

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**EVOLUCIÓ DELS MECANISMES DE CONTROL
DEL METABOLISME DEL GLICOGEN**

DANIEL CIFUENTES BUIRA

Barcelona, maig de 2006

Programa de Doctorat de Biotecnologia
Bienni 2000-2002

CAPÍTOL 2
EFICIÈNCIA AL·LOSTÈRICA DE LA G6P

I, de cop i volta, en la connexió sobtada d'un resultat, se't perfila un raonament que et sembla més convincent que els altres. Llavors proves d'aplicar-lo a tots els casos semblants, proves de fer-lo servir per obtenir previsions, i descobreixes que ho has endevinat.

Quart dia, vespres.

Umberto Eco, "*El nom de la rosa*"

CAPÍTOL 2: EFICIÈNCIA AL·LOSTÈRICA DE LA G6P.

2.1 INTRODUCCIÓ

Les hexoquinases (EC 2.7.1.1) catalitzen el primer pas obligat de la glucòlisi, on fosforilen la glucosa a G6P segons la reacció $R-CH_2OH + MgATP^{2-} \rightarrow R-CH_2-O-PO^{2-} + MgADP^-$. En vertebrats trobem quatre isoenzims d'hexoquinasa, les propietats bioquímiques dels quals es resumeixen en la taula 2.1. El seu substrat preferent és la glucosa però també poden fosforilar altres hexoses, com per exemple fructosa, manosa i 2-deoxiglucosa. Així doncs, el fet d'anomenar a la hexoquinasa de tipus IV pel nom tradicional de glucoquinasa no implica una especificitat de substrat exclusiva per la glucosa.

Taula 2.1 Paràmetres cinètics de les hexoquinases de mamífers

Isoenzim (Àlies)	$S_{0,5}$ (mM)		K_i (mM)
	per Glc	per ATP	per G6P
HK1 (A, Tipus I)	0,03	0,5	0,02
HK2 (B, Tipus II)	0,3	0,7	0,02
HK3 (C, Tipus III)	0,003	1,0	0,1
GK (D, Tipus IV)	5	0,6	60

Segon els seus paràmetres cinètics, les podem agrupar en dos grups: hexoquinases d'alta afinitat (HK1, HK2, HK3) i de baixa afinitat per glucosa (GK). La GK és l'únic isoenzim que en condicions fisiològiques no s'inhibeix per G6P (Cárdenas, 1995) però *in vivo* la seva activitat està modulada per la proteïna reguladora (GKRP) (de la Iglesia et al., 2000; Malaisse et al., 1990) que incrementa la seva $S_{0,5}$ fins a 15-17 mM. Aquestes característiques fan que la GK sigui un bon sensor de glucosa donat que l'activitat de la GK varia molt dins del rang de concentracions fisiològiques de glucosa (figura 2.1).

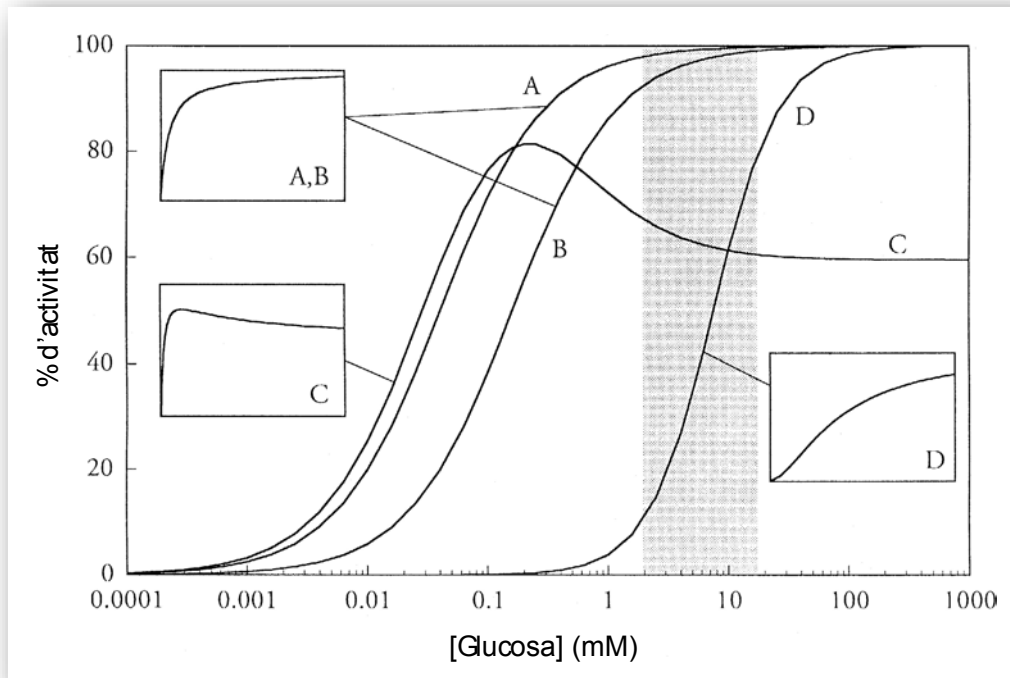


Figura 2.1 Activitat de les hexoquinases en funció de la glucosa. El diagrama presenta les propietats cinètiques dels isoenzim de rata. La zona grisa indica el rang de la concentració de glucosa en sang i en els quadres inserits es representen les cinètiques corresponents amb la glucosa en escala no logarítmica. (Cárdenas, 1995)

Les hexoquinases de tipus I i II de vertebrats es localitzen majoritàriament a la mitocòndria (figura 2.2.a), on es troben anclades a la membrana externa per mitjà d'un domini hidrofòbic que tenen al seu extrem N-terminal i interaccionen amb les porines (Sui & Wilson, 1997; Wilson, 2003). Des d'aquesta situació privilegiada, utilitzen preferentment l'ATP que arriba directament de la mitocòndria i produeixen ADP, que s'internalitza un altre cop a la mitocòndria per completar la fosforilació oxidativa (BeltrandelRio & Wilson, 1991; BeltrandelRio & Wilson, 1992a; BeltrandelRio & Wilson, 1992b).

Per aprofitar aquest ús racional dels recursos, la presència de glucosa o d'anàlegs com la 2-deoxiglucosa potencien encara més la unió de l'HK1 i l'HK2 al mitocondri (Pastorino et al., 2002; Rabuazzo et al., 1997). La translocació de les hexoquinases és dependent d'Akt/PKB (Gottlob et al., 2001) i la bloqueja l'activació de GSK3 β (Pastorino et al., 2005).

La GK en canvi mostra una distribució nuclear en absència de glucosa i transloca al citosol en resposta a glucosa, on té lloc la síntesi de G6P (figura 2.2.b) (Agius & Peak, 1997; de la Iglesia et al., 1999).

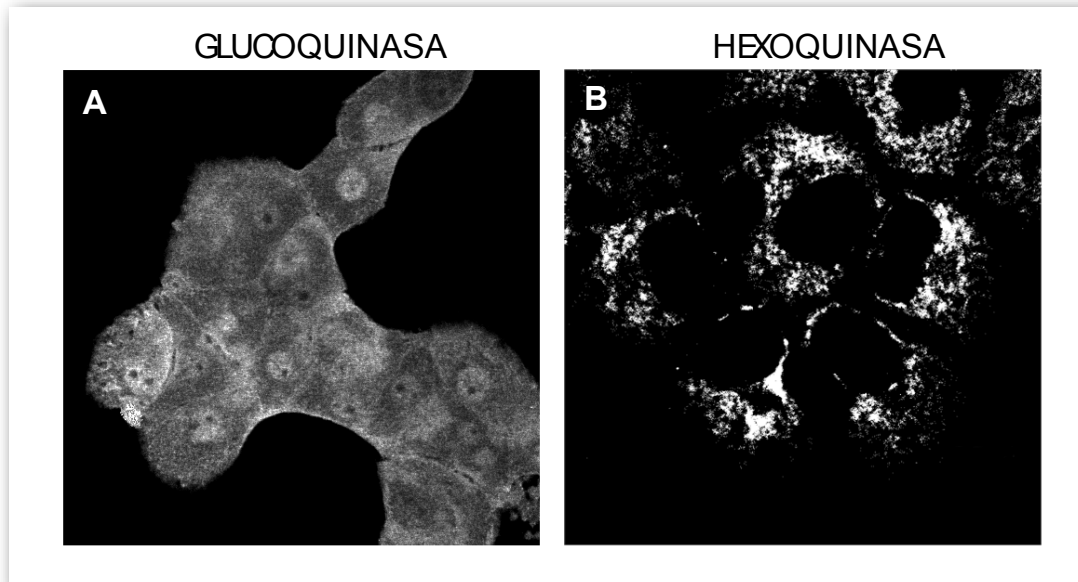


Figura 2.2 Localització subcel·lular de GK i HK1. A) Immunofluorescència de GK en hepatòcits aïllats de rata incubats amb glucosa, que mostra una distribució citosòlica uniforme i una part de l'enzim que encara es troba la nucli. B) Immunofluorescència d'HK1 que mostra la distribució mitocondrial de l'enzim en cèl·lules FTO2B.

La G6P activa al·lostèricament la glicogen sintasa i per tant té un paper molt important en el metabolisme del glicogen, alhora com a precursor i com a molècula senyalitzadora. La G6P interactua amb la GS (Ferrer et al., 2003) i provoca l'activació al·lostèrica de l'enzim, probablement a través d'una reorganització estructural. Aquest canvi conformacional de retruc converteix a la GS en millor substrat per a les fosfatases, que catalitzaran la desfosforilació de la GS (Villar-Palasi, 1991). El resultat *in vivo* d'aquests canvis és l'activació covalent de l'enzim.

El control al·lostèric de la síntesi de glicogen mediat per G6P segueix bàsicament els mateixos mecanismes en fetge i en múscul. Tanmateix hi ha una diferència fonamental, i és que mentre la GS muscular s'activa per G6P indistintament de l'isoenzim que l'hagi produït, l'activació al·lostèrica de la GS hepàtica és més eficient quan la G6P es produeix per l'acció catalítica de la GK

que no pas per HK1. (O'Doherty et al., 1996; Seoane et al., 1999; Seoane et al., 1996)

El “tub d'assaig ideal” per a estudiar les diferències entre la G6P procedent d'HK1 i de GK a l'hora d'activar l'LGS és la línia cel·lular FTO2B perquè expressa una combinació única d'isoenzims d'hexoquinasa i glicogen sintasa. A aquestes cèl·lules derivades d'un hepatoma els manca la GK però expressen l'LGS i una combinació d'hexoquinases d'alta afinitat. Amb l'activitat hexoquinasa endògena aquestes cèl·lules no poden sintetitzar glicogen. Només quan les complementem amb GK es reconstitueix la capacitat per activar l'LGS i acumular glicogen (Gomis et al., 2002).

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori indiquen que el pas limitant de la síntesi de glicogen en FTO2B és l'activació de l'LGS però també posen en evidència les diferències entre l'HK1 i la GK a l'hora de produir G6P capaç d'induir aquesta activació. Segons aquest escenari se'ns planteja la possibilitat de l'existència d'una compartimentalització de la G6P o una canalització del flux metabòlic. Entendre el fonament molecular d'aquestes diferències és el principal objectiu d'estudi d'aquest capítol.

2.2 RESULTATS

2.2.1 Activació al·lostèrica de la glicogen sintasa hepàtica.

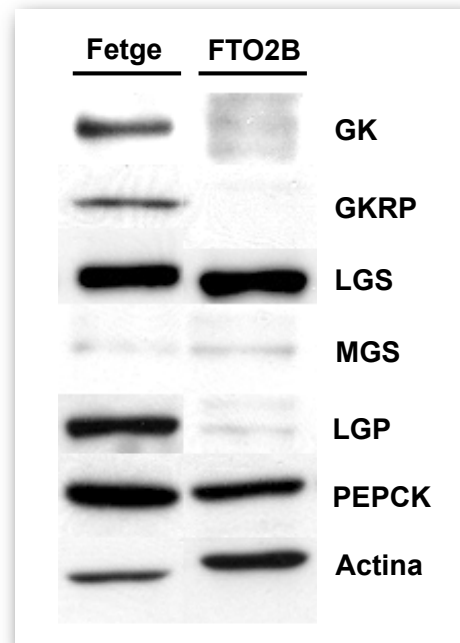
2.2.1.1 Caracterització de les hexoquinases presents en FTO2B.

Abans de començar els estudis de síntesi de glicogen en les FTO2B vam realitzar una caracterització del perfil enzimàtic d'aquestes cèl·lules. Volíem identificar les isoformes de hexoquinasa i GS que expressava aquest hepatoma per així poder encarar els experiments d'enginyeria metabòlica amb més precisió.

Mitjançant la tècnica de la immunodetecció Western vàrem comparar l'expressió relativa de MGS, LGS, GP, GKRP, PEPCK, GK, HK1 i HK2 en FTO2B respecte a mostres de fetge de ratolí (figura 2.3).

Així vam poder confirmar que les FTO2B mantenen l'expressió de la isoforma hepàtica de la GS però que han perdut l'expressió de la GK i GKRP. Expressen poca LGP en comparació amb els nivells que assoleix en fetge. La seva capacitat gluconeogènica es confirma per l'expressió de PEPCK. Aquests resultats confirmen que la línia cel·lular FTO2B és un bon model per estudiar l'efecte de les diferents isoformes d'hexoquinasa sobre l'activació al·lostèrica de la glicogen sintasa hepàtica.

2.3 Caracterització de les cèl·lules FTO2B. Mitjançant la immunodetecció Western d'homogenats totals analitzem el contingut enzimàtic de l'hepatoma FTO2B en comparació amb el fetge.



2.2.1.2 Eficàcia de la G6P.

Per a sintetitzar glicogen cal activar l'LGS i el fet que les cèl·lules FTO2B fallin en aquest punt, amb la combinació endògena d'enzims que hem descrit en l'apartat anterior, ens fa replantejar el mecanisme d'activació al·lostèrica per G6P. És una qüestió de qualitat de la G6P, és a dir, depèn de l'isoforma d'hexoquinasa que la sintetitza i el lloc on la produeix? O és un problema de quantitat, cal assolir uns nivells mínims de G6P?

Quan diem que pot ser un problema de la qualitat no posem en dubte que HK o GK produeixen molècules de G6P que són químicament idèntiques i indistingibles. Més aviat ens referim a la possibilitat que la localització subcel·lular on aquests enzims fosforilen la glucosa jugui un paper importat, bé per problemes d'accessibilitat a l'LGS o bé per la proximitat d'altres enzims que canalitzen la G6P cap a la glucòlisi, contribuint en ambdós casos a una compartimentalització de la G6P.

La possibilitat alternativa és que tot el problema es fonamenti en una simple qüestió de quantitat de G6P. L'HK1 s'inhibeix per producte i podria ser que en condicions fisiològiques no arribés mai al llindar necessari de G6P per activar l'LGS, llindar que per altra banda assoleix perfectament la GK.

2.2.1.2.1 Unió d'HK1 a la mitocòndria.

Hem vist que una de les diferències entre l'HK1 i la GK és la seva localització subcel·lular. Mentre la GK fosforila la glucosa en el citosol, l'HK1 roman unida a la membrana externa de la mitocòndria. Per estudiar si aquesta localització situa a la G6P procedent de l'HK1 en desavantatge per a activar l'LGS, vam seguir dues estratègies diferents.

En un primer intent per desacoblar l'HK1 de la mitocòndria vàrem emprar cotrimazol, una droga que allibera l'HK1 de la seva localització mitocondrial (Penso & Beitner, 1998). Com es pot observar en la figura 2.4, la glucosa indueix la translocació en FTO2B de l'activitat hexoquinasa cap al pellet de 13.000 rpm (la fracció on es troben els mitocondris), tal i com succeeix en altres tipus cel·lulars (Pastorino et al., 2002; Rabuazzo et al., 1997). En canvi, el tractament amb cotrimazol enriqueix l'activitat hexoquinasa de la fracció citosòlica, fins i tot quan es co-incuba la droga amb glucosa.

Malgrat que efectivament aconseguíem alterar la distribució de les hexoquinases endògenes, en cap cas detectàrem síntesi de glicogen.

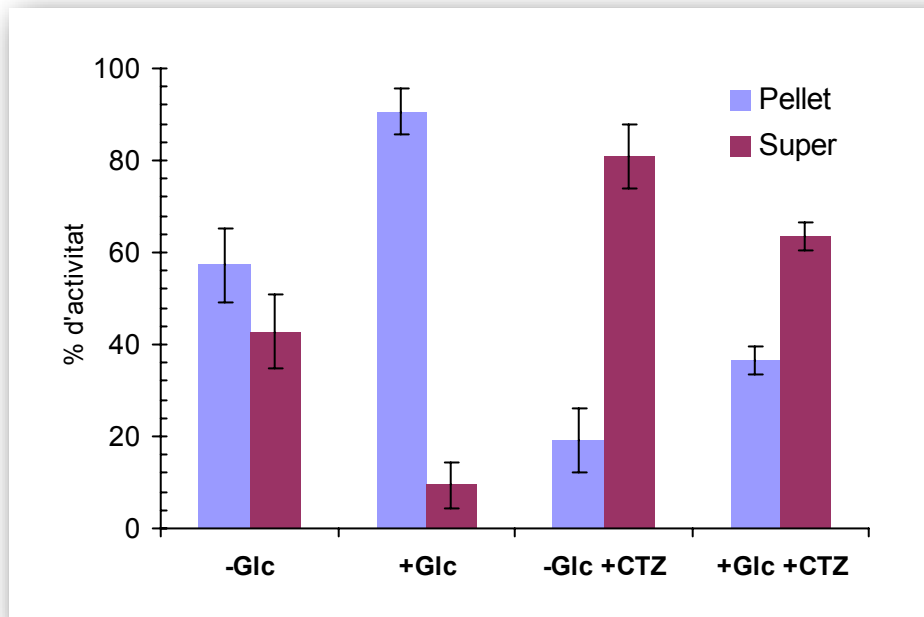


Figura 2.4 Translocació de l'activitat hexoquinasa en cèl·lules FTO2B. Les cèl·lules s'incuben en presència o absència de glucosa 25 mM i cotrimazol 20 μ M. Els extractes cel·lulars es centrifuguen a 13.000 rpm i es mesura l'activitat hexoquinasa total en el súper i el pellet resultants. Es mostra la distribució de l'activitat en cada condició.

També vam decidir a abordar el canvi de la localització de l'HK1 amb tècniques de biologia molecular. El Dr. J.E. Wilson ens va cedir amablement una construcció de l'HK1 a la qual li mancava l'extrem N-terminal, precisament el domini que li serveix per ancorar-se a la membrana de la mitocòndria (GFP-HK1 Δ mit) (Sui & Wilson, 1997). Gràcies a que estava fusionada a la GFP, en tot moment podíem seguir la localització del mutant d'HK1.

Vam transfectar les FTO2B amb el plasmidi de l'GFP-HK1 Δ mit, i les incubàrem amb glucosa. Un cop fixades les cèl·lules vam determinar la presència de glicogen per immunocitoquímica. Malgrat que aconseguíem que les FTO2B expressessin una HK soluble, no reeixíem en l'intent de fer-les sintetitzar glicogen.

Aquests resultats doncs, indiquen que l'eficàcia de la G6P sintetitzada per l'HK1 a l'hora d'activar l'LGS no depèn de la localització subcel·lular de l'enzim.

2.2.1.2.2 Hxk2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Si la diferència en la capacitat d'activació de l'LGS no és un problema de la localització de l'origen de la G6P com indiquen els resultats dels apartats anteriors, cal abordar doncs si és qüestió de la quantitat necessària de G6P per activar l'LGS. Sembla que l'HK1, malgrat la seva alta afinitat per glucosa, no produiria elevades concentracions de G6P degut a que aquesta retroinhibeix l'enzim. En canvi la GK, de baixa afinitat per la glucosa, no s'inhibeix per producte i la G6P que sintetitza és capaç d'activar l'LGS.

Per determinar si el factor limitant és la retroinhibició per G6P o l'afinitat per glucosa, calia assajar una hexoquinasa d'alta afinitat però que no s'inhibís per producte per poder fosforilar glucosa en grans quantitats. La Hxk2 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScHxk2) reuneix aquest requisits. És una hexoquinasa de 50 kDa, amb una Km per la glucosa al voltant de 0,1 mM i regulada per trehalosa, un disacàrid de reserva de llevats que no es troba en vertebrats.

Vam subclonar la ScHxk2 en el vector pEGFP-C1 per poder-la expressar en cèl·lules FTO2B fusionada a GFP i vam electroporar les cèl·lules amb el plasmidi resultant. Com a controls negatiu i positiu vam transfectar també les construccions de GFP i GFP-GK. Dos dies més tard les vam deplecionar de glucosa i després les incubàrem amb glucosa per induir la síntesi de glicogen. Per mitjà d'un anticòs específic vàrem estudiar la presència de glicogen.

Els resultats d'immunofluorescència (figura 2.5) indiquen que les cèl·lules que expressen ScHxk2 acumulen glicogen de la mateixa manera que les transfectades amb GK. Així doncs, la ScHxk2 és tan eficient com la GK a l'hora de sintetitzar G6P capaç d'activar l'LGS.

Estudis previs han demostrat que la G6P generada per gluconeogènesi activa al·lostèricament l'LGS (Gomis et al., 2003) però aquest experiment que mostra la capacitat de la ScHxk2 per promoure la síntesi de glicogen en FTO2B és la primera evidència de que la GK tampoc és imprescindible per activar l'LGS per la via directa de la fosforilació de glucosa i indica que l'LGS també es

pot activar al·lostèricament a partir de la G6P sintetitzada per una hexoquinasa d'alta afinitat per la glucosa.

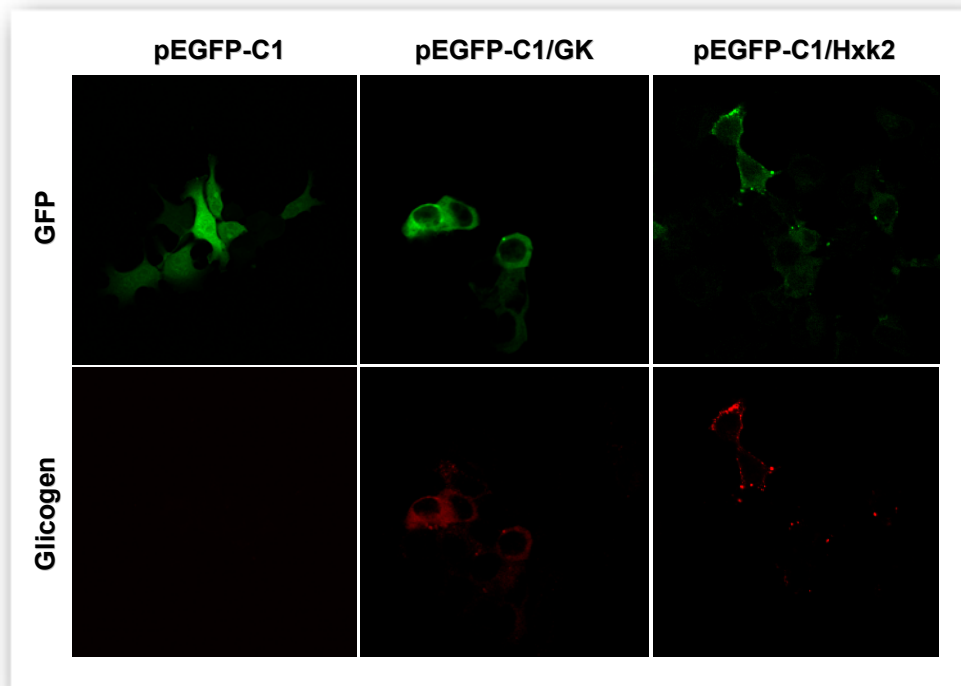


Figura 2.5 Síntesi de glicogen en FTO2B per expressió heteròloga d'hexoquinases. Per mitjà de la immunodetecció es mostra la capacitat d'acumular glicogen (canal vermell) de cèl·lules transfectades amb GFP, GK hepàtica de rata o Hxk2 de *Saccharomyces cerevisiae*. En el canal verd s'observa la localització subcel·lular de les proteïnes sobreexpressades.

2.2.1.2.3 Sobreexpressió d'HK1 i GK en FTO2B

Aquests darrers experiments suggereixen que la G6P sintetitzada per la GK no és imprescindible per activar l'LGS, però encara no havíem trobat cap condició en que l'HK1 induís la síntesi de glicogen. Per determinar si efectivament l'LGS discrimina entre la G6P produïda per l'HK1 o la GK, o que simplement requereix uns nivells de G6P per sobre d'un llindar determinat per activar-se, és necessari realitzar els experiments en les condicions on l'HK1 i la GK produeixen la mateixa quantitat de G6P.

Primer de tot però, calia saber si l'HK1 pot sintetitzar tanta G6P com la GK a pesar de la seva retroinhibició. Aquesta informació l'obtenim de l'estudi de l'equació cinètica de l'HK1.

A partir de les equacions cinètiques de l'HK1 podem establir com varia l'activitat hexoquinasa en funció de la concentració de G6P. L'equació de la figura 2.6.a defineix la magnitud de la inhibició de l'HK1 segons la relació de la velocitat de l'hexoquinasa en presència de G6P respecte a la velocitat de l'enzim sense inhibidor.

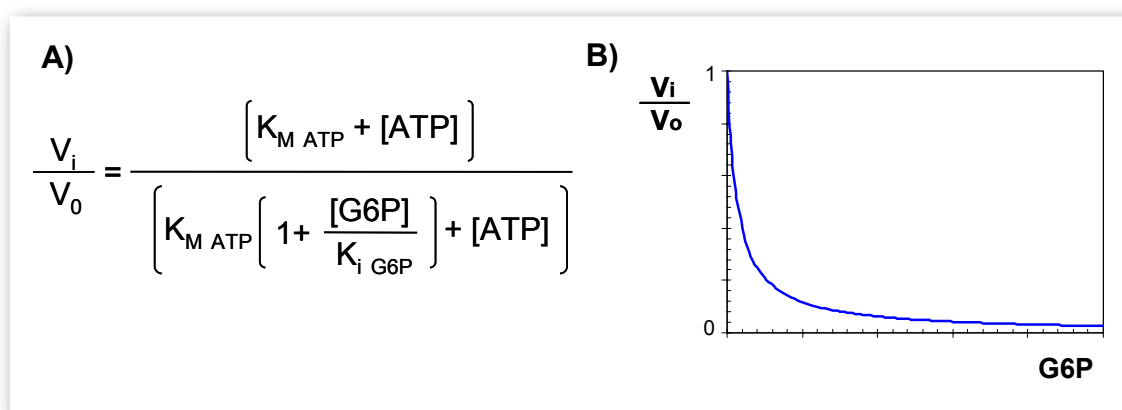


Figura 2.6 Relació teòrica de les activitats d'HK1 en presència o absència de G6P.
 A) Equació teòrica de les activitats sense inhibidor (V_0) o en presència de l'inhibidor (V_i).
 B) Representació de la relació V_i/V_0 en funció de la concentració de G6P.

Si introduïm a l'equació els valors de les diferents constants d'afinitat (Ardehali et al., 1999; Fang et al., 1998; Garfinkel et al., 1987; Zeng et al., 1996) i la concentració d'ATP (Burt et al., 1976) descrits a la literatura, obtenim un perfil (figura 2.6.b) on es pot observar com l'HK1 s'inhibeix ràpidament a concentracions baixes de G6P seguint un perfil hiperbòlic però paulatinament aquesta inhibició arriba a saturació.

Les equacions cinètiques ens orienten sobre el grau de sobreexpressió de l'HK1 necessari per compensar la seva retroinhibició a una concentració de G6P determinada.

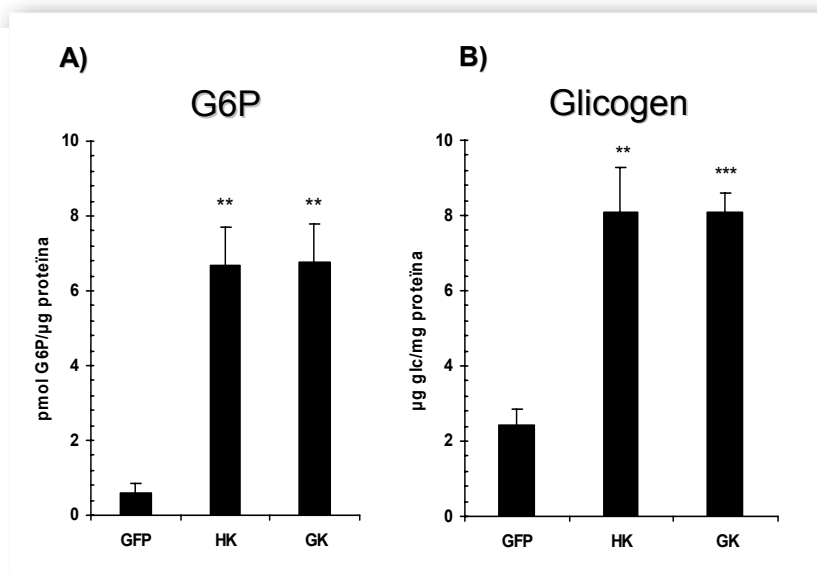
Així doncs, vam modificar els nivells d'HK1 i GK en FTO2B mitjançant dos adenovirus que codificaven per a l'HK1 i GK de rata. A fi i efecte de

confirmar les dosis de virus que ens havien de permetre obtenir els mateixos nivells de G6P en cèl·lules infectades tant amb HK1 com amb GK, vam fer una titulació dels virus, infectant FTO2B amb diverses dosis de virus i mesurant després la G6P. Buscant les millors condicions possibles per al nostre experiment, escollírem la dosi de virus amb la qual aconseguíem augmentar la G6P un ordre de magnitud respecte a les cèl·lules sense infectar. Per descartar que els efectes que poguéssim observar fossin deguts al trauma de la infecció vírica, vam infectar cèl·lules amb el virus que codificava per a la GFP com a control.

Dos dies post-infecció, i després d'una depleció de glucosa de setze hores, incubàrem les cèl·lules amb 10 mM glucosa durant quatre hores. Passat aquest temps, congelàrem sobtadament les plaques en nitrogen líquid per no perdre metabòlits. Tampoc les vam rentar amb tampó fosfat, perquè en els segons que dura el rentat, els cèl·lules encara estan vives i mantenen actius els fluxos metabòlics. Això seria una font d'artefactes perquè part de la G6P es consumiria i no podríem determinar correctament la seva concentració.

Les mesures de G6P de la figura 2.7.a corresponen als valors obtinguts en sis experiments independents. Els resultats indiquen que aconseguim igualar els nivells de G6P en les cèl·lules infectades amb HK1 o GK per sobre de la concentració en les cèl·lules control.

2.7 Quantificació de G6P i glicogen. Valors de A) G6P i B) glicogen en cèl·lules FTO2B que sobreexpressen GFP, HK1 o GK, incubades amb 10 mM glucosa. Les barres d'error indiquen la SEM. Significància respecte al control amb GFP:
** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



El punt clau el trobem en les mesures de glicogen (figura 2.7.b). En les condicions esmentades de concentració de glucosa i dosi de virus, les cèl·lules FTO2B produeixen la mateixa quantitat de glicogen independentment de si sobreexpressen HK1 o GK, i tres vegades més que les cèl·lules control infectades amb el virus que codifica per la GFP.

També s'observa que en les cèl·lules infectades amb HK1 o GK la GS transloca des del sobrenedant cap al pellet (taula 2.2).

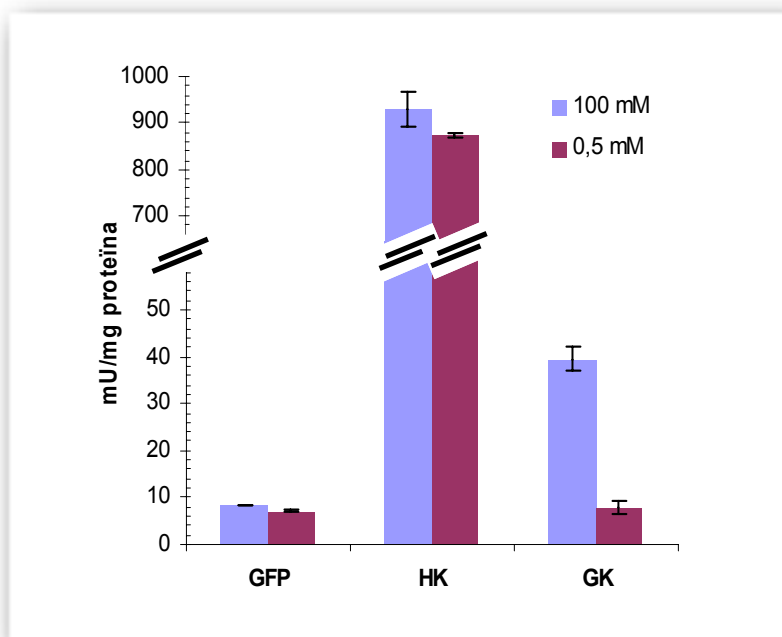
Aquests resultats ens demostren que l'HK1 pot promoure la síntesi de glicogen en FTO2B en la mateixa magnitud que ho fa la GK, i ens aclareix que per activar l'LGS es requereix G6P en quantitat elevades independentment del seu origen.

2.2.1.2.4 Activitat específica de HK1 i GK en FTO2B

Segons l'equació d'inhibició teòrica, en l'experiment anterior, l'activitat total d'HK1 (V_0) ha de ser més gran que la de GK per compensar la retroinhibició i que l'activitat residual (V_i) sigui suficient per assolir els mateixos nivells de G6P que amb la GK. Així la sobreexpressió d'HK1 en aquestes cèl·lules hauria de ser més elevada que la sobreexpressió de GK.

Per verificar aquest punt determinarem l'activitat hexoquinasa a 0,5 i 100 mM glucosa en extractes de cèl·lules FTO2B infectades amb les dosis de virus utilitzades a l'apartat 2.2.1.2.3. Les activitats ens demostren que tenim aproximadament trenta vegades més activitat fosforiladora de glucosa en les cèl·lules que sobreexpressen HK1 que en les que sobreexpressen GK (figura 2.8), i tot i així produeixen la mateixa G6P. Les activitats de les cèl·lules control infectades amb el virus de GFP ens permeten confirmar que les hexoquinases endògenes de les FTO2B són isoformes d'alta afinitat per glucosa. En l'assaig *in vitro* podem mesurar tota l'activitat d'HK1 perquè G6P no s'acumula i no pot inhibir l'enzim.

Figura 2.8 Activitat hexoquinasa. A 0,5 mM glucosa només detectem l'activitat corresponent a les hexoquinases d'alta afinitat (HK1, HK2, HK3). Amb 100 mM glucosa determinem l'activitat de totes les hexoquinases presents, inclosa la GK. Activitat expressada en mU/mg proteïna ± SEM.



A fi de determinar l'hexoquinasa present per un mètode alternatiu vam quantificar els nivells d'expressió per PCR quantitativa en temps real. Els nivells d'mRNA obtinguts per a cada enzim (taula 2.2), i els valors relatius de sobreexpressió concorden amb les dades d'activitat hexoquinasa total.

Taula 2.2

Mostra	Activitat Hexoquinasa ^(a)		mRNA ^(b)		% Activitat GS	
	0,5 mM	100 mM	HK1	GK	Súper	Pellet
GFP	7,0 ± 0,3	8,4 ± 0,1	1,00 ± 0,1	<i>n.d.</i> ^(c)	86,3	13,7
HK	872,9 ± 3,9	928,8 ± 38,0	1056,1 ± 118,0	<i>n.d.</i>	72,1	27,9
GK	7,7 ± 1,4	39,6 ± 2,4	1,5 ± 0,2	22,8 ± 3,5	73,3	26,7

(a) Activitat expressada en mU/mg proteïna ± SEM.
 (b) Unitats arbitràries ± SEM, normalitzat respecte a l'HK1 en la mostra GFP.
 (c) n.d., no detectat.

Aquests resultats demostren que la G6P produïda per la GK en FTO2B és tan efectiva promovent l'activació de la glicogen sintasa hepàtica i la deposició de glicogen com la G6P derivada de l'acció catalítica de l'HK1, però la GK és més eficient que l'HK1 a l'hora de sintetitzar la G6P necessària per activar l'LGS.

2.2.1.2.5 $M_{0,5}$ de les isoformes de glicogen sintasa respecte a la G6P.

Per a activar al·lostèricament l'LGS segons els experiments dels apartats precedents és necessari assolir uns nivells de G6P determinats que les cèl·lules FTO2B no assoleixen sense sobreexpressar HK1 o GK. Tanmateix cal explicar perquè l'MGS s'activa en cèl·lules FTO2B i sintetitza glicogen fins i tot sense la sobreexpressió de cap isoforma d'hexoquinasa (Gomis et al., 2002).

Amb l'objectiu d'esbrinar perquè l'LGS i l'MGS es comporten de forma diferent en les mateixes condicions de G6P vam procedir a determinar l'afinitat d'ambdues isoformes de glicogen sintasa respecte l'activador al·lostèric, és a dir, a quantificar la concentració de G6P necessària per a que la GS assoleixi la meitat de l'activació màxima de la GS ($M_{0,5}$). L' $M_{0,5}$ s'estima a partir de les representacions Hill de les activitats enzimàtiques mesurades a diferents concentracions de l'efector.

Vam determinar l'activitat GS d'homogenats de cèl·lules FTO2B infectades amb els virus que codifiquen per a l'LGS de rata o l'MGS humana. Aquestes mesures d'activitat es van dur a terme a concentració constant d'UDP-glucosa i a diferents concentracions de G6P.

Primer de tot inferim la velocitat màxima (V_{max}) de cada enzim a partir del pendent de la representació d'Eadie-Hoffstee de les velocitats determinades (figura 2.9.a). Un cop coneixem la V_{max} , l'utilitzem en els càlculs de l'equació de Hill (figura 2.9.b) i de la intersecció amb l'eix d'abscisses obtenim el logaritme del valor d' $M_{0,5}$.

Els resultats indiquen que la $M_{0,5}$ de la isoforma hepàtica per la G6P és més gran que la de la isoforma muscular i això suggereix que l'LGS necessita una major concentració de G6P per assolir el mateix nivell d'activació que la isoforma muscular de la glicogen sintasa.

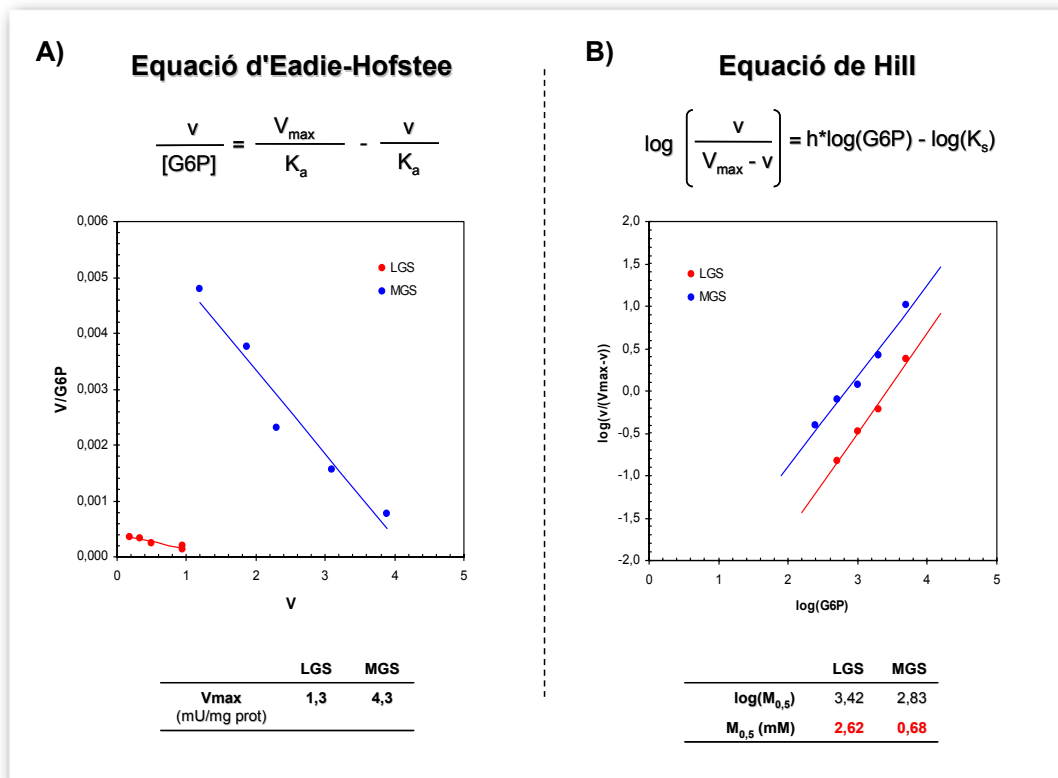


Figura 2.9 Determinació de la $M_{0,5}$ per la G6P de LGS i MGS. A partir de les dades d'activitat GS a concentracions de G6P variables i UDP-glucosa constant a 0,2 mM, determinem la concentració de G6P que activa la GS a la meitat de l'activació màxima en dos passos: A) equació d'Eadie-Hofstee per esbrinar la V_{max} i B) Representació de Hill d'on obtenim el valor d' $M_{0,5}$ per cada isoforma de la GS (destacats en vermell).

2.2.2 Efecte dels nucleòtids d'adenina sobre el metabolisme del glicogen

Fins aquí ens havíem concentrat en l'efecte al·lostèric de la G6P sobre l'LGS, però no podíem deixar al marge l'altre substrat de l'HK1 i la GK: l'ATP, que a més és un potent inhibidor de la GS.

Aquest interès es deu a que l'HK1 i la GK empren ATP en localitzacions diferents per fosforilar la glucosa. La GK utilitza l'ATP citosòlic, mentre que l'HK1, des de la seva posició privilegiada en la mitocondria, té preferència per l'ATP que prové de l'organel·la a través del canal VDAC.

Aquest ús de les fonts d'ATP podria crear un desbalanç en la concentració d'ADP en el citosol. La GK allibera ADP al citosol però el produït

per l'HK1 pot ser ràpidament internalitzat per completar la fosforilació oxidativa (BeltrandelRio & Wilson, 1992a). Segons aquest mecanisme, només l'activitat de la GK podria incrementar el nivells d'ADP citosòlics i de retruc també els d'AMP gràcies a l'acció de l'AMP quinasa. El desequilibri en la relació ATP/ADP o ATP/AMP podria ser responsable d'una acció al·lostèrica sobre l'LGS. Aquesta idea entronca amb estudis realitzats en el nostre laboratori, on es demostra un efecte de l'AMP en l'activació de l'LGS (Carabaza et al., 1990).

Per estudiar si l'HK1 o la GK produïen un desbalanç en els nucleòtids d'adenosina que tingués efecte sobre l'LGS vam infectar FTO2B amb els adenovirus de HK1 o GK i ajustàrem les condicions per aconseguir nivells similars de G6P, així ens asseguràvem que qualsevol diferència que observéssim no era deguda a l'efecte de la G6P. Com a control portàvem cèl·lules sense infectar.

La identificació i quantificació dels nucleòtids es va fer per HPLC, amb una columna de fase reversa. Vam preparar patrons de totes les molècules responsables dels màxims d'absorbància més representatius (figura 2.10).

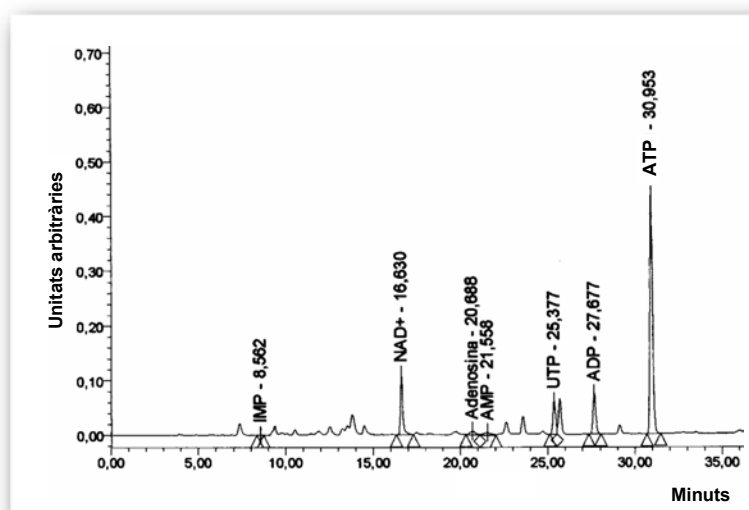


Figura 2.10 Cromatograma. Les cèl·lules FTO2B es maten amb àcid perclòric i l'extracte neutralitzat amb carbonat s'aplica a una columna d'HPLC de fase reversa. Les molècules es separen en funció de la seva polaritat. Les molècules polars són les més retingudes. En el cromatograma representa la quantitat de cada producte respecte el temps de retenció. L'àrea de cada pic és proporcional a la concentració de la molècula.

Això ens va permetre quantificar els nucleòtids presents en extractes de cèl·lules FTO2B incubades amb glucosa. Els resultats obtinguts que es mostren en la figura 2.11 suggereixen que la fosforilació de glucosa per HK1 o GK no genera diferències significatives en els nivells cel·lulars d'ATP, ADP, o fins i tot NAD^+ . Cal destacar el fet que les cèl·lules infectades amb els virus d'HK1 o GK tot i tenir uns nivells de G6P unes sis vegades superiores respecte a les cèl·lules control, no varien els seus nivells d'ATP sensiblement.

Només s'observa un increment significatiu de l'AMP, probablement fruit

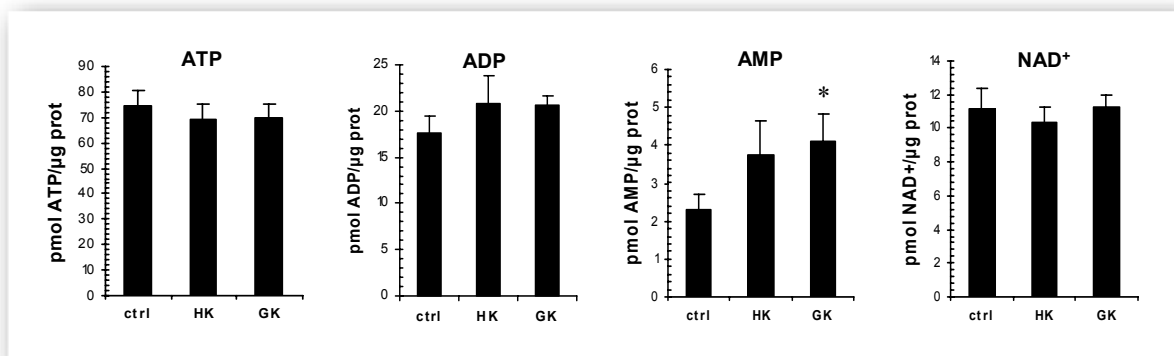


Figura 2.11 Concentració de nucleòtids en les cèl·lules FTO2B. Les cèl·lules control i les infectades amb els virus que codifiquen per a l'HK1 o GK s'incuben amb glucosa 10 mM durant dues hores. El contingut de nucleòtids d'aquestes cèl·lules es determina per cromatografia HPLC. Les barres d'error indiquen la SEM. Significància respecte al control: * $p < 0,05$.

de la interconversió de dues molècules d'ADP catalitzada per l'AMP pirofosforilasa per regenerar ATP segons la reacció: $2\text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$. Però malgrat que les dues isoformes d'hexoquinasa modifiquen els nivells d'AMP respecte el control, ambdues alteren la concentració del nucleòtid en la mateixa proporció i per tant no pot tenir un paper en les diferències d'eficiència d'ambdós enzims.

Aquests resultats ens indiquen que les accions catalítiques de l'HK1 o la GK no alteren els nivells de nucleòtids cel·lulars de forma diferent entre elles i ens permeten descartar la possibilitat de que els nivells d'ATP o derivats siguin responsables de les diferències en la eficàcia de l'HK1 o la GK per induir l'activació de l'LGS a través de la G6P.

2.2.3 Activació covalent de l'LGS en FTO2B.

La glicogen sintasa s'activa al·lostèricament per G6P i de forma covalent per desfosforilació. El vincle entre els dos tipus d'activació és que la presència de G6P afavoreix la desfosforilació de l'enzim.

En els experiments dels apartats anteriors hem augmentat la concentració de G6P sense modificar ni l'activitat ni els nivells del enzims implicats en la desfosforilació de la GS. D'aquesta manera s'ha aconseguit activar l'LGS i induir la síntesi de glicogen però desconeixem si l'activació al·lostèrica és necessària per a que es produeixi l'activació covalent, és a dir, si hi ha un ordre seqüencial en els mecanismes d'activació de tal forma que la desfosforilació de l'enzim requereix una activació al·lostèrica prèvia.

Les cèl·lules FTO2B se'ns presenten com el model ideal on estudiar si l'activació al·lostèrica prèvia és necessària per induir l'activació covalent. La qüestió és si potenciant la desfosforilació de l'LGS sense augmentar la G6P, es produirà l'activació de l'LGS.

Un dels mecanismes per desfosforilar l'LGS consisteix en sobreexpressar les subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa que dirigeixen la PP2a cap al glicogen i regulen la seva interacció amb l'LGS. Les subunitats que realitzen aquesta tasca en fetge són la PTG i la G_L (gens *ppp1r3c* i *ppp1r3b*, respectivament). Aquestes proteïnes les vam sobreexpressar en FTO2B per transfecció dels respectius vectors de fusió a GFP. Després de la incubació amb glucosa vam determinar la presència de glicogen per immunocitoquímica.

La figura 2.12 mostra com les cèl·lules FTO2B que només expressen la GFP no són positives pel marcatge específic de glicogen, en canvi totes les cèl·lules transfectades tant amb la construcció de PTG com amb la de G_L acumulen glicogen. En apartats anteriors hem vist que la G6P que acumulen les FTO2B amb les hexoquinases endògenes no és suficient per activar l'LGS, per tant l'activació que s'observa és deguda a l'acció neta de la PTG i la G_L .

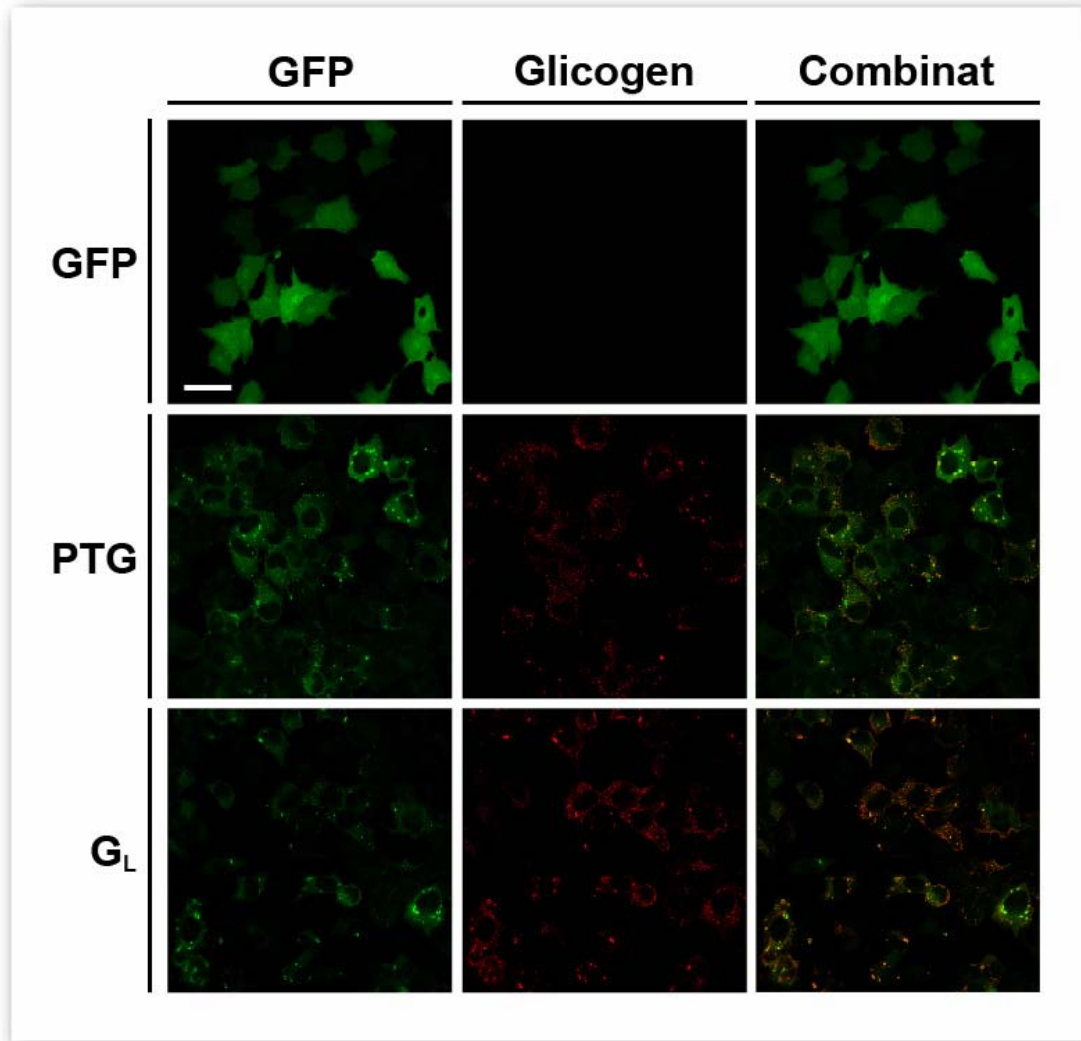


Figura 12. Sobreexpressió de les subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa. S'analitza la síntesi de glicogen per mitjà de la immunodetecció amb un anticòs específic en cèl·lules FTO2B transfectades amb les construccions GFP, GFP-PTG o GFP-GL i incubades amb glucosa 25 mM durant quatre hores. En verd s'observa la fluorescència de la GFP i en vermell la corresponent al marcatge de glicogen. La barra blanca representa 50 μ m.

Així doncs aconseguim disparar la síntesi de glicogen mantenint la G6P constant i dirigint l'activitat fosfatasa de la cèl·lula cap als dipòsits de glicogen. Aquests resultats suggereixen que l'activació covalent de la GS es veu potenciada per la sobreexpressió de les subunitats reguladores de la fosfatasa i que pot compensar els casos on la concentració de l'activador al·lostèric és baixa.

2.3 DISCUSSIÓ

La glucosa entra a la cèl·lula i és fosforilada a G6P. Aquest intermediari pot aprofitar-se com a substrat en diverses vies metabòliques, doncs pot anar cap a la via de les pentoses fosfat, entrar a la glucòlisi o emprar-se per a la síntesi de glicogen. Què determina el destí de la glucosa, com s'escull el procés cel·lular al qual es destinarà?

Per fer glicogen cal activar la glicogen sintasa. Cal remarcar aquesta afirmació perquè la glicogen sintasa catalitza la etapa limitant del procés de síntesi de glicogen (Gomis et al., 2000) i és un enzim altament regulat, no n'hi ha prou en tenir substrat disponible per activar-la. La cèl·lula ha d'assegurar el subministre de glucosa per a la glucòlisi i el metabolisme energètic abans de poder desviar el flux de glucosa cap a la síntesi de glicogen.

Una de les hipòtesis que tradicionalment es planteja per entendre com la cèl·lula decideix el destí de la glucosa és que aquesta distinció entre la via glucolítica o la glicogenogènica s'aconsegueix a través dels isoenzims d'hexoquinasa (Ureta & Radojkovic, 1987). Segons aquesta hipòtesi, l'isoenzim que fosforila la glucosa determina la via a la qual es destina la glucosa. Això concorda amb el que s'observa en FTO2B: l'activitat de les hexoquinases endògenes dirigeixen la glucosa vers la glucòlisi, però si infectem les cèl·lules amb glucoquinasa, part del flux es destina a la síntesi de glicogen.

Un dels models compatibles amb aquestes dades es fonamenta en un mecanisme de compartimentalització de la G6P, o de canalització del flux a través de complexos multienzimàtics, tal i com està descrit per altres etapes (Maier et al., 2006; Srere & Ovadi, 1990). Segons aquest model es podria postular que des del punt de vista de la eficiència de síntesi de glicogen la G6P producte de la GK és "millor" que la de l'HK1 perquè es produeix en una zona de la cèl·lula accessible a l'LGS. O alternativament, que la G6P de l'HK1 es sintetitza en un lloc massa proper a d'altres enzims que ràpidament la metabolitzen i la dirigeixen a la glucòlisi.

Per tant, la idea de la compartimentalització de la G6P fou la que es va considerar en un primer moment per explicar les diferències entre la G6P sintetitzada per l'HK1 o la GK a l'hora d'activar al·lostèricament la isoforma hepàtica de la GS. L'associació entre la localització subcel·lular de les hexoquinases i la seva capacitat per disparar la síntesi de glicogen suggeria que aquesta hipòtesi era factible.

Per això vam dissenyar una sèrie d'experiments independents amb l'objectiu de d'alliberar l'HK1 de la mitocondria. La hipòtesi de partida consistia en que l'HK1, un cop en el citosol, produiria G6P en una regió accessible per l'LGS i l'activaria al·lostèricament. Tanmateix, ni les drogues que alliberen l'enzim ni l'ús de mutants d'HK1 que no s'associen amb el mitocondri indueixen la síntesi de glicogen en les FTO2B.

Així doncs, malgrat els indicis inicials, aquests resultats indiquen que la localització dels isoenzims no influeix sobre l'aparent compartimentalització de la G6P i la seva eficiència a l'hora d'activar l'LGS.

L'HK1 i la GK es diferencien per la seva localització subcel·lular, però també per la retroinhibició. Aquestes característiques cinètiques indiquen que en condicions fisiològiques l'HK1 no pot sintetitzar concentracions tan elevades de G6P com la GK. A fi d'estudiar la influència de la retroinhibició en la capacitat de la hexoquinasa per induir l'acumulació de glicogen vam analitzar la ScHxk2, una hexoquinasa d'alta afinitat però sense inhibició per G6P. Els resultats obtinguts demostren que la ScHxk2 és tant bona promovent la síntesi de glicogen com la GK. A més, el fet que un enzim heteròleg d'un organisme tan distant com el llevat és capaç de complementar la funció de la GK en cèl·lules de mamífers també suggereix que no hi ha cap complex o interacció entre proteïnes.

Cal destacar que l'experiment invers també funciona (Mayordomo & Sanz, 2001), és a dir, la GK pancreàtica de mamífers és capaç de complementar les funcions bioquímiques i de regulació gènica que realitza la Hxk2 en llevat.

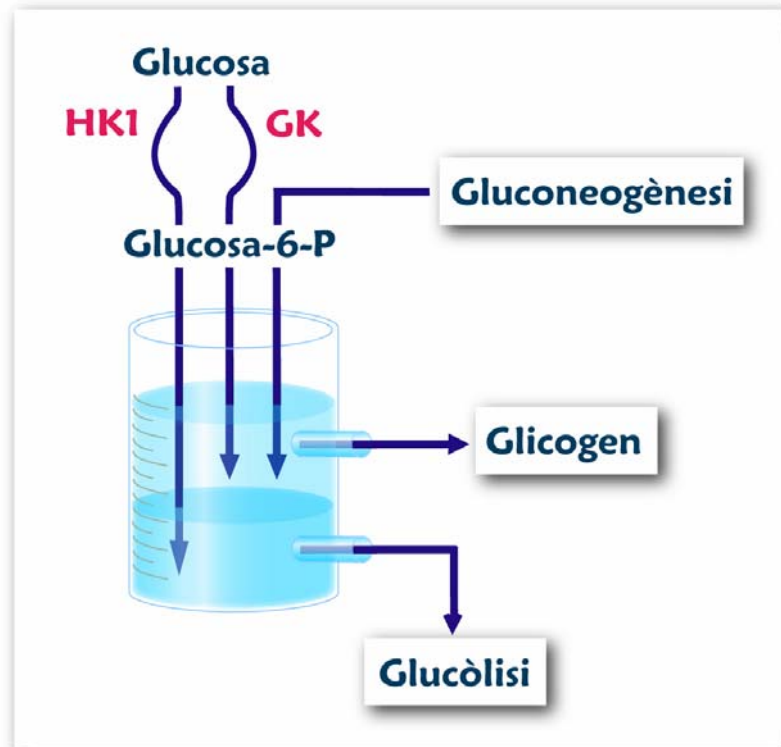
Així doncs, la inhibició per excés de producte condiona l'eficiència de l'HK1 en condicions fisiològiques, però l'anàlisi acurat de les equacions cinètiques demostra que no hi ha una limitació catalítica per sintetitzar concentracions elevades de G6P amb l'HK1. Aquestes dades teòriques indiquen que incrementant els nivells d'expressió de l'HK1 podem assolir un nivell d'activitat residual amb el qual es produeixi tanta G6P com amb la GK, a pesar de la retroinhibició de l'enzim. Els adenovirus ens permeten modular amb precisió els nivells d'expressió de l'HK1. Augmentant la dosi de virus sobreexpressem l'HK1 fins a igualar la concentració de G6P amb la que produeix una quantitat mínima de GK. En aquesta situació les cèl·lules FTO2B infectades acumulen glicogen independentment de l'isoforma d'hexoquinasa que sobreexpressem.

Aquests experiments ens obren les portes a entendre l'essència del mecanisme que regeix el control per metabòlits de la síntesi de glicogen.

A la llum d'aquests resultats aparentment no existeix cap tipus de compartimentalització de la G6P ni els isoenzims de l'hexoquinasa canalitzen el flux de la primera etapa obligada de la glucòlisi. L'explicació que proposem és més neta i senzilla: l'utilització de la glucosa depèn de la seva disponibilitat i de la concentració de G6P que s'assoleix. En un sistema obert, com el citosol de la cèl·lula, és difícil isolar metabòlits en compartiments estancs. És més senzill regular l'afinitat dels enzims relativa a aquest metabòlit. Vist des de fora, l'efecte que s'aconsegueix és el mateix.

Si considerem el sistema com una caixa negra, un observador extern veurà que l'LGS s'activa més quan hi ha GK que amb l'HK1 endògena i pot arribar a la conclusió de que hi ha algun tipus d'interacció entre proteïnes o de canalització de G6P per evitar que l'LGS entri en contacte amb la G6P procedent de l'HK1. En canvi els nostres resultats són compatibles amb un altre mecanisme. Segons el nostre model fins que la G6P no assolix uns nivells elevats, l'LGS és insensible i cega a la G6P circulant. Aquest llindar de G6P és més fàcil d'aconseguir mitjançant l'acció catalítica de la GK o a partir de substrats gluconeogènics (figura 2.13) (Gomis et al., 2003) que per l'HK1 degut a la retroinhibició per G6P de l'HK1.

Figura 2.13 Reservori de G6P Diagrama esquemàtic que il·lustra com un únic compartiment de G6P pot explicar les diferències en el destí d'aquest metabòlit en funció del seu origen.



El fonament molecular d'aquest comportament es posa de manifest quan analitzem la concentració de G6P necessària per assolir la meitat d'activitat en les isoformes de glicogen sintasa respecte la G6P. La $M_{0,5}$ de la GS hepàtica per la G6P és alta que la de la isoforma muscular. Així, en les cèl·lules FTO2B que només tenen la dotació endògena d'hexoquinases, la concentració de G6P que hem determinat és suficient per activar la GS muscular però en canvi està per sota del valor $M_{0,5}$ de la GS hepàtica, que resta inactiva. Els avantatges evolutius i adaptatius d'aquest mecanisme seran objecte d'estudi en els següents capítols.

D'altra banda l'activació de l'LGS per desfosforilació induïda per les subunitats reguladores de la fosfatasa no s'ha d'entendre com un mecanisme independent de l'activació al·lostèrica, ans al contrari, els dos processos estan íntimament relacionats. Experiments *in vitro* demostren que la G6P, part del seu efecte al·lostèric, converteix a la GS en un enzim més susceptible a la desfosforilació i activació covalent per l'acció de les fosfataxes. Això succeeix probablement a través d'un canvi conformacional i de manera proporcional a la concentració de G6P (Villar-Palasi, 1991).

Aparentment la sobreexpressió de PTG o G_L per si sola ja és suficient per activar la síntesi de glicogen, i no depèn de la concentració de G6P. Però això una vegada més es pot explicar des d'un punt de vista diferent: tot és un joc d'equilibris, de l'afinitat de l'LGS per la G6P però també de la velocitat de desfosforilació de l'LGS per part de les fosfatases. I aquest és el nexce en comú d'ambdós mecanismes. Que l'LGS s'activi significa que es redueix la seva K_m per la UDP-glucosa, el seu substrat. Això s'aconsegueix gràcies a que la G6P converteix l'LGS en millor substrat del complex format per les proteïnes reguladores i les fosfatases, i l'LGS en estat desfosforilat és més afí per la UDP-glucosa.

L'activació de la GS té un component al·lostèric i un de covalent. En un entorn amb poca activitat fosfatasa sobre la GS, l'increment de la concentració de G6P facilita la desfosforilació i l'activació de l'enzim. En canvi, en un ambient amb G6P baixa, cal augmentar la capacitat fosfatasa perquè sense el canvi conformacional induït per G6P, la desfosforilació serà ineficient i no hi haurà activació de la GS (figura 2.14)..

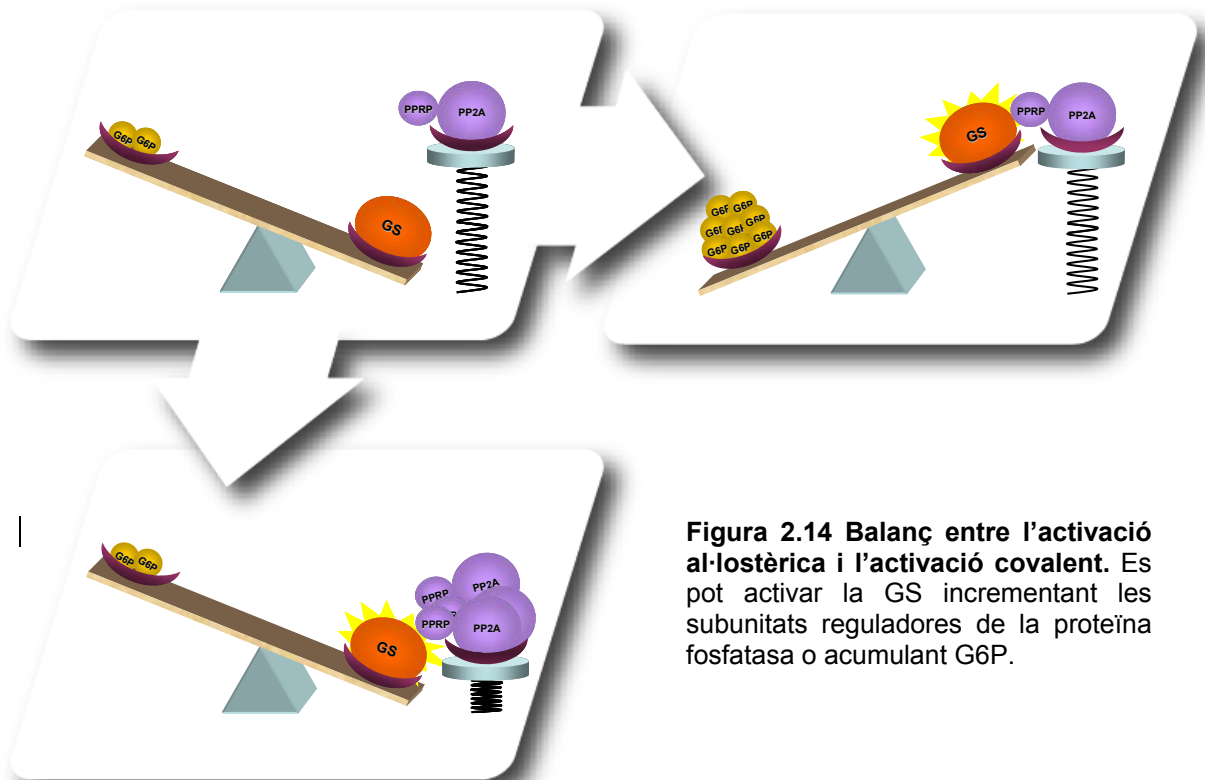


Figura 2.14 Balanç entre l'activació al·lostèrica i l'activació covalent. Es pot activar la GS incrementant les subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa o acumulant G6P.

Recentment s'ha descrit un fenomen adaptatiu similar en ratolins deficients pel transportador de glucosa GLUT4. Aquests ratolins, tot i tenir l'entrada de glucosa a la cèl·lula muscular notablement reduïda, acumulen més glicogen que els ratolins controls, gràcies a una sèrie d'adaptacions metabòliques. Entre elles destaca el fet que expressen cinc vegades més HK2 i que les subunitats reguladores de la PP1 en múscul, PTG i G_M , es sobreexpressen quatre cops més respecte als controls (Kim et al., 2005).

La cèl·lula és un sistema complex que evita els extrems, i aconsegueix un control estricte del metabolisme del glicogen gràcies a uns mecanismes d'activació al·lostèrica regulats per uns intermediaris esquisidament balancejats.