

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

Vaig vèncer, però també hauria pogut perdre. Els altres em van creure savi perquè vaig guanyar però no coneixien molts casos en què he estat neci perquè he perdut, i no sabien que, segons abans de guanyar, no estava segur de no haver perdut.

Quart dia, vespres.

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

CAPÍTOL 4: ESTUDI DEL METABOLISME DEL GLICOGEN HEPÀTIC EN EMBRIONS DE RATOLÍ.

4.1 INTRODUCCIÓ

El paper fonamental del glicogen com a magatzem d'energia ha estat abundantment comentat al llarg d'aquesta memòria. És ben conegut que en períodes de dejuni o d'esforç físic el glicogen hepàtic és una font de glucosa per a la resta de teixits. Però una altra situació que no hem considerat fins ara i en la qual el glicogen juga un paper crucial és en el moment del naixement.

Les cries de mamífer abandonen al néixer el subministrament assegurat d'aliment que representa la placenta i llavors passen a dependre exclusivament de les seves reserves energètiques fins que aconseguen mamar per primer cop. Aquestes reserves són acumulades pel fetge embrionari durant la gestació bàsicament en forma de glicogen degut a que la dieta que reben *in utero* és molt rica en carbohidrats però pobre en greixos (Battaglia & Meschia, 1978), i a que només certes espècies (humans, ovelles i conills) poden transportar els àcids grassos a través de la placenta i utilitzar-los en el període postnatal (Hershfield & Nemeth, 1968; Novak et al., 1964; Van Duyne, 1965).

Els neonats mobilitzen ràpidament les reserves de glicogen en aquest període vital que va des del naixement fins que ingereixen el primer aliment (Ballard & Oliver, 1963; Dawkins, 1963), a fi de respondre a les necessitats de glucosa del cervell o dels eritròcits (Jones & Rolph, 1985). Però els dipòsits de glicogen s'esgoten a les poques hores de néixer i a partir d'aquest punt les cries depenen de la llet materna com a única font regular de glucosa i substrats per a la gluconeogènesi (Shelley, 1964). Aquest moment de transició suposa per als neonats el risc de morir d'hipoglicèmia.

Girard, Postic i col·laboradors han descrit detalladament el metabolisme de la glucosa perinatal, utilitzant les rates com a organisme model. Un aspecte interessant del metabolisme de la glucosa en embrions és la particularitat de

que el fetges en desenvolupament no expressen GK, i no ho fan fins molt després del naixement (Iynedjian et al., 1987; Postic et al., 1994). Concretament, la GK comença a expressar-se en el fetge de les rates quan les cries són deslletades i comencen la ingesta de menjar sòlid.

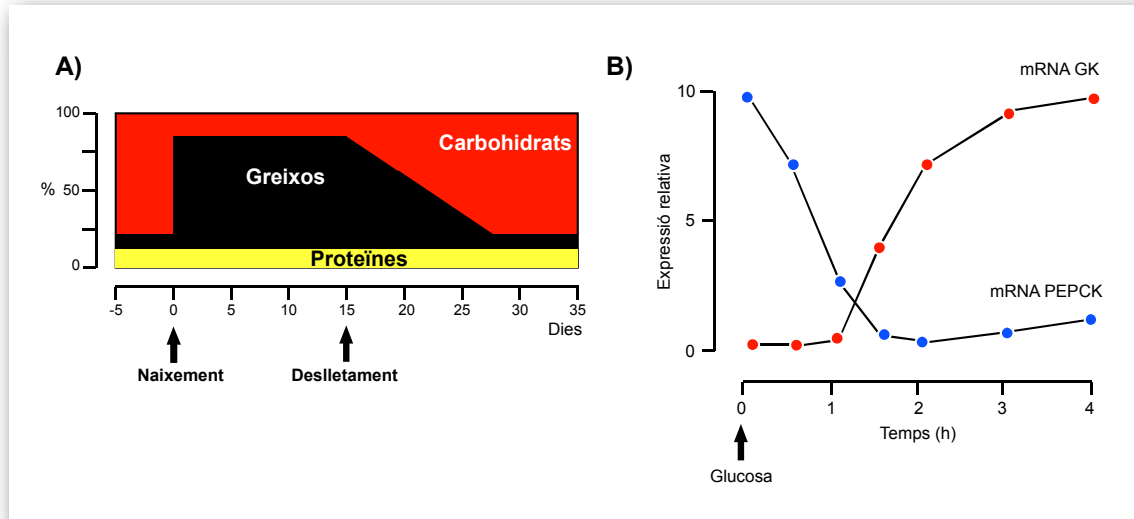


Figura 4.1 A) Composició nutricional de la dieta dels ratolins al llarg del desenvolupament. B) Inducció de l'expressió de GK per insulina.

Això és degut a que el promotor de la GK hepàtica és molt dependent d'insulina (Narkewicz et al., 1990), i la dieta a base de llet, rica en greixos (Jenness, 1974), no estimula la secreció d'insulina (figura 4.1.a). Un cop les cries són deslletades, canvien a una dieta rica en carbohidrats, que aquesta sí estimularà la d'insulina i en poques hores l'expressió de la GK assolirà nivells de fetge adult.

Un exemple de fins a quin punt la dieta afecta aquest procés el tenim en que si a una cria acabaad de néixer li administrem glucosa oral, en poques hores observem la mateixa inducció de GK que veuríem normalment al cap d'unes setmanes al deslletar-la (figura 4.1.b) (Girard et al., 1992; Perdereau et al., 1990).

Altres peculiaritats descrites del fetge prenatal és que expressa HK1 i HK2 (Postic et al., 1994), les hexoquinases majoritàries en cervell i múscul respectivament, així com el transportador d'alta afinitat GLUT1, també

majoritari a cervell. En els primers dies després del naixement el GLUT2 reemplaça al GLUT1 com a transportador de glucosa hepàtic.

Entendre com el fetge d'embrió de ratolí sintetitza glicogen en absència de GK és l'objectiu d'estudi d'aquest capítol.

4.2 RESULTATS

4.2.1 Caracterització bioquímica del fetge d'embrió E16 de ratolí.

El nostre model d'estudi van ser els fetges d'embrions de ratolí de setze dies post-concepció (E16). El període de gestació dels ratolins dura 20 dies i el màxim d'acumulació de glicogen es produeix 24-48 hores abans del naixement, per tant la finalitat de treballar amb embrions de 16 dies de gestació era estudiar com el fetge embrionari en desenvolupament es preparava per acumular les reserves de glicogen.

Com a mostra de referència dels paràmetres hepàtics que volíem mesurar empràrem els fetges de les corresponents mares gestants. D'aquesta forma aconseguíem una homogeneïtat en l'estat metabòlic dels fetges que ens reduïa la variabilitat en les determinacions posteriors.

Abans d'abordar l'objectiu principal d'entendre com els embrions sintetitzaven glicogen en absència de GK, calia caracteritzar els fetges de ratolins E16 per confirmar que tenen característiques similars als embrions de rata estudiats en treballs mencionats anteriorment. Aquesta caracterització va consistir en quantificar el glicogen i la G6P, així com determinar la presència de HK1, HK2 i GK.

4.2.1.1 Quantificació de glicogen i G6P.

Les femelles gestants van ser sacrificades per desnucament 16 dies després de l'acoblament, i a continuació vam extreure els embrions. El sacrifici es feia després de que els animals haguessin menjat *ad libitum* durant la nit,

sempre entre les 10 i les 11 hores del matí per evitar variabilitat. A partir d'homogenats totals de fetges de ratolins E16 i adults quantificàrem el contingut de glicogen i G6P.

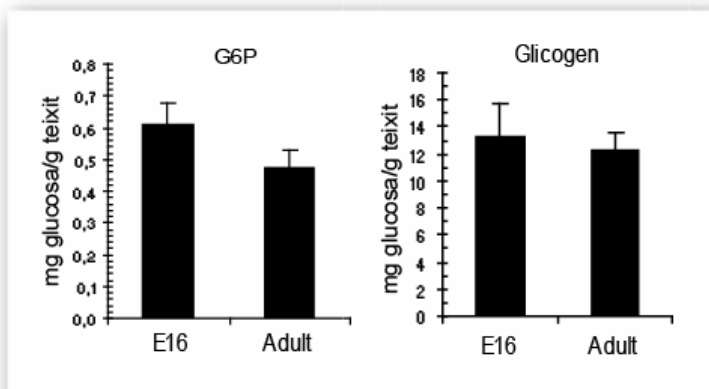
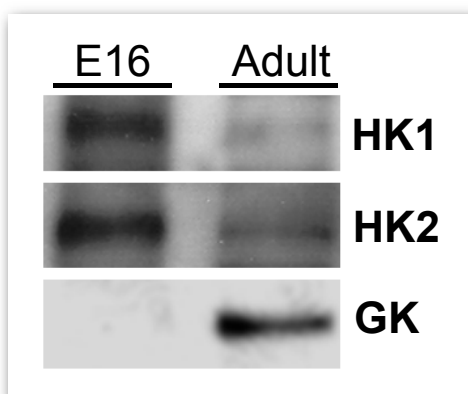


Figura 4.2 Quantificació dels nivells de G6P i glicogen en fetges de ratolins embrionaris i adults. Els nivells dels metabòlits es quantifiquen a partir d'extractes de teixit fresc per un mètode espectrofotomètric.

La figura 4.2 ens mostra que els continguts d'ambdós metabòlits no difereixen significativament entre els fetges de mares post-pandrials i els corresponents embrions i ens confirmava que els embrions E16 tenen el metabolisme del glicogen actiu i funcional.

4.2.1.2 Immunodetecció de GK, HK1 i HK2.

Extractes dels mateixos fetges ens van servir per estudiar la presència de HK1 i GK mitjançant immunodetecció Western. El patró de bandes observat



per immunodetecció (figura 4.3) confirma la presència de GK exclusivament en fetge adult, mentre que les hexoquinases de tipus 1 i 2 s'expressen més en embrions. Aquests resultats posen de relleu les diferències en el metabolisme del glicogen en fetges de ratolí embrionari i adult.

Figura 4.3 Immunodetecció Western dels isoenzims d'hexoquinasa en extractes de fetge de ratolí. Les HK1 i HK2 es detecten en els sobrenedants que resulten d'extreure amb Tween-20 els pellets d'homogenats de fetge. La GK es detecta a partir d'homogenats totals d'extractes de fetges embrionari i adult.

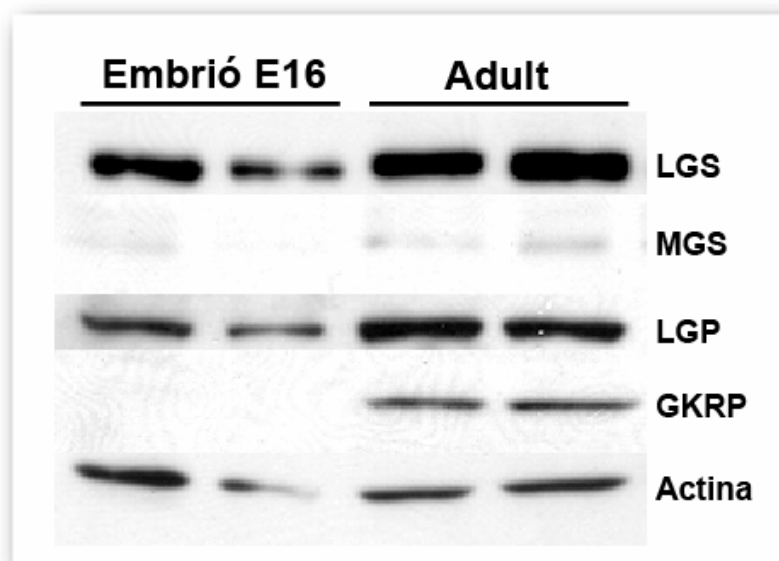
4.2.1.3 Identificació de la isoforma de GS expressada en fetge embrionari.

Gràcies a la recerca bàsica desenvolupada en els capítols anteriors, estàvem en condicions d'hipotetitzar mecanismes pels quals els fetges d'embrions podien sintetitzar glicogen en absència total de GK. Només calia activar la GS, i això es podria aconseguir o bé elevant molt els nivells de G6P o expressant una GS amb molta afinitat per la G6P. S'obrien dues hipòtesis de treball:

- ▶ El fetges en desenvolupament expressarien la isoforma muscular de la GS, capaç de treballar en conjunció amb l'HK1 en altres teixits com el cervell perquè és més sensible a la G6P.
- ▶ Les subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa com la PTG, G_L o G_M es sobreexpressen en els fetges embrionaris i això promou l'activació de l'LGS.
- ▶ Els nivells d'expressió de l'HK1 serien tan elevats que malgrat la inhibició per producte, aconseguirien augmentar la G6P fins a unes cotes equivalents a les que s'aconsegueix en un fetge adult amb GK, unes concentracions prou elevades per activar la GS hepàtica.

Testar la primera hipòtesi requeria identificar la isoforma de GS que expressaven els fetges E16. Un cop més vàrem recórrer a la immunodetecció *Western* per a la identificació de les isoformes majoritàries en fetge d'embrió.

Figura 4.4 Immunodetecció Western d'extractes de fetge. Homogenats totals d'extractes de dos fetges embrionaris i dos adults independents.



La figura 4.4 indica que la isoforma hepàtica de la GS és la majoritària en fetges d'embrions i adults, i assoleix uns nivells d'expressió similars en ambdós tipus de fetge. La detecció residual de la isoforma muscular no permet asseverar que també s'expressi en fetge perquè les mostres no provenen d'un cultiu pur d'hepatòcits, ans al contrari, són un extracte de teixit heterogeni i el senyal podria venir de restes de teixit vascular, connectiu o fins i tot sang. També determinem que la glicogen fosforilasa que expressen els embrions E16 en el fetge és la isoforma hepàtica. El fet que no es detecti l'expressió de GKRP en els embrions podria estar relacionat amb que en aquests fetges tampoc s'expressa la glucoquinasa, l'enzim amb el que interacciona. L'activitat GS present en el súper representa el 60-70% del total en ambdós tipus de fetge.

El conjunt d'aquests resultats ens decanten envers la segona hipòtesi.

4.2.1.4 Quantificació dels nivells d'expressió de les hexoquinases.

L'opció que perfilen aquests resultats implica que els fetges en desenvolupament acumulen els alts nivells de G6P que requereix l'activació de l'LGS mitjançant la sobreexpressió d'hexoquinases d'alta afinitat. Aquesta hipòtesi sembla plausible després dels resultats obtinguts en el capítol 2 amb adenovirus recombinants.

Així doncs calia quantificar els nivells d'expressió de les diferents hexoquinases i analitzar el patró d'expressió en embrions i adults. Per comparar l'expressió relativa d'un enzim en dues mostres diferents vàrem recórrer a la tècnica de la PCR Quantitativa en Temps Real (QRT-PCR).

En aquest assaig quantifiquem el contingut de l'mRNA de cada enzim amb una sonda específica i les diferències observades per QRT-PCR són directament proporcionals a les diferències reals d'expressió dels gens d'interès.

Vàrem quantificar els nivells d'mRNA de HK1, HK2 i GK, en fetges d'embrió E16 i adult. Els resultats es resumeixen gràficament en la figura 4.5. No només confirmem els resultats obtinguts per Western que indicaven que en fetge E16 no es detecta GK sinó que demostràvem que en relació al fetge adult, el fetge dels embrions expressava una quantitat inusualment elevada d'HK1 i també d'HK2.

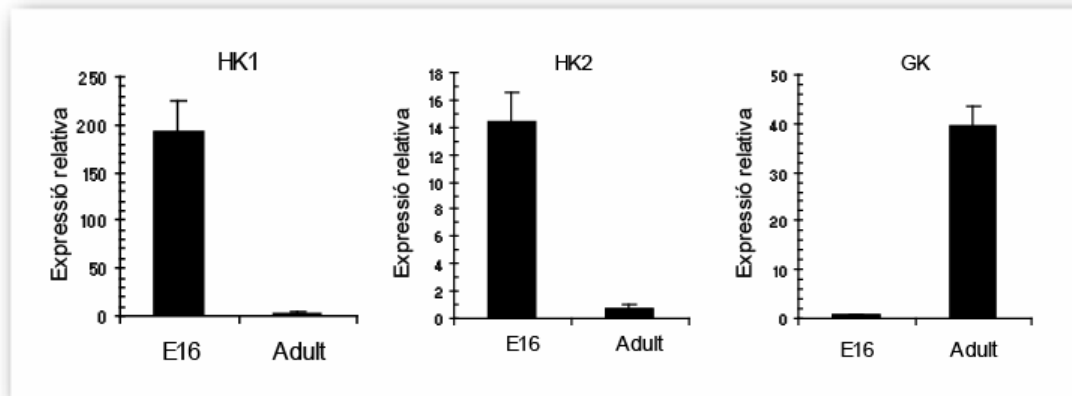


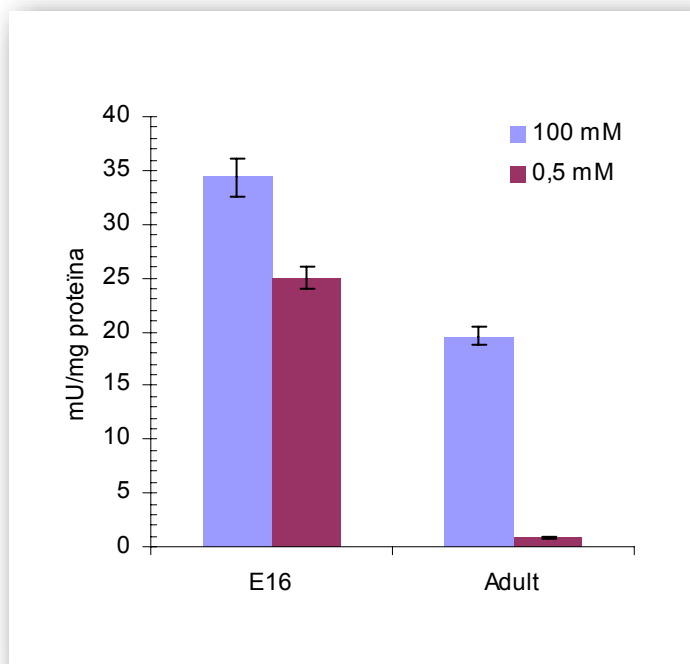
Figura 4.5 Quantificació del nivell d'expressió de les hexoquinases. Determinació de la quantitat relativa d'mRNA per PCR quantitativa en temps real. Tots els valors esta normalitzats respecte als nivells d'HK1 en fetge adult.

Tots aquest resultats estan normalitzats i expressats en relació a la quantitat d'HK1 present en fetge adult. Així podem comparar els resultats i afirmar que en fetge E16 hi ha potencialment més capacitat fosforiladora de glucosa (en absència d'inhibició) que en fetge adult. A més podem concloure que aquesta activitat en fetge E16 es nodreix bàsicament de la contribució d'hexoquinases d'alta afinitat (HK1 i HK2), mentre que en fetge adult és al contrari, l'activitat majoritària és deguda a hexoquinases de baixa afinitat (GK).

4.2.5 Determinació de l'activitat hexoquinasa.

Les dades de QRT-PCR i l'assaig Western indiquen que la sobreexpressió d'hexoquinases d'alta afinitat juga un paper fonamental en la síntesi de glicogen embrionari. La darrera comprovació consisteix en verificar que aquest augment d'mRNA i proteïna s'acaba traduït en una activitat fosforiladora de glucosa més alta.

L'assaig d'activitat hexoquinasa el vàrem realitzar mantenint una concentració d'ATP saturant i a dues concentracions de glucosa diferent: a 0,5 mM i 100 mM glucosa. Seguint aquest procediment podíem distingir entre hexoquinases d'alta i baixa afinitat. En l'assaig amb baixa glucosa només obtindríem l'activitat de les hexoquinases d'alta afinitat. La diferència d'aquesta activitat respecte a l'activitat total mesurada amb glucosa alta, correspon a l'activitat glucoquinasa de baixa afinitat. Les mesures definitives estan



resumides en la figura 4.6 i ens indiquen clarament que els enzims responsables de la fosforilació de la glucosa en fetge d'embrió E16 són les hexoquinases d'alta afinitat. En el fetge adult aquesta tasca la duen a terme hexoquinases de baixa afinitat.

Figura 4.6 Quantificació de l'activitat hexoquinasa. Determinació de la quantitat d'activitat fosforiladora de glucosa en fetges d'embrió de ratolí E16 i adult.

4.2.6 Quantificació de glicogen en embrions i adults dejunats.

Per veure com afecta el dejuni al metabolisme del glicogen hepàtic dels embrions, quantifiquem el glicogen de femelles de ratolí gestants dejunades i dels seus respectius embrions (figura 4.7).

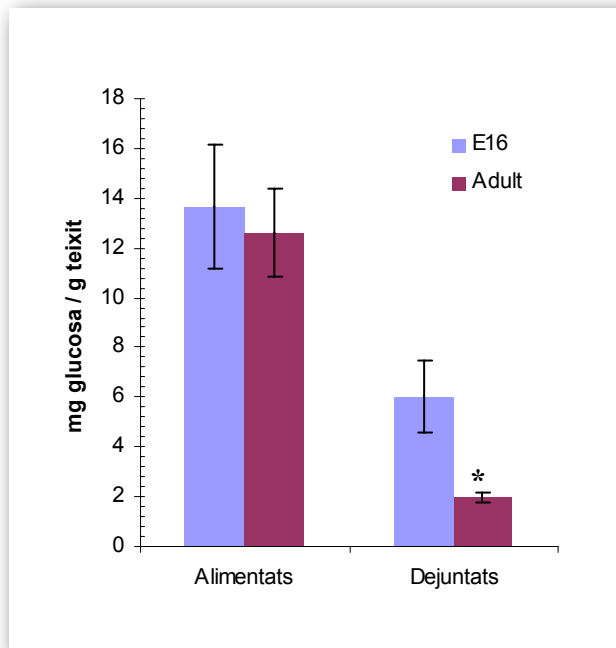


Figura 4.7 Quantificació del glicogen en dejuni. Determinació de la quantitat de glicogen present en els fetges de femelles dejunades durant 16 hores i en el fetge dels seus embrions. Les dades de glicogen dels individus alimentats que aquí es mostren a títol comparatiu corresponen a les de la figura 4.2. Els valors s'expressen en mg de glucosa / gram de teixit \pm SEM. * $p > 0,05$

Aquests resultats indiquen que durant el dejuni es mobilitzen les reserves de glicogen i suggereixen que la degradació de glicogen és molt més accentuada en el fetge de la femella gestant que en el fetge en desenvolupament.

4.3 DISCUSSIÓ

Els resultats recollits en aquest capítol ens dibuixen un panorama molt particular del metabolisme del glicogen hepàtic en l'embrió de ratolí de setze dies de gestació en relació al fetge adult.

L'origen de tota aquesta recerca sobre el metabolisme del glicogen en embrions el trobem en els treballs de la Dr. C. Postic. En un dels seus primers treballs (Postic et al., 1994) evidencià que els embrions de rata no expressen GK en el fetge malgrat que acumulen glicogen sense problemes. No podia dir el mateix de ratolins adults defectius per al gen de la GK, que són incapaços de sintetitzar glicogen hepàtic per la via directa en resposta a una càrrega elevada

de glucosa (Postic et al., 1999). Aquests animals només aconsegueixen acumular glicogen quan tenen la gluconeogènesi activa, una observació que concorda amb els experiments en els quals s'indueix l'activació de l'LGS subministrant substrats gluconeogènics a hepatòcits aïllats de rates adultes en cultiu (Gomis et al., 2003).

Amb els nostres coneixements sobre el metabolisme hepàtic fins al moment, i conscients de la dependència de l'LGS envers la GK, aquest resultat plantejaven una paradoxa. Com aconseguien uns fetges embrionaris, defectius per GK, sintetitzar glicogen amb èxit? O al contrari, perquè uns ratolins adults als quals s'havia abolit l'expressió de GK mitjançant l'enginyeria genètica no reeixien a sintetitzar glicogen hepàtic?

Els resultats del capítol 2 obtinguts en cèl·lules FTO2B obren una porta a una possible explicació, i alhora la elucidació dels mecanismes del glicogen embrionari reforça aquest mateix resultat.

Començarem caracteritzant bioquímicament aquest fetge, determinant glicogen i G6P. Els nivells obtinguts de cada metabòlit en fetges E16 són equivalents als valors dels fetges adults. El fet que les determinacions es fessin sobre mostres hepàtiques de femelles adultes i dels seus corresponents embrions ajuda a reduir l'error experimental degut al diferent estat metabòlic de cada animal. Així doncs, quedava demostrat que els embrions sintetitzen glicogen en el fetge.

Tot seguit confirmarem que als fetges d'E16 els hi manca GK, en consonància amb el que altres autors (Postic et al., 1994) havien descrit prèviament en rata, i que expressaven HK1 i HK2.

Arribats a aquest punt, ens plantejarem dues hipòtesis de partida, tot en funció de la isoforma de GS que expressessin. Si en el fetge E16 hi havia l'LGS, llavors calia sobreexpressar molt les hexoquinases d'alta afinitat per compensar la inhibició per producte i assolir els nivells de G6P necessaris per activar l'LGS. Al contrari, si els fetges embrionaris expressaven

constitutivament l'MGS, els nivells fisiològics de HK1 i HK2 ja fosforilarien prou glucosa com per activar l'MGS.

Aquest darrer escenari ens semblà el més plausible, perquè tal i com hem documentat al llarg d'aquesta memòria, existeixen uns tàndems o equips metabòlics que coordinen les seves característiques bioquímiques per maximitzar la seva eficiència. Els resultats indicaven que els fetges de ratolins E16 expressen HK1 i HK2, en conseqüència el més lògic era pensar que la parella del tàndem seria l'MGS, ja adaptada a treballar amb HK1 i HK2 en cervell i múscul, respectivament. Per sorpresa nostra, els fetges d'embrions expressen exclusivament la isoforma hepàtica, la qual cosa no avala aquesta teoria, però indica que ens trobem davant de la confirmació *in vivo* del resultat que nosaltres havíem obtingut en cèl·lules FTO2B mitjançant enginyeria metabòlica.

Si l'LGS és l'enzim responsable de la síntesi de glicogen, aleshores l'activitat específica dels fetges E16 per fosforilar glucosa havia de veure's incrementada respecte a la dels fetges adults, a fi de poder activar al·lostèricament l'LGS mitjançant la G6P.

Efectivament, quan mitjançant QRT-PCR, la immunodetecció per Western i mesures enzimàtiques, vam determinar a nivell de mRNA, proteïna i activitat el perfil d'hexoquinases presents en fetges embrionaris i els comparàrem amb els patrons obtinguts de fetges d'animals adults, vam observar un increment en l'activitat fosforiladora de glucosa.

L'augment d'activitat en els fetges embrionaris és degut a la sobreexpressió d'hexoquinases d'alta afinitat, sense cap contribució de GK. No obstant, aquest increment d'activitat no es veu traduït en un increment equivalent en els valors de G6P. Això és una prova més que ens indica que les hexoquinases d'alta afinitat no són tan eficients com la GK per produir *in vivo* nivells elevats de G6P. Com ho indiquen les equacions cinètiques del capítol 2, només ho aconsegueixen per la força bruta, a base d'expressar més enzim a fi de superar la inhibició per producte. Aquests resultats també suggereixen que

la regulació dels promotors d'HK1 i HK2 durant el desenvolupament és diferent a la de l'estat postnatal i adult.

Amb els resultats obtinguts fins al moment podem afirmar que entenem i sabem explicar en part com funciona el metabolisme del glicogen hepàtic en embrions, però la raó de perquè són necessaris tots aquests canvis encara roman amagada.

Per primer cop ens trobem davant d'un fetge àvid de glucosa, que expressa transportadors de glucosa i hexoquinases d'alta afinitat (GLUT1, HK1, HK2) per no deixar escapar aquest substrat tant preuat, com qualsevol teixit perifèric. Aquest perfil és més representatiu del múscul o del cervell, no del fetge adult, principal encarregat de l'homeòstasi glucídica que només capta l'excés de glucosa postpandrial o en produeix si fos menester.

Precisament aquí rau una possible explicació. No hem d'oblidar on es troba l'embrió. El ratolí en desenvolupament està hostatjat en la placenta, la qual li assegura un subministre continu de glucosa. Els nivells de glucosa que arriben al fetus a través de la placenta mai baixaran del 5 mM fisiològic, perquè el fetge matern s'encarrega de mantenir l'homeòstasi de la glucosa. Tanmateix, aquests nivells si que es veuran incrementats després de cada ocasió que la mare s'alimenti.

Davant d'aquest escenari se'ns planteja la reflexió següent: si els fetges embrionaris expressessin GK, només acumularien glicogen quan es produís el pic de glucosa postpandrial, és a dir, després que la mare mengés i s'incrementés la glucosa en sang per sobre de 5 mM. La resta del temps la GK acusaria un baix rendiment perquè la glucosa circulant estaria per sota de la seva $S_{0,5}$, llavors no hi hauria prou G6P per activar al·lostèricament a l'LGS i enlloc d'acumular glicogen es tendiria cap a la glicogenolisis.

Aquesta oscil·lació en les reserves de glicogen representa un perill per al fetus perquè no coordina el moment del naixement amb l'estat d'alimentació de la mare. En cas de néixer durant un període de dejuni, els seus dipòsits de

CAPÍTOL 4
ESTUDI DEL METABOLISME DEL
GLICOGEN HEPÀTIC EN EMBRIONS DE
RATOLÍ.

glicogen no estarien al màxim i el risc de morir d'hipoglicèmia perinatal seria més elevat. La quantificació del glicogen hepàtic en les mares dejunades i els corresponents embrions indica que el fetge embrionari degrada glicogen més lentament que el fetge adult. Aquest resultat concorda amb la hipòtesi de que els embrions expressen una combinació d'isoenzims diferents dels del fetge matern per assegurar-se les reserves de glicogen per al moment del naixement.

Les cries a punt de néixer no poden deixar les seves possibilitats de supervivència a l'atzar i per això el fetge embrionari es configuraria de tal manera que mitjançant la sobreexpressió d'hexoquinases d'alta afinitat s'assegura la producció de G6P independentment de la concentració de glucosa en sang. En contrapartida el fetge en desenvolupament hauria perdut les funcions d'òrgan regulador de la glucosa però això no representa cap problema gràcies a que durant la gestació l'homeòstasi de la glucosa està finament controlada pel sistema endocrí i el fetge matern.

Aquests resultats també suggereixen una explicació per a la necessitat d'expressar la GK a partir de dos alternatius diferents. Si les cries de ratolí no expressen GK al fetge fins que són deslletades i tenen el primer pic d'insulina, com s'expressa la GK pancreàtica que precisament ha de provocar aquest estímul d'insulina en resposta a l'increment de glucosa? Probablement aquest problema s'ha solucionat com tots els altres temes estudiats en aquesta tesi. L'ús de promotors alternatius per a transcriure el mateix enzim permet una regulació independent de l'expressió gènica, i cada promotor pot adaptar-se a les necessitats específiques del teixit on realitza la seva funció. Resulta interessant reflexionar sobre si la coexistència de dos promotors en un mateix gen és un estadi intermedi abans de la plena duplicació gènica.

La reorganització global del patró d'expressió dels isoenzims implicats en el metabolisme del glicogen del fetge en desenvolupament cap a isoenzims d'alta afinitat que permet als embrions acumular reserves de glicogen, a punt per ser utilitzades després del naixement, independentment de la situació metabòlica de la mare.