

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

D. DISCUSSIÓ GENERAL

- Però llavors –vaig gosar comentar-, encara sou lluny de la solució...
- Hi sóc molt a prop, però no sé pas de quina.
- Així, doncs, no teniu una sola resposta a les vostres preguntes?
- Si la tinguéis, Adso, estaria ensenyat teologia a París.
- A París sempre tenen la resposta vertadera?
- Mai –va dir Guillem-, però estan molt segurs dels seus errors.
- I vós? – vaig dir amb una impertinència infantívola- No feu mai errors?
- Sovint- respongué- però enlloc de concebre'n un de sol me n'empesco molts, així no em faig esclau de cap.

Quart dia, vespres.

Umberto Eco, *“El nom de la rosa”*

D. DISCUSSIÓ GENERAL

A través de l'estudi de la regulació per G6P de la síntesi de glicogen hem elucidat com els principals enzims del seu metabolisme s'adapten a les necessitats fisiològiques dels teixits on s'expressen. Les dades sobre evolució presentades en aquesta memòria indiquen que els isoenzims de vertebrats sorgeixen per duplicació gènica a partir d'un ancestre comú pre-vertebrat i aquestes noves isoformes evolucionen independentment en fetge i en múscul. A més, les dades bioquímiques obtingudes sobre l'activació al·lostèrica de la glicogen sintasa mediada per G6P són compatibles amb l'existència d'un únic compartiment de G6P, indistintament de la isoforma d'hexoquinasa que la produeixi.

Sovint l'elevada concentració de G6P necessària per activar al·lostèricament l'LGS en comparació a l'MGS ha induït a interpretar els resultats de l'eficiència de la G6P sintetitzada per HK1 o GK a l'hora d'activar l'LGS des del punt de vista de l'existència d'almenys dos compartiments de G6P. Segons aquest model, un dels dipòsits s'ompliria amb la G6P procedent de l'acció catalítica de l'HK1 i es destinaria majoritàriament a la glucòlisi. La G6P del segon compartiment seria el producte de la GK o de la gluconeogènesi i estaria en una situació accessible per l'LGS. Només en casos excepcionals de sobreproducció part de la G6P de l'HK1 sobreixiria i podria anar al segon compartiment.

En canvi els resultats obtinguts en aquest projecte amb la sobreexpressió d'HK1 o GK i l'anàlisi del metabolisme del glicogen en embrions suggereixen com a hipòtesi alternativa més raonable que la G6P procedent tant d'HK1 com de GK al final va a parar al mateix reservori, tot i que només la GK és capaç d'incrementar la concentració de G6P prou com per activar l'LGS.

Ambdós models expliquen els resultats observats de forma satisfactòria però la hipòtesi d'un reservori únic de G6P és la més senzilla i elegant. En aquest segon escenari la compartimentalització de la G6P no és física sinó que és el resultat d'un equilibri molt ben ajustat d'afinitats relatives. Així el

metabolisme del glicogen s'ajusta al model de "empeny i estira" perquè la G6P fruit de la metabolització de la glucosa primer activa l'LGS i després l'enzim activat estira part del flux de glucosa cap a la síntesi de glicogen. Això es contraposa al model de "estira i empeny", segons el qual l'activació de la LGS indueix un augment en el consum d'UDP-glucosa i en resposta augmenta el flux de fosforilació de glucosa.

En el metabolisme del glicogen, la G6P representa un doble paper, actua alhora com a precursora del substrat i com a molècula senyalitzadora. La G6P és substrat de la fosfoglucosa isomerasa i la fosfoglucomutasa, però al mateix temps és l'activador al·lostèric de la glicogen sintasa i l'inhibidor de l'HK1. Si un determinat teixit expressa una isoforma d'hexoquinasa inhibible per G6P, està condicionat a sobreexpressar l'hexoquinasa o a expressar una isoforma de glicogen sintasa amb una baixa $M_{0,5}$ per la G6P, perquè d'altra forma no hi hauria prou G6P per activar al·lostèricament la glicogen sintasa.

Aquesta delicada coordinació entre les diferents etapes de la via de síntesi de glicogen demostra que les característiques dels diferents enzims estan perfectament ajustades entre si. A través de l'estudi de la interrelació les isoenzims d'hexoquinasa amb la glicogen sintasa hepàtica hem determinat les propietats cinètiques dels isoenzims hepàtics que permeten al fetge actuar com l'òrgan tamponador de la glucosa i les hem comparat amb les corresponents a les respectives isoformes musculars i de cervell.

La primera de les adaptacions evolutives que condiciona la funció del fetge la trobem en els seu transportador de glucosa. En el fetge s'expressa el transportador GLUT2 que equilibra la glucosa en sang amb la glucosa intracel·lular de forma reversible, així l'hepatòcit pot captar la glucosa disponible de la sang o alliberar la que produeix per gluconeogènesi.

El següent isoenzim en la via és la glucoquinasa. La seva baixa afinitat per la glucosa és un dels seus trets diferencials respecte a els isoenzims extrahepàtics. El primer pas obligat de la glucòlisi catalitzat per les hexoquinases és molt important perquè reté la glucosa dins de la cèl·lula en

forma de G6P però l'alta $S_{0.5}$ de la glucoquinasa combinada amb l'efecte de la GKRP fa que el fetge metabolitzi la glucosa sobretot quan aquesta circula en excés. En aquestes condicions l'activitat de la glucoquinasa supera amb escreix la de les altres isoformes d'hexoquinasa i es produeix un augment molt acusat en la concentració de G6P intracel·lular.

La glicogen sintasa hepàtica és sensible a aquest augment de la concentració de G6P. L' $M_{0.5}$ de l'LGS pel seu activador al·lostèric és més alta que la de la isoforma muscular, però no li cal més sensibilitat perquè en el moment en que el fetge ha de sintetitzar glicogen per retirar glucosa de la sang i acumular reserves, és quan hi ha excés de glucosa i en aquestes condicions el GLUT2 i la GK asseguren una elevada producció de G6P suficient per activar l'LGS.

En el pàncreas també s'expressen alguna d'aquestes isoformes, com el GLUT2 o la GK, on tenen un paper fonamental en la secreció d'insulina estimulada per increments de la glucosa en sang, però certament és en el fetge on coincideixen tots els isoenzims d'alta capacitat i on realment té lloc l'emmagatzematge i la producció de glucosa que regularà l'homeòstasi glucídica.

A priori aquesta duplicació que sofreixen els enzims del metabolisme del glicogen en vertebrats podria semblar redundant perquè cap de les noves isoformes catalitza una reacció distinta de la de la seva isoforma. Però tot i que qualsevol de les còpies a l'inici fos prescindible, aquestes han escapat del silenciament provocat per les mutacions degeneratives i amb el temps la selecció natural ha fixat totes les còpies.

Les dades evolutives i bioquímiques indiquen que els isoenzims implicats en les primeres etapes de la glucòlisi i del metabolisme del glicogen eviten la inactivació a nivell gènic perquè l'expressió de cada isoforma es restringeix a uns teixits en concret. És en aquest nou escenari on les restriccions selectives poden actuar independentment sobre cada còpia, reforçant la seva adaptació i la del conjunt de la via a les funcions específiques de cada òrgan. Des del moment en que els isoenzims s'independitzen l'un de

l'altre mitjançant l'expressió compartimentalitzada en diferents teixits, són lliures per co-evolucionar, ara no respecte la seva isoforma sinó en conjunt amb la resta d'enzims de la via que s'expressen en el mateix teixit. El resultat són uns mòduls metabòlics independents que en les seves múltiples combinacions definiran les característiques bioquímiques de cada teixit.

Ara ja no estem parlant d'éssers unicel·lulars, amb un únic compartiment on desenvolupar la majoria de les reaccions metabòliques. La modulació del metabolisme de la glucosa i el glicogen en resposta a canvis en les condicions fisiològiques ja no és seqüencial com en els llevats, on ha de seguir els passos: expressió de l'enzim de la via A → repressió de l'enzim de la via A → inducció de l'enzim de la via B (DeRisi et al., 1997). El destí de la glucosa no el determina l'expressió d'un isoenzim o un altre en un moment concret. La concepció del metabolisme guanya una nova dimensió en els vertebrats amb el desenvolupament de teixits diferenciats amb funcions metabòliques especialitzades que permeten la regulació del metabolisme en paral·lel. Així en el mateix instant que el fetge produeix glucosa per gluconeogènesi, altres teixits com el múscul i el cervell poden consumir aquesta glucosa via glucòlisi perquè configuren mòduls metabòlics independents.

En aquest projecte hem vist exemples de la versatilitat del metabolisme del glicogen. Els resultats que hem obtingut indiquen que l'LGS és molt dependent de la GK perquè aquest enzim produeix de forma més eficient que l'HK1 les elevades concentracions de G6P que activen l'LGS. Però això no tanca les portes a un canvi de papers. Mitjançant la sobreexpressió de l'HK1, amb adenovirus o de forma espontània en els embrions de ratolí, l'HK1 pot produir la G6P necessària per activar l'LGS. En l'altre extrem trobem que si augmentem la capacitat desfosforiladora mitjançant la sobreexpressió de les subunitats que dirigeixen la fosfatasa cap a l'LGS també activem la síntesi de glicogen, independentment de la concentració de la G6P. Aquests resultats suggereixen que potenciant els mecanismes tant al·lostèrics com covalents obtenim l'activació de la glicogen sintasa, però probablement en tots els casos es requereix la presència d'un mínim de G6P per induir canvis conformacionals en la GS que permetin l'acció de les fosfatases i que per tant ambdós

mecanismes estan en equilibri i no són independents. Prova d'això és que les cèl·lules que sobreexpressen PTG només sintetitzen glicogen quan s'incuben amb glucosa.

La regulació al·lostèrica introdueix un grau més de llibertat en el control de la síntesi de glicogen. En un primer moment, el que regula el flux metabòlic és la disponibilitat de glucosa en la primera etapa de la glucòlisi, però quan s'acumula prou G6P per activar la glicogen sintasa al·lostèricament i per desfosforilació, es modula l'afinitat de l'enzim pel substrat i es redirigeix el flux metabòlic cap a la glicogenogènesi, en un joc d'obrir i tancar comportes virtuals. No cal cap compartimentalització dels reservoris de G6P per simular aquest efecte.

Les adaptacions que observem en els enzims del metabolisme del glicogen denoten un alt grau d'especialització i de coordinació però en cap cas això significa que ens trobem davant d'un sistema tancat. Tot el contrari, el disseny del metabolisme del glicogen és prou robust com per adaptar-se a qualsevol nova situació. El llenguatge també és un sistema amb unes normes sintàctiques i gramaticals molt estrictes però és gràcies a la seva estructura modular que poden sorgir noves paraules per designar nous conceptes a través de la combinació de mots que ja existien (ferrocarril, automòbil, correu electrònic). De la mateixa manera, el metabolisme del glicogen segueix unes reaccions enzimàtiques concretes que formen el nucli del procés, però la forma en que es duen a terme aquestes etapes és prou versàtil com per permetre els canvis que serviran a funcions fisiològiques complementàries. Així doncs, el procés de síntesi de glicogen reuneix les principals característiques d'un sistema evolucionable: compartimentalització, redundància, robustesa, modularitat i versatilitat (Kirschner & Gerhart, 1998).

L'evolucionabilitat d'un sistema es caracteritza per mantenir el procés central, però no la forma en que es duu a terme. En el nostre cas, el nucli del procés és la síntesi de glicogen. La majoria d'organismes acumulen glicogen o midó com a reserva d'energia. En aquest estudi hem demostrat que les

característiques de la glicogen sintasa estan molt conservades en els eucariotes, la qual cosa ens indica que la síntesi de glicogen és un procés important. Però com que la selecció natural només actua sobre la funció, la forma concreta en que es desenvolupa la síntesi de glicogen pot variar entre els organismes. Fins i tot dins d'un mateix organisme trobem diferències entre els teixits. El fetge i el múscul acumulen glicogen a través d'unes etapes metabòliques fixades com un eix central inalterable (seguint el tradicional esquema de la via dels llibres de bioquímica, amb noms i fletxes), però el moment precís en que el sintetitzen, la utilitat d'aquest glicogen i les relacions entre els enzims, estan sotmeses a petites i subtils variacions que permeten satisfer funcions diferents.

El cor de la via metabòlica es conserva, no els mecanismes de control. L'addició d'elements reguladors afavoreix l'evolucionabilitat del sistema perquè confereix la flexibilitat necessària al conjunt del sistema per adaptar-se a nous rols. La regulació addicional de la glicogen sintasa per mecanismes al·lostèrics o pel control de la seva localització intracel·lular com observem en vertebrats ofereixen a l'enzim noves vies per adaptar-se i evolucionar.

Al voltant d'aquest cor metabòlic han sorgit noves funcions aprofitant vells recursos. Cada cop és més evident que molts enzims de vies metabòliques clàssiques han adquirit noves funcions en processos cel·lulars com la regulació de la transcripció o l'apoptosi, a part de la seva mera funció catalítica (Kim & Dang, 2005). És el cas de la protecció front l'apoptosi que confereix la unió de l'HK1 o la GK al mitocòndri (Danial et al., 2003; Gottlob et al., 2001; Machida et al., 2006; Majewski et al., 2004), o la regulació de l'expressió de gens glucolítics i lipogènics mediada per la glucoquinasa (Dentin et al., 2004).

La translocació vers al nucli de l'MGS també podria ser la característica d'una nova funció, de moment desconeguda, que hauria adquirit la glicogen sintasa al llarg de l'evolució. Degut a que l'MGS només entra al nucli quan s'han esgotat totes les reserves de glicogen en el citosol (Cid et al., 2005), podria actuar com un sensor de l'estat de les reserves energètiques de la cèl·lula i regular l'expressió de gens de resposta a l'estrès metabòlic com la

interleucina-6 (Steensberg et al., 2001). No deixa de ser curiós que en els tàndems GK/LGS i HK1/MGS sempre hi ha un membre de la parella que transloca al nucli.

Són necessaris més estudis per determinar si la translocació de l'MGS al nucli és un simple emmagatzematge de l'enzim quan no es requereix la seva catàlisi o és un pas més en la direcció vers on els enzims metabòlics esdevenen reguladors de funcions cel·lulars, més enllà del seu paper de simples enginys catalítics.

El metabolisme del glicogen muscular dels mamífers aparentment ha assolit les cotes més altes d'adaptació, donat que podem observar una depuració de qualsevol tipus de mutació en els principals enzims de la via. La necessitat de maximitzar el rendiment en la captació i utilització de la glucosa en el múscul ha forçat l'evolució dels enzims musculars fins a un extrem on tots els enzims estan coordinats.

El metabolisme del glicogen en múscul i fetge compleix perfectament la seva tasca en els teixits respectius, però el major grau de complexitat que assolix en el múscul es fa palès quan observem els mecanismes de regulació extra que tenen els enzims musculars respecte a les isoformes hepàtiques. En múscul el transport de glucosa està regulat per la insulina que estimula la translocació del transportador a la membrana, la hexoquinasa s'inhibeix per producte, la glicogen sintasa també transloca des del nucli cap al citosol, i la glicogen fosforilasa es regula al·lostèricament per AMP. Totes aquestes adaptacions són específiques de múscul però segueixen mantenint l'objectiu principal: sintetitzar glicogen i aprofitar-lo com a molècula de reserva energètica. Probablement el manteniment d'aquest grau de complexitat requereix la depuració de les mutacions no sinònimes en tots els isoenzims musculars de la via que hem observat en els càlculs de les relacions K_A/K_S .

En la cèl·lula trobem molts exemples de co-evolució entre parelles de proteïnes que interaccionen entre si perquè estan sotmeses a les restriccions que imposa el manteniment del domini d'interacció. Els enzims del metabolisme

del glicogen també han estat objecte d'estudi a la recerca de possibles interaccions que poguessin explicar alguns comportaments cinètics. El cas més reeixit és el de la interacció de la glucoquinasa amb la proteïna reguladora (Malaisse et al., 1990) i amb la fosfofructoquinasa 2 (PFK2/FBPasa2) (Baltrusch et al., 2001), i fins i tot s'ha descrit una feble associació amb els transportadors de glucosa (Lachaal & Jung, 1993).

Però els resultats han estat infructuosos quan s'ha intentat abordar les diferències en l'eficàcia de GK i HK1 a l'hora d'activar la LGS mitjançant la G6P i s'ha intentat buscar algun tipus d'interacció o associació física entre les hexoquinases i les glicogen sintases. I és que en aquest cas ens trobem davant d'un tipus d'interacció molt més etèria, doncs les hexoquinases i les glicogen sintases es troben connectades a través de la G6P. El vincle que les uneix a elles i a la resta d'enzims de la via és la connectivitat a través dels intermediaris metabòlics i la necessitat de mantenir i regular el flux metabòlic. La necessitat de tamponar qualsevol canvi dràstic en el flux imposa les restriccions evolutives i sotmet la via metabòlica a un estat de continua co-evolució.

A partir dels resultats exposats proposem que el diferents teixits estan adaptats a produir glicogen en les seves condicions metabòliques particulars gràcies a l'evolució concomitant de tots els enzims implicats en aquest procés.