the interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 1196-1200.
- McDANIEL, C.F.; KIRTLEY, M.E. y TANNER, M.J.A. (1974) The interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 249: 6478-6485.
- MELNICK, R.L. y HULTIN, H.O. (1973) On the existence of a complex of glycolytic enzymes. *Bioenergetics*. 5: 107-117.
- MINTON, A.P. (1981) Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biopolymers* 20: 2093-2120.
- MINTON, A.P. y WILF, J. (1981) Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 20: 4821-4826.
- MORTON, D.J., CLARKE, F.M. y MASTERS, C.J. (1977) An electron microscope study of the interaction between fructose diphosphate aldolase and actin-containing filaments. *J. Cell. Biol.* 74: 1016-1023.
- MOSES, V. (1978) Compartmentation of glycolysis in *Escherichia coli*. En *Microenvironments and Metabolic Compartmentation* (Srere, P.A. y Estabrook, R.W. eds.), pp. 169-186. Academic Press, New York.
- MOWBRAY, J. y MOSES, V. (1976) The tentative identification in *Escherichia coli* of a multienzyme complex with glycolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 66: 25-36.
- MURTHY, S.N.P.; LIU, T.; KAUL, R.K.; KOHLER, H. y STECK, T.L. (1981) The aldolase-binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH₂ terminus of band 3. *J. Biol. Chem.* 256: 11203-11208.
- NADKARNI, M.; LOBO, Z. y MAITRA, P.K. (1982) Particulate phosphofructokinase of yeast: physiological studies. *FEBS Lett.* 147: 251-255.
- OKA, K.-I.; TAKAHASHI, T. y HORI, S.H. (1981) Differential effects of the NADPH/NADP⁺ ratio on the activities of hexose-6-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 662: 318-325.
- OPPERDOES, F.R. (1982) The glycosome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 386: 543-545.
- OTTAWAY, J.H. y MOWBRAY, J. (1977) The role of compartmentation in the control of glycolysis. *Current Top. Cell. Reg.* 12: 107-208.
- OVADI, J.; MOHAMED OSMAN, I.R. y BATKE, J. (1983) Interaction of the dissociable glycerol-3-phosphate dehydrogenase and fructose-1,6-bisphosphate aldolase. Quantitative analysis by an extrinsic fluorescence probe. *Eur. J. Biochem.* 133: 433-437.
- OVADI, J.; SALERNO, C.; KELETI, T. y FASELLA, P. (1978) Physicochemical evidence for the interaction between aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 90: 499-503.
- PATTHY, L. y VAS, M. (1978) Aldolase-catalysed inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Nature* 276: 94-95.
- PETRUSZ, P. (1983) Essential requirements for the validity of immunocytochemical staining procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 177-179.
- PETTE, D. (1975) Some aspects of supramolecular organization of glycogenolytic and glycolytic enzymes in muscle. *Acta Histochem.* 14S: 47-68.
- PETTE, D.; LUH, W. y BUCHER, Th. (1962) A constant-proportion group in the enzyme activity pattern of the Embden-Meyerhof chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7: 419-424.
- PHILLIPS, D.; BLAKE, C.C.F. y WATSON, H.C. eds. (1981) *The Enzymes of Glycolysis: Structure, Activity and Evolution*. Phil. Trans. Roy. Soc. London. Series B293: 1-214.
- PONTREMOLI, S.; MELLONI, E.; SALAMINO, F.; SPARATORE, B.; MICHETTI, M.; SINGH, V.N. y HORECKER, B.L. (1979) Evidence for an interaction between fructose 1,6-bisphosphatase and fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 197: 356-363.
- POON, W.M. y WOOD, T. (1968) Soluble and insoluble phosphofructokinase in rat muscle. *Biochem. J.* 110: 792-794.
- PORTER, K.R. y ANDERSON, K.L. (1982) The structure of the cytoplasm matrix preserved by freeze-drying and freeze-substitution. *Eur. J. Cell Biol.* 29: 83-96.
- RAFTELL, M. y BLOMBERG, F. (1974) Enzyme polymorphism in rat-liver microsomes and plasma membranes. 2. An immunochemical comparison of enzyme-active antigens solubilized by detergents, papain or phospholipases. *Eur. J. Biochem.* 49: 31-39.
- RAPOPORT, T.A.; HEINRICH, R.; JACOBASCH, G. y RAPOPORT, S. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 42: 107-120.
- REED, L.J. y COX, D.J. (1966) Macromolecular organization of enzyme systems. *Annu. Rev. Biochem.* 35: 57-84.
- REINHART, G.D. y LARDY, H.A. (1980) Rat liver phosphofructokinase: kinetic and physiological ramifications of the aggregation behavior. *Biochemistry* 19: 1491-1495.
- RICH, G.T.; DAWSON, A.P. y PRYOR, J.S. (1984) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase release from erythrocytes during haemolysis. No evidence for substantial binding of the enzyme to the membrane in the intact cell. *Biochem. J.* 221: 197-202.
- ROSS, B.D. y GUDER, W.G. (1982) Heterogeneity and compartmentation in the kidney. En *Metabolic Compartmentation* (Sies, H. ed.), pp. 363-409. Academic Press, London.
- SCHLIWA, M.; VAN BLERKOM, J. y PORTER, K.R. (1981a) Stabilization of the cytoplasmic ground substance in detergent-opened cells and a structural and biochemical analysis of its composition. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 4329-4333.
- SCHLIWA, M.; VAN BLERKOM, J. y PRYZWANSKY, K.B. (1981b) Structural organization of the cytoplasm. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46: 51-67.
- SCHNARRENBERGER, C.; HERBERT, M. y KRUGER, I. (1983) Intracellular compartmentation of isozymes of sugar phosphate metabolism in green leaves. *Isozymes: Curr. Top. Biol. Med. Res.* 8: 23-51.
- SHAW, W.N. y STADIE, W.C. (1959) Two identical Embden-Meyerhof enzyme systems in normal rat diaphragms differing in cytological location and response to insulin. *J. Biol. Chem.* 234: 2491-2496.
- SHIN, B.C. y CARRAWAY, K.L. (1973) Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human erythrocyte membrane. Effect of detergents, trypsin, and adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 248: 1436-1444.
- SHNITKA, T.K. y SELIGMAN, A.M. (1971) Ultrastructural localization of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 375-396.
- SHULMAN, R.G.; BROWN, T.R.; UGURBIL, K.; OGAWA, S.; COHEN, S.M. y DEN HOLLANDER, J.A. (1979) Cellular applications of ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance. *Science* 205: 160-166.

- SIGEL, P. y PETTE, D. (1969) Intracellular localization of glycogenolytic and glycolytic enzymes in white and red rabbit skeletal muscle. A gel film method for coupled enzyme reactions in histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 225-237.
- SKILLETER, D.N. y KUN, E. (1972) The oxidation of L-lactate by liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 92-104.
- SOLS, A. y MARCO, R. (1970) Concentrations of metabolites and binding sites. Implications in metabolic regulation. *Current Top. Cell. Reg.* 2: 227-273.
- SOLS, A.; FELIU, J.E. y ARAGON, J.J. (1976) Study of enzyme activity in animal cells *in situ*. En *Metabolic Interconversion of Enzymes 1975* (Shaltiel, S. ed.), pp. 191-197. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- SOLTI, M.; BARTHA, F.; HALASZ, N.; TOTH, G.; SIROKMAN, F. y FRIEDRICH, P. (1981) Localization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in intact human erythrocytes. Evaluation of membrane adherence in autoradiographs at low grain density. *J. Biol. Chem.* 256: 9260-9265.
- SPAMER, C. y PETTE, D. (1977) Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibres from rabbit psoas and soleus muscle. *Histochemistry* 52: 201-216.
- SRERE, P.A. (1967) Enzyme concentrations in tissues. *Science*, 158: 936-937.
- SRERE, P.A. (1970) Enzyme concentrations in tissue. II. An additional list. *Biochem. Med.* 4: 43-46.
- SRERE, P.A. y MOSBACH, K. (1974) Metabolic compartmentation: symbiotic, organellar, multienzymic, and microenvironmental. *Annu. Rev. Microbiol.* 28: 61-83.
- STADTMAN, E.R. (1968) The role of multiple enzymes in the regulation of branched metabolic pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 151: 516-630.
- STADTMAN, E.R.; COHEN, G.N.; LeBRAS, G. y DE ROBICHON-SZULMAJSTER, H. (1961) Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 236: 2033-2038.
- STECK, T.L. (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J. Cell Biol.* 61: 1-19.
- STECK, T.L. FAIRBANKS, G. y WALLACH, D.F.H. (1971) Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane. Proteolytic dissection. *Biochemistry*, 10: 2617-2624.
- STRAPAZON, E. y STECK, T.L. (1976) Binding of rabbit muscle aldolase to band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 15: 1421-1424.
- STRAPAZON, E. y STECK, T.L. (1977) Interaction of the aldolase and the membrane of human erythrocytes. *Biochemistry*, 16: 2966-2971.
- TATA, J.R. (1964) Subcellular redistribution of liver α -glucan phosphorylase during alterations in glycogen content. *Biochem. J.* 90: 284-292.
- TSAI, I.-H.; MURTHY, S.N.P. y STECK, T.L. (1982) Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 257: 1438-1442.
- URETA, T. (1978) The role of isozymes in metabolism: a model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. *Current Top. Cell. Reg.* 13: 233-258.
- URETA, T.; RADOJKOVIC, J. y BUSTAMANTE, E. (1983) A modified form of mitochondrial hexokinase produced by ATP-induced solubilization. *Biochem. Int.* 7: 585-592.
- VAN BERKEL, T.J.C. (1982) Functions of hepatic and non-parenchymal cells. En *Metabolic Compartmentation* (Sies, H. ed.), pp. 437-482. Academic Press, London.
- WACHSMUTH, E.D. (1976) The localization of enzymes in tissue sections by immunohistochemistry. Conventional antibody and mixed aggregation techniques. *Histochem. J.* 8: 235-270.
- WALSH, T.P.; CLARKE, F.M. y MASTERS, C.J. (1977) Modification of the kinetic parameters of aldolase on binding to the actin-containing filaments of skeletal muscle. *Biochem. J.* 165: 165-167.
- WALSH, T.P.; WINZOR, D.J.; CLARKE, F.M.; MASTERS, C.J. y MORTON, D.J. (1980) Binding of aldolase to actin-containing filaments. Evidence of interaction with the regulatory proteins of skeletal muscle. *Biochem. J.* 186: 89-98.
- WEBER, J.P. y BERNHARD, S.A. (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.
- WEITZMAN, P.D.J. y HEWSON, J.K. (1973) *In situ* regulation of yeast citrate synthase. Absence of ATP inhibition observed *in vitro*. *FEBS Lett.* 36: 227-231.
- WESTRIN, H. y BACKMAN, L. (1983) Association of rabbit muscle glycolytic enzymes with filamentous actin. A counter-current distribution study at high ionic strength. *Eur. J. Biochem.* 136: 407-411.
- WILLIAMS, D.G.; JENKINS, R.E. y TANNER, M.J.A. (1979) Structure of the anion-transport protein of the human erythrocyte membrane. Further studies on the fragments produced by proteolytic digestion. *Biochem. J.* 181: 477-493.
- WILSON, J.E. (1980) Brain hexokinase, the prototype ubiquitous enzyme. *Current Top. Cell. Reg.* 16: 1-54.
- WILSON, J.E.; REID, S. y MASTERS, C.J. (1982) A comparative study of the binding of aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to the human erythrocyte membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 215: 610-620.
- WOLOSEWICK, J.J. y PORTER, K.R. (1979) Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality. *J. Cell Biol.* 82: 114-139.
- WOLPERT, J.S. y ERNST-FONBERG, M.L. (1975) Dissociation and characterization of enzymes from a multienzyme complex involved in CO₂ fixation. *Biochemistry* 14: 1103-1107.
- WOMBACHER, H. (1983) Molecular compartmentation by enzyme cluster formation. A view over current investigations. *Mol. Cell. Biochem.* 56: 155-164.
- YAMASHITA, S.; YAMAMOTO, N. y YASUDA, K. (1979) Immunohistochemical study of lactate dehydrogenase isozymes in rat liver. *Acta Histochem. Cytochem.* 12: 125-140.