

R. 447.584

FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

REGULACIÓ DEL METABOLISME DEL GLICOGEN

EN HEPATÒCITS DE RATA

CARLOS JULIÁN CIUDAD i GÓMEZ

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083933

Tesi presentada pel Llicenciat
Carlos Julián Ciudad Gómez per optar
al grau de Doctor en Farmàcia.

Aquesta tesi ha estat realitzada
en el Departament de Bioquímica de
la Facultat de Farmàcia de la
Universitat de Barcelona, sota la
direcció del Professor Dr. Joan J.
Guinovart i Cirera.

Barcelona, juny del 1982.

Agraeixo l'ajut facilitat per totes les persones que d'una manera o d'una altra han contribuït a la realització d'aquest treball, i molt especialment a:

Joan J. Guinovart car sota la seva direcció he rebut tots els elements necessaris per una bona formació bioquímica.

Angels Mor, Jordi Vila i Fàtima Bosch, amb qui he après a gaudir del treball en equip.

Josefina Sanz, Marian Newman, Dolors Pardo i Eduard Fornells per motius molt particulars.

Roser Cussó que a part d'ésser una excel.lent companya de treball em va orientar en altres facetes de la vida universitària.

Joan Massagué i Agustí Salavert que van ésser els pioners d'aquesta línia d'investigació.

Fausto G. Hegardt, Emilio Itarte, Maribel V. Baanante i Juan Aguilar per llur completa disponibilitat en qualsevol de les qüestions que els he presentat.

Carme Illa i Isabel Olivar per llurs orientacions en l'aspecte idiomàtic.

Laboratori Ferrer per la seva donació, sempre desinteressada, d'animals d'experimentació.

PRESENTACIÓ ,

Al moment d'iniciar-se aquest treball hi havien plantejats diversos problemes relacionats amb la regulació del metabolisme hepàtic del glicogen:

1. Respecte a la regulació per sucres, el grup d'Hers, en el transcurs dels darrers set anys, ha desenvolupat una teoria per a justificar les variacions enzimàtiques, provocades per la glucosa, sobre els enzims del metabolisme hepàtic del glicogen. Aquesta teoria, també anomenada seqüencial, proposa com a requisit previ que la glicogeno-fosforilasa s'ha d'inactivar per donar lloc a l'activació de la glicogeno-sintasa. Tanmateix, aquesta teoria no pot explicar la seqüència d'esdeveniments enzimàtics observats com a resposta al tractament del teixit hepàtic amb altres sucres, com per exemple la galactosa o la fructosa. Efectivament, certs autors havien observat l'activació de la glicogeno-fosforilasa per la fructosa cosa que era sorprenent puix que no es tenia coneixença de cap sucre que activés l'enzim responsable de la glicogenòlisi.

2. D'altra banda el paper d'un control directe de la insulina sobre els enzims del metabolisme del glicogen ha estat motiu de controvèrsia, de manera que fins i tot s'havia arribat a afirmar que la capacitat glicogènica de la insulina es produïa simplement com a conseqüència de l'estimulació de l'efecte que la glucosa provoca en el fetge.

3. Així mateix hi havia certa discrepància sobre quin(s) enzim(s) podria(en) constituir el defecte enzimàtic inherent a la diabetis.

4. Si bé hom havia descrit que el glucagó, l'epinefrina i la vasopresina incrementen la glicogenòlisi hepàtica a través de mecanismes diferents, existia un coneixement limitat respecte a la seqüència de les etapes que condueixen a l'activació final de la fosforilasa.

Es per això, que conèixer els mecanismes d'acció a nivell molecular de diferents sucres (glucosa, fructosa i d'altres), així com el d'hormones (insulina, glucagó, epinefrina i vasopresina) en el metabolisme hepàtic del glicogen constitueixen les fites més importants del treball que presentem

Com a material d'estudi hem utilitzat les cèl.lules del parènquima hepàtic intactes, estructuralment i funcionalment, de mamífer (rata) sotmes a diferents estats metabòlics: dejú, alimentat i diabètic.

A partir de les dades obtingudes en el present estudi:

- a) proposem un mecanisme d'abast general d'activació de la glicogeno sintasa hepàtica per sucres.
- b) demostrem definitivament que la insulina controla directament el metabolisme hepàtic del glicogen.
- c) clarifiquem certs aspectes mecanístics relacionats amb les alteracions del metabolisme hepàtic del glicogen induïdes per la diabetis.
- d) es completa el coneixement del mecanisme d'acció alfa-adrenèrgic hepàtic.
- i e) s'estableix quin és l'enzim nexa de les dues vies glicogenolítiques operatives en el fetge.

ABREVIATURES MÉS USUALS UTILITZADES EN AQUESTA OBRA

AMP	Adenosina 5' monofosfat.
AMP c	Adenosina 3'-5' monofosfat.
ATP	Adenosina 5' trifosfat.
BSA	Albúmina sèrica bovina.
^{14}C	Carboni 14.
Ci, mCi, uCi	Curi, milicuri, microcuri.
c.p.m.	Comptes per minut.
DEAE	Dietilaminoetil.
DMSO	Dimetilsulfòxid
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilè diamino tetraacetat.
EGTA	Etilè glico bis (beta-aminòetil èter) N,N'-tetraacetat.
x g	gravetats.
G6-P	Glucosa 6-fosfat.
G1-P	Glucosa 1-fosfat.
M, mM, uM.	Molar, milimolar, micromolar.
mA	Miliamper.
nm	Nanòmetre.
NAD ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid.
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid reduït.
NADP ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid-fosfat.
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid-fosfat reduït.
^{32}P	Fòsfor 32.
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoroanhidre.
PP0	2,5-difenil oxazole
r.p.m.	Revolucions per minut.
SDS	Sulfat dodecíl sòdic.
TCA	àcid tricloroacètic.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilè diamina.

Tris	Tris (hidroximetil) aminometà.
U	Unitats internacionals d'activitat enzimàtica.
UDP-glucosa, UDPG	Uridina difosfo glucosa.
UTP	Uridina trifosfat.
V	Velocitat d'una reacció
V _{màx}	Velocitat màxima.
vs	versus, en front de.

CONTINGUT

1.- INTRODUCCIÓ	
1.1. Característiques generals del metabolisme del glicogen i la seva regulació	
1.2. Proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic	
1.3. Quinasa de la fosforilasa	
1.4. Glicogeno-fosforilasa	
1.5. Quinases independents	
1.6. Glicogeno-sintasa	
1.7. Fosfoproteïno-fosfatases al metabolisme del glicogen	
1.8. Metabolisme de carbohidrats en el fetge	
1.9. Regulació del metabolisme del glicogen per sucres	
1.10. Requeriments per a la síntesi de glicogen	
1.11. Efecte del dejuni sobre el metabolisme hepàtic del glicogen	
1.12. Metabolisme del glicogen en l'estat diabètic .	
1.13. Efectes hormonals sobre el metabolisme hepàtic del glicogen	
2.- MATERIALS I METODES	
2.1. Animals utilitzats	
2.2. Isolament de cèl.lules de parènquima hepàtic ..	
2.3. Incubació dels hepatòcits	
2.4. Final de les incubacions	
2.5. Tècniques determinatives	
2.6. Càlculs estadístics	
2.7. Reactius i productes utilitzats	

3.-	RESULTATS	
3.1.	Regulació del metabolisme del glicogen per sucres	
3.2.	Regulació de la síntesi de glicogen per gluco- sa i fructosa en hepatòcits de rates alimenta- des , dejunes i diabètiques	
3.3.	Efectes de la insulina sobre el metabolisme del glicogen	
3.4.	Estudi de l'activació de la quinasa de la fos- forilasa <u>b</u> hepàtica	
4.-	DISCUSSIÓ	
4.1.	Regulació del metabolisme del glicogen per sucres	
4.2.	Síntesi de glicogen i activitats enzimàtiques en hepatòcits de rates dejunes i alimentades per efecte de glucosa i de fructosa	
4.3.	Efectes de la insulina sobre el metabolisme hepàtic del glicogen.....	
4.4.	Regulació de la quinasa de la fosforilasa hepa- tica	
5.-	CONCLUSIONS	
6.-	BIBLIOGRAFIA	

1. introducció

1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DEL METABOLISME DEL GLICOGEN I LA SEVA REGULACIÓ .

Els sistemes biològics capten l'energia necessària per mantenir llur activitat vital a partir de molècules relativament complexes del medi extern. La ingesta d'aliments per part dels animals no és un procés continuat, cosa que requereix la formació de molècules relativament simples que magatzemen l'energia que és utilitzada posteriorment en els períodes de dejuni.

A més els animals els cal desenvolupar tot un sistema de regulació de la captació i degradació d'aquests compostos rics energèticament. El dipòsit que acumula glucosa per cedir-la quan calgui és el glicogen. El glicogen és un polisacàrid format per molècules lligades per enllaços alfa (1-4) que donen lloc a cadenes linials ramificades cada 8 o 10 restes de glucosa, mitjançant unions de tipus alfa (1-6). En el fetge dels mamífers està present en forma de rosetes el diàmetre de les quals és aproximadament 0,1 μm (1); la seva localització és predominantment citoplasmàtica.

Aquestes estructures grans s'anomenen partícules alfa

i estan constituïdes de subunitats anomenades partícules beta (2). Les partícules beta tenen un tamany força uniforme (diàmetre 15-30 nm) amb una estructura ramificada formada per cadenes internes i externes. Aquesta estructura ja és considerada com a una molècula de glicogen.

El pes molecular que s'ha estimat per aquestes partícules és de 4×10^6 daltons per les subunitats beta i de 400×10^6 per les partícules alfa (3).

La concentració de glicogen en el fetge pot variar en un rang de 100 vegades dependent de l'estat nutricional de l'animal. La concentració de polisacàrid en el fetge d'animals dejunis és de 1-5 mg/g de fetge pes humit i s'incrementa per efecte de l'alimentació a una velocitat de 10 mg/g fetge pes humit x hora. El fetge d'una rata alimentada arriba a contenir (a les tres setmanes d'edat) una concentració de glicogen de 7 g de glicogen/100 g de fetge pes humit (4).

La funció principal del glicogen en els diferents teixits és la de servir com a combustible de reserva per quan l'organisme el necessita. La capacitat de l'organisme de magatzemar glicogen no és ilimitada. En l'home, mentre en el fetge pot magatzemar-se uns 70 g de glicogen aproximadament, en tota la massa muscular només s'arriben a acumular 120 g de glicogen. Tanmateix, aquesta diferència quantitativa no reflecteix fidelment el paper del glicogen de cadascun dels dos principals compartiments del polisacàrid: el múscul i el fetge.

En el múscul, el glicogen haurà de servir principalment com a combustible per la formació d'ATP durant la contracció i mai més podrà tornar a la circulació sanguínea, cosa que és degut al fet que el múscul no posseeix l'enzim glucosa 6-fosfatasa. Per això les reserves de glicogen muscular només s'u-

tilitzaran per a les necessitats energètiques del mateix múscul.

D'altra banda el glicogen acumulat en el fetge, serà poc utilitzat per les necessitats energètiques del mateix òrgan. La seva funció és, principalment, servir com a reservori de glucosa per a anivellar la glucèmia quan aquesta disminueix en períodes compresos entre les ingestes i sobre tot durant el llarg període de dejuni corresponen al descans, nocturn en l'home i diürn en la rata.

"In vitro" es pot incorporar restes de glucosa a glicogen per dos mecanismes diferents. Una de les reaccions és catalitzada per la glicogeno-fosforilasa que pot incorporar molècules de glucosa 1-P sobre el glicogen segons van posar de manifest Cori i cols. en 1939, (5). Aquesta reacció que és reversible pot "in vitro" conduir tant a la síntesi com a la degradació de glicogen, simplement variant les concentracions relatives de G 1-P i de fosfat inorgànic en la mescla de reacció. És per això que durant molts d'anys s'acceptà que la glicogeno-fosforilasa era l'enzim encarregat "in vivo" tant de la síntesi com de la degradació del glicogen. Tanmateix, 18 anys més tard, Leloir i Cardini van descobrir en el fetge una via sintètica de glicogen on la UDP-glucosa actuava com a donador de restes glucosílics. L'enzim que catalitzava aquesta reacció es va anomenar UDP-glucosa alfa-glucan-4-alfa-glucosil transferasa (E.C.2.4.1.11) o glicogeno-sintasa. Posteriorment la presència d'aquest enzim ha estat corroborada en tots els òrgans on s'ha estudiat. Aquest enzim és anomenat actualment glicogeno-sintasa.

La glucosa que arriba a les cèl.lules és fosforilada per l'hexoquinasa amb consum d'ATP i formació de glucosa 6-P. En el fetge aquesta reacció és catalitzada per la glucoquinasa. Aquest metabolit és convertit a glucosa 1-P en reacció cata-

litzada per la fosfoglucomutasa. Per la seva incorporació en glicogen cal que es conjugui amb uridina trifosfat que per acció de la UDP-pirofosforilasa forma la uridina-difosfo-glucosa (UDPG), donador de grups glucosílics en la reacció de la glicogeno-sintasa, la qual els incorpora al glicogen. Cal pararesment que per a la formació de glicogen estructuralment normal hi ha d'actuar l'enzim ramificant (amilo 1-4, 1-6 transglucosilasa) responsable de transferir fragments d'oligosacàrid terminal, de 6 a 8 restes glucosílics, a la mateixa o a una altra cadena de glicogen, formant els enllaços alfa (1-6) i creant així una nova ramificació.

El procés degradatiu es basa en la separació d'unitats de glucosa 1-P a partir de glicogen en la reacció que catalitza la glicogeno-fosforilasa. La glucosa 1-P alliberada passa a glucosa 6-P, posant-se a l'abast del procés glucolític del monosacàrid. En el cas del fetge, la glucosa 6-P pot passar a glucosa que, a més, pot ésser alliberada a la circulació sanguínia.

La glicogeno-fosforilasa actua trencant únicament les unions alfa (1-4), parant la seva acció tres o quatre molècules de glucosa abans d'una ramificació. L'enzim amilo alfa (1-6) glucosidasa, anomenat enzim desramificant, transporta l'oligosacàrid excepte la glucosa unida per mitjà de l'enllaç alfa (1-6) a l'extrem de la ramificació i llibera la glucosa amb unió alfa (1-6), molècula que origina la ramificació. Un cop eliminat l'entrebanco que representa aquest enllaç la glicogeno-fosforilasa pot continuar la degradació de glicogen

Són la glicogeno-sintasa i la glicogeno-fosforilasa, respectivament els enzims responsables directes del control de la síntesi i de la degradació del glicogen.

La glicogeno-sintasa i la glicogeno-fosforilasa són en-

zims regulables per canvis en llur grau de fosforilació, és a dir en el nombre de fosfats units covalentment a la molècula proteica.

Les formes de la glicogeno-sintasa actives fisiològicament són les menys fosforilades, mentre que les formes més actives de la fosforilasa són, precisament, les fosforilades (forma a) (vegeu l'esquema I).

Els canvis en el grau de fosforilació poden ésser induïts per la presència d'hormones a l'entorn cel.lular. Tot i que simples canvis en la concentració de metabolits a l'interior de la cèl.lula poden modificar consegüentment el metabolisme del glicogen, el control més potent és el protagonitzat per les hormones.

El glucagó i les catecolamines, hormones glicogenolítiques, provoquen en molts teixits la fosforilació de la sintasa i de la fosforilasa a través de l'activació de proteïno-quinases. En conseqüència la sintasa resulta inactivada i la fosforilasa activada. El resultat net de l'operació és la conducció del metabolisme del glicogen vers la degradació.

La insulina, al contrari, provoca el fenomen invers, és a dir, la pèrdua del fosfat lligat als enzims, per mecanismes encara mal coneguts. El resultat d'aquesta acció hormonal és l'increment de la síntesi de glicogen.

Cal tenir en compte que cap de les hormones esmentades penetren a l'interior de la cèl.lula i que per dur a terme llur efecte, el senyal hormonal que arriba a la membrana citoplasmàtica ha de recórrer viaranyes específics i complexes abans de modificar covalentment ambdós enzims.

Ha passat un quart de segle des que la importància de

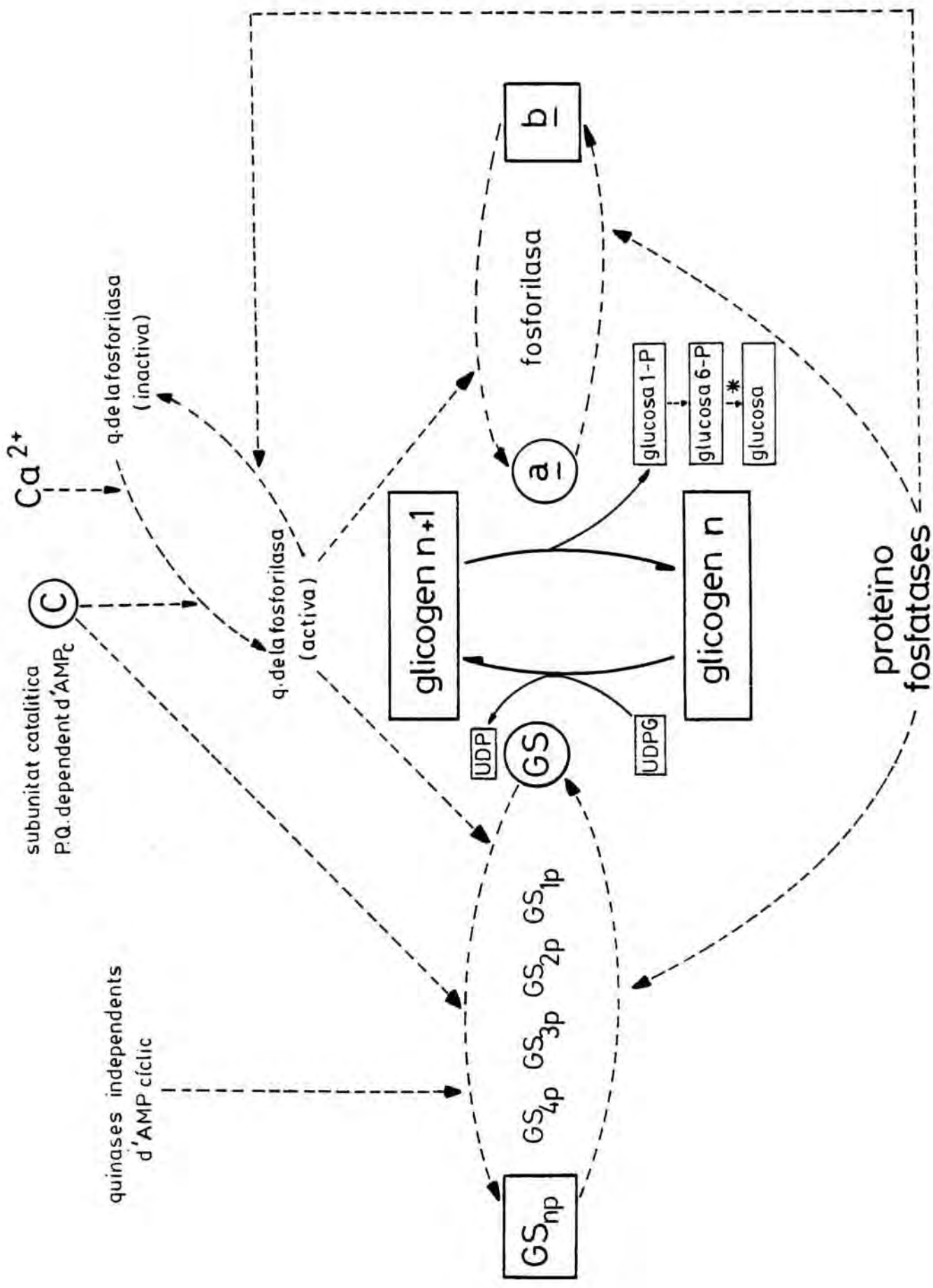
ESQUEMA I VISIÓ GENERAL DEL METABOLISME DEL GLICOGEN

Esquema elaborat sobre els coneixements que es tenen sobre el teixit muscular. Nogensmenys, les investigacions més recents sobre el teixit hepàtic es tan revelant aquesta mateixa sèrie de reaccions.

GS_np = glicogeno-sintasa fosforilada amb "n" fosfats/subunitat de l'enzim.

* = Aquest pas només té lloc en el fetge.

Pareu esment sobre la situació clau de la quina-sa de la fosforilasa que rep estimulació tant de la subunitat catalítica (C) de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic com de l'ion Ca^{2+} . Aquest enzim activat, a la vegada, controla l'activitat de la glicogeno-sintasa i la de la glicogeno-fosforilasa.



l'AMP cíclic en la regulació del metabolisme del glicogen va ésser reconeguda per primera vegada per l'equip de Sutherland(6,7), una vintena d'anys des que el grup de Larner va demostrar que hi havia dues formes de glicogeno-sintasa(anomenades originalment forma I i forma D) amb diferent activitat(8) i llur interconversió per una seqüència de reaccions de fosforilació i desfosforilació (9), i tan sols 15 anys des que la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic va ésser descoberta al laboratori de Krebs (10). Amb aquestes troballes va ésser possible bastir una teoria vàlida per a explicar la via per la qual l'epinefrina(adrenalina) estimula la degradació del glicogen al múscul esquelètic (11,12) que posteriorment s'ha fet extensiva a altres teixits i altres hormones, les quals com l'epinefrina incrementen els nivells intracel.lulars d'AMP cíclic. Per exemple, el glucagó en el fetge.

Aquesta via, que inclou una sèrie de reaccions en cascada ofereix la possibilitat d'amplificar els primers efectes produïts per l'arribada de l'hormona a la superfície cel.lular (13).

Una segona avantatge de les cascades multicícliques és la possibilitat de múltiple control. El nombre d'enzims s'incrementa a cada etapa de la cascada, i cada enzim és, potencialment, un punt separat de regulació metabòlica múltiple(13).

Fins fa poc temps, la colla d'esdeveniments que origina un increment d'AMP cíclic era l'únic mecanisme d'acció conegut de les hormones que controlen el metabolisme del glicogen sense penetrar dins la cèl.lula. Actualment, però, s'estan desvetllant d'altres. Tal com ha estat demostrat pel grup d'Exton(14,15) l'epinefrina no precisa induir la formació del nucleòtid per dur a terme els seus efectes a la cèl.lula he-

pàtica. Aquesta hormona actua gairebé exclusivament a través de receptors alfa-adrenèrgics que no estan relacionats amb la formació d'AMP cíclic en condicions normals, sinó que semblen lligats a canvis en la concentració intracel.lular de calci. Esquema II.

Si bé els mecanismes d'acció de les hormones glicogenolítiques, lluny d'ésser totalment coneguts, estan raonablement ben perfilats, resta per esbrinar el mecanisme pel qual la insulina afavoreix la síntesi de glicogen. Hi ha dues alternatives possibles: o bé la insulina pot estimular la desfosforilació de la glicogeno-sintasa i de la fosforilasa, o bé l'hormona es limita a obstaculitzar les vies glicogenolítiques a qualsevol de llurs nivells. O totes dues coses. En altra secció d'aquest capítol es detallen més extensament els mecanismes d'acció coneguts del control hormonal en el metabolisme del glicogen.

ESQUEMA II MECANISMES POSTULATS QUE CONDUEIXEN A LA GLICOGE
NOLISI EN LA CÈL·LULA HEPÀTICA.

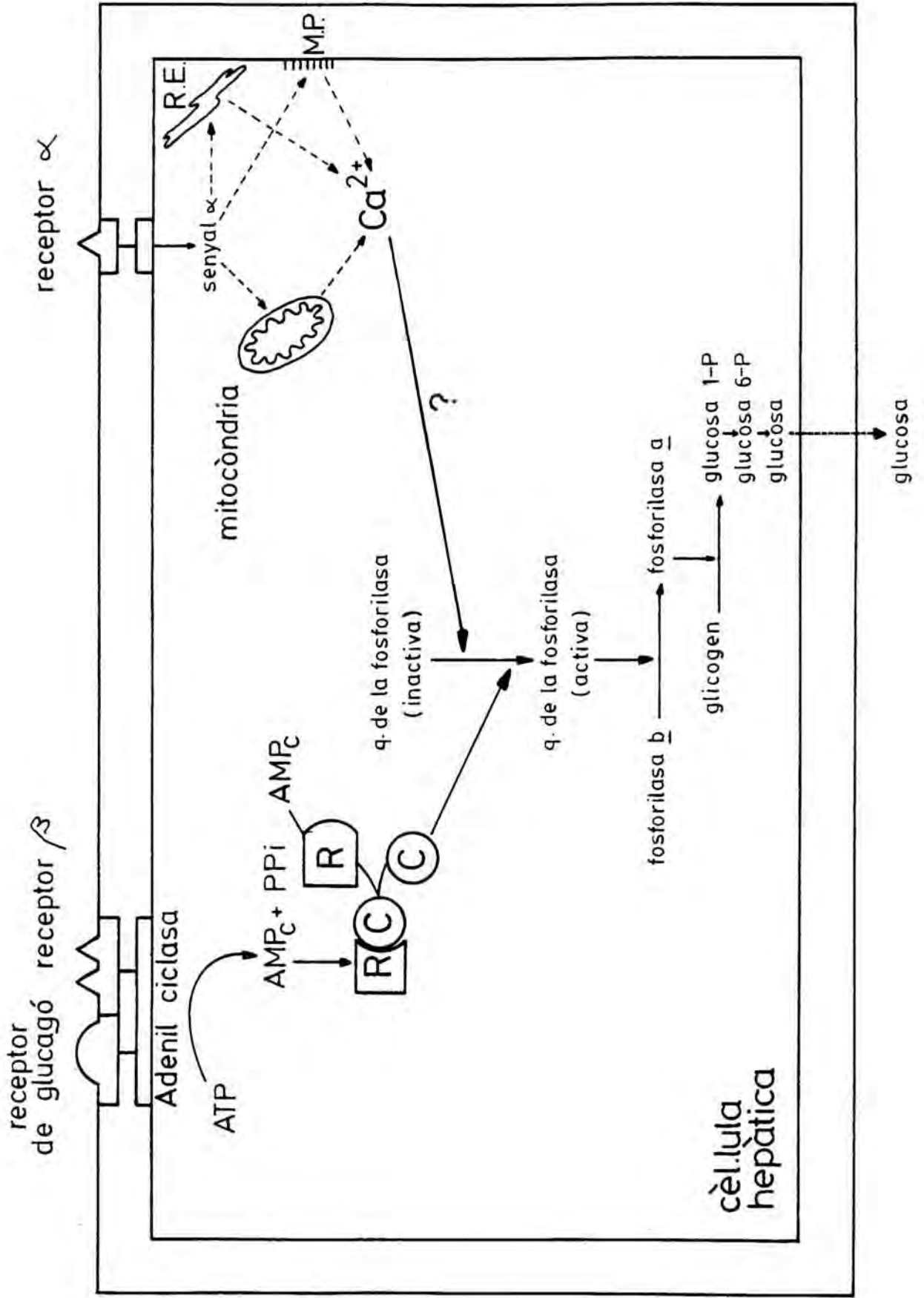
El receptor del glucagó i el beta-adrenèrgic es tan associats a l'activitat adenil-ciclasa que provoca un increment en els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic. Com a conseqüència la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid es dissocia i deixa lliure la subunitat catalítica (activa). Aquesta última activa la quinasa de la fosforilasa.

El receptor alfa-adrenèrgic se suposa estar relacionat amb algun tipus de locus, encara no ben determinat, que allibera Ca^{2+} .

R.E. = Retícul endoplasmàtic.

M.P. = Membrana plasmàtica.

Es postulat que els nivells incrementats de Ca^{2+} citosòlic poden activar la quinasa de la fosforilasa.

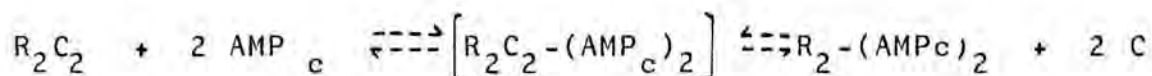


1.2. PROTEÏNO-QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC .

Històricament, la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic va ésser la primera proteïno-quinasa descrita capaç de fosforilar i inactivar la glicogeno-sintasa (9,16). Precedentment, però, s'havia demostrat la seva capacitat en activar la quinasa de la fosforilasa b (17).

L'enzim de múscul de conill està compost de dos tipus de subunitats: unes anomenades reguladores (R) i unes altres anomenades catalítiques (C) i la seva estructura nativa és un tetràmer inactiu que conté dos subunitats reguladores i dos catalítiques. Existeixen com a mínim dues activitats isoenzimàtiques d'aquesta proteïno-quinasa amb pesos moleculars de 174.000 i 170.000, respectivament, i són anomenades tipus I i II en base a llur gradient d'elució en columna de DEAE-cel.lulosa (18,19) .

Es pensa que l'activació de l'enzim és mediatitzada per la unió de dues molècules d'AMP cíclic a la subunitat R (20) amb subsegüent dissociació de l'enzim per rendir subunitats catalítiques lliures (C). Només la subunitat catalítica lliure és activa.



Hi ha evidència que la dissociació té lloc mitjançant la formació d'un complex ternari de R, C i AMP cíclic amb preferència d'una dissociació prèvia de R i C seguida de lligam de l'AMP cíclic a les subunitats R lliures (21,22).

Els dos isoenzims esmentats tenen subunitats catalítiques idèntiques (23, 24). En efecte, les subunitats catalítiques de cadascun dels isoenzims separats per isoelectroenfoc presenten igual pes molecular (40.000) i les mateixes propietats cromatogràfiques i característiques enzimològiques, és a dir són indistingibles per aquests mètodes.

Les diferències, doncs, entre els isoenzims I i II de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic semblen residir solament en llurs subunitats reguladores que es representen per R_I i R_{II} essent R_I més petita (p.m. 49.000) que R_{II} (p.m. 55.000).

Encara que les subunitats reguladores són sensibles a la degradació per proteòlisi; no sembla que R_I sigui derivat artificialment a partir de R_{II} . Una diferència addicional important és el fet que l'isoenzim II de múscul cardíac és capaç de d'autofosforilar-se, mentre que l'isoenzim I no ho és, com tampoc no ho són les subunitats catalítiques (18,25). A més els holoenzims I i II no presenten reactivitat immunològica creuada(26) encara que els holoenzims II de teixits diferents es comporten immunològicament de forma idèntica (26).

Per tant, de la proporció d'un i d'altre tipus de subunitat reguladora dependrà la proporció de formes holoenzimàtiques a la cèl.lula. Així, cada teixit presenta una proporció diferent dels holoenzims I i II (19). Cal destacar a mena d'exem

ple, que en el teixit adipós la forma predominant és l'holoenzim II davant d'una proporció de l'holoenzim I difícilment detectable. Ben al contrari, en el fetge es presenta com a forma predominant l'holoenzim I, i finalment en el múscul esquelètic la proporció entre els dos holoenzims és equilibrada. Aquesta variabilitat en la distribució dels holoenzims es manifesta, àdhuc, entre el mateix teixit provinent de diferents espècies (19).

Recentment, mercès als treballs de Potter i Taylor(27, 28,29), i d'altres (30, 31) s'ha arribat a establir moltes de les analogies i diferències entre els dos tipus de subunitats reguladores. Aquests avanços s'han esdevingut com a conseqüència de l'aplicació de la tècnica de la proteòlisi limitada que tan bons resultats ha donat en altres enzims en relació a la determinació dels dominis funcionals de les proteïnes. Així, mitjançant proteòlisi limitada amb tripsina, i quimotripsina o termolisina, s'ha arribat a obtenir les seqüències de dos dominis estructuralment diferents de la subunitat reguladora de l'holoenzim I i la del obtingut a partir de l'holoenzim II.

Les seqüències 1 i 2 dels dominis de l'holoenzim I eren respectivament:

Lys
Arg -Arg-Gly-Ala-Ile-Ser-Ala-Glu-Val-Tyr-Thr-Glu

i Val-Arg-Arg-Val-Ile-Ala-Ile

Ambdós fragments retenen la capacitat de lligar l'AMP cíclic a l'igual que ho fa el monòmer obtingut per proteòlisi de l'holoenzim II, la seqüència del qual és:

Asx-Arg-Arg-Val-Ser-Val- X -Glu.

Encara que les seqüències susceptibles de proteòlisi

de les subunitats reguladores I i II són clarament diferents, són d'altra banda homòlogues en el sentit que cada fragment conté una seqüència de caràcter bàsic doble (Arg-Arg).

El lloc d'autofosforilació de la subunitat reguladora II resideix en l'aminoàcid serina del fragment corresponent damunt descrit.

Si hom compara les seqüències aminoacídiques dels llocs de fosforilació de diferents substrats de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic incluint la seva subunitat reguladora II autofosforilable, es pot concluir que, els requeriments determinants de l'especificitat de l'acció de la subunitat catalítica són: un o dos aminoàcids de caràcter bàsic seguits de la part del carboxil terminal d'un residu hidrofòbic que precedeix al lloc de fosforilació.

El fet que en la seqüència de la subunitat reguladora I la serina estigui allunyada tres residus de l'arginina pot ésser suficient per a desplaçar la serina de la regió activa de la subunitat catalítica, cosa que explicaria per què no s'autofosforila la subunitat reguladora I (27). Respecte a aquest punt és significatiu destacar que la segona serina tant de la quinasa de la fosforilasa b com de la histona F-1, en cap cas és fosforilada mentre que la primera, que compleix els requisits de proximitat a l'arginina abans descrits, sí que ho és.

Es a dir, sembla ésser que l'estructura primària de les proteïnes-substrats és la que confereix l'especificitat d'acció a la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Un bon exemple d'aquesta afirmació ve donada pel cas de la lisozima, que en estat natiu no és substrat per la proteïno-quinasa però que una vegada alterada aquesta estructura nativa, tridimensional, sí que n'és. Un altre exemple de la influència d'alts nivells d'estructura és donat per la fosforilasa. La fosforilasa en

forma nativa no pot ésser fosforilada per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, però, si que ho és un peptid aïllat de la fosforilasa que conté el centre de fosforilació de l'enzim, concretament la serina-14.

Molt recentment, hom ha descrit que les subunitats reguladores de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic contenen dos tipus diferents de llocs d'unió per l'AMP cíclic per cadascun dels isoenzims I i II. La diferència entre aquests centres estriba en la capacitat d'alliberar l'AMP cíclic que porten lligat a una major o menor velocitat (32,33).

Els substrats sobre els quals actua la proteïno-quinasa dependent són diversos i entre ells hi troben: la quinasa de la fosforilasa b, la caseïna, la protamina(34), certes histones, la fosvitina(35), la fructosa 1,6-difosfatasa(36), la fosfodiesterasa (37), la carboxilasa de l'acetil CoA (38), la fosfofructoquinasa (39), la líasa del citrat (40), la hidroxilasa de la tirosina(41), la hidroxilasa de la fenilalanina(42) i la hidrolasa del triptofano (43) entre altres.

1.2.1. REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LA PROTEÏNO-QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC.

Per extensió, si l'AMP cíclic és capaç de dissociar i d'activar la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid "in vitro", sembla obvi que la concentració del nucleòtid pugui controlar "in vivo" l'activitat de l'enzim. A més cal fer esment per la transcendència que pot tenir sobre la regulació "in vivo", dels efectes de l'inhibidor proteic específic (44) i també dels de l'autofosforilació de la subunitat reguladora II de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (45,46).

1.2.1.1. Regulació pels nivells intracel·lulars d'AMP cíclic.

El contingut d'AMP cíclic en la majoria dels teixits és de l'ordre de 10^{-10} a 10^{-9} mols per g de teixit pes humit (47), és a dir de 10 a 100 vegades per sobre els valors de la K_a de l'enzim per l'AMP cíclic determinada "in vitro". En aquestes condicions, almenys teòricament, la proteïno-quinasa dependent hauria d'estar ja totalment dissociada, cosa que deturaria qualsevol tipus de regulació de l'enzim "in vivo". Davant d'això, alguns autors han argumentat que únicament una porció mínima de l'AMP cíclic de la cèl·lula està a l'abast de la proteïno-quinasa dependent d'ell en condicions basals, sia perquè estigui segregat per alguna estructura cel·lular (48, 49), sia perquè tant ell com l'enzim es troben en uns hipotètics compartiments separats entre si (50). Tanmateix, quan la K_a de la proteïno-quinasa per l'AMP cíclic es determina en presència de concentracions fisiològiques de l'enzim, té un valor de $1,5 \times 10^{-6}$ M, ja per damunt de les concentracions basals d'AMP cíclic en la cèl·lula, cosa que concedeix viabilitat a la regulació de l'enzim pel nucleòtid (51).

1.2.1.2. Regulació per l'inhibidor proteic.

L'inhibidor proteic (p.m.26.000) purificat per Walsh i cols. (44) que està present en els extractes crus de múscul esquelètic de conill pot causar la inactivació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (52,44). Aquest factor es comporta molecularment com a proteïna termoestable i no afecta a altres proteïnes que no siguin les dependents d'AMP cíclic (53).

La inhibició causada és de tipus no competitiu respecte

a l'ATP, a l'AMP cíclic o al substrat proteic (44). Interactua amb les subunitats catalítiques lliures, presumiblement en un centre diferent del catalític, però no afecta a les formes holoenzimàtiques (54,55). L'efecte inhibidor no és alterat per la presència d'AMP cíclic (54,55).

Segons càlculs teòrics i en teixits on aquest factor proteic és abundós com ara el cardíac, l'inhibidor podria bloquejar fins al 20% de la proteïno-quinasa total dissociada (44). El contingut és alt també en cervell i en el múscul esquelètic, però és baix al fetge i al ronyó (53,54). Aquestes dades menen a la conclusió que "in vivo" una bona part de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic que es troba dissociada pot ser bloquejada pel seu inhibidor en condicions basals.

1.2.1.3. Regulació per l'autofosforilació de la subunitat reguladora II.

La importància de l'autofosforilació de la subunitat reguladora II de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic es comença a albirar i s'apunta a continuació:

L'autofosforilació que té lloc fins i tot a baixes concentracions d'ATP, facilita la dissociació de l'holoenzim "in vitro" (56), mercès a un augment en l'afinitat per l'AMP cíclic (28). D'altra banda s'ha demostrat (57,58) que l'autofosforilació, retarda també "in vitro", la reassociació de les seves subunitats.

Recentment, s'ha demostrat la fosforilació "in vitro" de la subunitat reguladora II després de la injecció de $[^{32}\text{P}]$ -fosfat inorgànic a rates. La subunitat reguladora II, així

fosforilada, va ésser purificada a homogeneïtat a partir del teixit hepàtic, cardíac i de cervell(45).

Segons Nesterova i cols.(46) l'autofosforilació no canvia l'estructura secundària de l'enzim, sinó que altera el caràcter asimètric dels residus aromàtics de la proteïna en el centre de fosforilació que a la vegada és molt a prop del lloc d'unió de l'AMP cíclic (59). Això provoca que quan la subunitat està fosforilada, el nucleòtid estigui fermament fixat en anticonformació i llavors la dissociació és completa. D'altra banda si la subunitat no està fosforilada la unió de l'AMP cíclic no és tan estable i condueix a un estat més baix de dissociació (46).

La subunitat fosforilada és susceptible de desfosforilació tant per fosfatases endògenes com exògenes purificades. Els nucleòtids activen aquest procés i $ZnCl_2$ i NaF (inhibidor de fosfatases) l'inhibeixen (45). Amb aquestes darreres dades Uno(45) va proposar el sistema següent de regulació per part de la subunitat reguladora II:

Ja que l'ATP és mantingut a un alt nivell en cèl.lules normals, la majoria de la subunitat reguladora II hi serà fosforilada. D'altra banda, com que l'AMP cíclic està en baixa concentració, la fosfatasa no pot desfosforilar la subunitat reguladora fosforilada. Com a conseqüència d'un estímul els nivells d'AMP cíclic s'incrementen i dissocien l'isoenzim tipus II. A continuació la subunitat reguladora dissociada per l'AMP cíclic és desfosforilada per la fosfatasa.

Després que l'estímul hagi desaparegut, els nivells d'AMP cíclic són disminuïts per l'acció de la fosfodiesterasa. A més, la subunitat reguladora desfosforilada té capacitat de reassociar-se més ràpidament amb la subunitat catalítica que quan està fosforilada, cosa que facilita també una més ràpida inhi-

bició de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (45).

Aquest esquema constitueix un primer apunt d'un mecanisme de regulació per autofosforilació de la subunitat reguladora II de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic amb vestigis de tenir una gran importància fisiològica.

1.2.2. INDEX DE L'ESTAT D'ACTIVACIÓ DE LA PROTEINO-QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC. PRECAUCIONS EN L'EXTRACCIÓ.

El lligam de l'AMP cíclic a la proteïno-quinasa d'aquest nucleòtid provoca un canvi conformacional que debilita la interacció entre les subunitats reguladores i catalítiques i condueix a la dissociació i ulterior activació de l'enzim. Viceversa, la inactivació de la proteïno-quinasa implicarà no solament la disminució en els nivells de l'activador sinó també la reassociació de les subunitats.

D'altra banda cal remarcar que és inconcebible trobar condicions d'extracció de l'enzim que "immobilitzen" el lligam de l'activador a la proteïna i que posteriorment permeteixen observar una activació allostèrica produïda "in vivo" mitjançant l'assaig de l'activitat enzimàtica "in vitro".

Ara bé, el que sí hom ha pogut aconseguir, en el cas de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, és endegar les condicions necessàries per tal d'immobilitzar l'estat d'associació-dissociació de l'enzim durant l'extracció. Aquestes condicions són diferents dependent dels isoenzims que preferentment contingui el teixit objecte d'estudi.

Així, per teixits que contenen preferentment l'isoenzim II, Corbin i cols. (19) van proposar fer l'extracció en un medi

que contingués 0,05 M NaF i 0,5 M NaCl. Sota aquestes condicions la reassociació de l'enzim a 0°C és bloquejada(19), mentre que en absència de l'alta concentració salina té lloc una ràpida reassociació. Al contrari, l'isoenzim I es distingeix de l'isoenzim II en ésser dissociat per l'alta concentració de NaCl. Així pel cas de teixits que contenen preferentment l'isoenzim I, com ara l'hepàtic, el manteniment de l'estat de dissociació s'aconsegueix en base al fet que no es produeix la reassociació a 0°C. Per teixits que contenen ambdós enzims, l'extracció es fa amb una concentració de NaCl intermitja (19, 60).

Subseqüentment a l'extracció, i assumint que l'estat d'associació-dissociació ha estat estabilitzat, es determina el grau de dependència a l'AMP cíclic. Aquesta dependència sovint s'expressa mitjançant la relació d'activitats $-AMPc/+AMPc$ que reflecteix la quantitat de subunitat catalítica lliure respecte a la de l'holoenzim.

Aquesta relació d'activitats és un bon tipus de mesura de l'estat d'activació de l'enzim (61), sempre que es compleixin els tres requisits següents:

1 i 2) els abans esmentats, és a dir, evitar la reassociació i dissociació entre subunitats de l'enzim durant l'extracció .

i 3) la relació d'activitats així determinada no ha de reflectir la concentració d'altres components endògens que no siguin la mateixa proteïno-quinasa. A tal efecte Walsh i cols(62) recomanen la utilització de Norita (10 mg/ml) en la solució d'extracció a fi d'evitar una ulterior activació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic per part de la concentració endògena d'aquest nucleòtid.

La utilització o no de la Norita, però, condueix només a lleugeres diferències d'increment en l'estat d'activació de

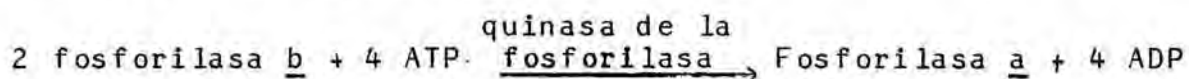
la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Així, en teixit cardíac l'epinefrina 4×10^{-7} M, provoca pràcticament el mateix increment en la relació d'activitats de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic tant en homogenats preparats en presència de Norita com en la seva absència, cosa que indica que realment l'efecte activador de l'hormona es produeix a l'interior de la cèl.lula mentre aquesta està intacta (61).

Finalment, Corbin i cols.(19) proposaren altra consideració a tenir en compte en el moment de determinar les variacions en l'estat d'activació de la proteïno-quinasa mitjançant la relació d'activitats -AMPc/+AMPc. Aquesta era la de minimitzar l'efecte de l'activitat fosfodiesterasa de l'AMP cíclic especialment quan l'efector estudiat és capaç de modificar aquest darrer enzim. Per tal d'inhibir l'efecte de la fosfodiesterasa hom ha utilitzat inhibidors d'aquest enzim com ara la metil-isobutilxantina, la teofilina o la cafeïna en el medi d'extracció. Si aquesta precaució no era presa l'hidròlisi de l'AMP cíclic en els extractes, després de l'homogeneïtzació i abans de l'assaig de l'activitat enzimàtica, podria introduir una font d'error en la determinació de l'estat d'activació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

Alternativament a la determinació del grau de dependència a l'AMP cíclic, pot determinar-se directament l'estat de dissociació-associació dels isoenzims mitjançant el mètode de Guinovart i cols.(63) basat en la separació electroforètica en gel de poliacrilamida de les diferents espècies moleculars i posteriorment revelat sobre el gel basat en la capacitat per part de subunitats reguladores de fixar $[^3\text{H}]\text{AMP}$ cíclic. Aquest mètode té l'avantatge de permetre visualitzar directament els canvis en les diferents espècies moleculars provocats per un determinat efector.

1.3. QUINASA DE LA FOSFORILASA ,

La quinasa de la fosforilasa és un enzim que forma part de la cadena de degradació del glicogen. Per la quinasa de la fosforilasa de múscul es pot escriure:



La fosforilasa muscular al fosforilar-se s'activa i passa d'una forma anomenada b (no fosforilada) a una forma a (fosforilada). La fosforilasa a és la forma activa "in vivo" i és la responsable de la degradació del glicogen.

1.3.1. QUINASA DE LA FOSFORILASA MUSCULAR.

La quinasa de la fosforilasa més detalladament estudiada ha estat la procedent de múscul esquelètic de conill (64,65). Aquest enzim muscular té un pes molecular de $1,3 \times 10^6$ daltons

i està compost de subunitats diferents (66,67).

Inicialment, es van descobrir 3 subunitats: alfa, beta i gamma amb els pesos moleculars següents: alfa)118.000-145.000 beta) 107.000-136.000; i gamma)40.000 - 45.000 daltons , respectivament (66,67,68).

Recentment Cohen i cols. (69) van demostrar la presència d'un quart component més petit, anomenat subunitat delta. El component delta, de pes molecular 17.000, sembla ésser molt similar sinó igual a la proteïna reguladora dependent de calci, calmodulina, que confereix sensibilitat pel calci a determinats sistemes enzimàtics (70,71).

Grand i cols.(72) han demostrat recentment que la seqüència de la subunitat delta(148 aminoàcids) és idèntica a la calmodulina d'úter i es diferencia de la de cervell solament en dues formes amídiques dels residus 24 i 135 de la seqüència. Així, en la calmodulina de cervell el residu 24 és l'asparagina i el 35 l'àcid glutàmic mentre que en la subunitat delta de la quinasa de la fosforilasa de múscul de conill són l'àcid aspàrtic i glutamina, respectivament.

Malgrat petites diferències respecte a la proporció relativa de les subunitats alfa, beta i gamma, avui dia sembla acceptat que l'estequiometria és alfa:beta:gamma =1:1:1. Tenint en compte la quantitat equimolecular del component delta, l'estructura de l'enzim és (alfa,beta,gamma,delta)₄.

La quinasa de la fosforilasa purificada a partir d'una barreja muscular de conill conté un altre polipèptid anomenat alfa prima, amb un pes molecular lleugerament menor que el de la subunitat alfa(66,73). Ara es coneix que l'existència d'alfa prima està associada a una varietat genètica de l'enzim (73). L'isoenzim que conté la subunitat alfa prima és carac-

terístic del múscul de fibra roja. Molt recentment, Sharma i cols.(74) han pogut separar (alfa, beta, gamma, delta)₄ d'(alfa prima, beta, gamma, delta)₄ mitjançant cromatografia en calmodulina-sefarosa.

1.3.1.1. Regulació de l'activitat de la quinasa de la fosforilasa.

Existeixen diversos factors que determinen l'activitat de la quinasa de la fosforilasa b muscular, Aquests són: el pH, la concentració de calci, la fosforilació covalent, la proteòlisi parcial i la calmodulina.

1.3.1.1.1. pH i concentració de Ca⁺⁺

En presència de calci i de concentracions òptimes d'ATP-Mg, la forma b (inactiva) presenta poca activitat a pH 6,8 en comparació a la que presenta a pH 8,2. La relació d'activitats a pH 6,8 respecte a la de pH 8,2 de la forma b, és de 0,01 a 0,02. La forma a presenta en canvi una relació d'activitats de 0,3 a 0,4. essent 50 vegades més activa que la forma b (66).

L'ion calci és essencial per l'activitat de l'enzim essent la concentració necessària per assolir l'activació meitat de la màxima entre 10^{-7} i 10^{-6} M (64,65).

1.3.1.1.2. Fosforilació covalent.

La quinasa de la fosforilasa és un substrat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. La fosforilació té lloc en sengles subunitats alfa i beta, però no en la gamma, cosa que provoca un increment concomitant en l'activitat de l'enzim mesurada per la relació d'activitats a pH 6,8/8,2.

L'estequiometria de la fosforilació no està ben definida. Si bé certs autors (66,75,76) reporten la incorporació d'un fofat per subunitat(alfa o beta) altres han observat, sota condicions específiques, una incorporació de 5-7 fofats per subunitat especialment en l'alfa(76).

S'ha establert certa controvèrsia en relació a quina subunitat, darrera fosforilació, és la responsable de l'activació de l'enzim. Cohen (66) argüeix per una correlació entre fosforilació de la subunitat beta i activació, mentre que Hayakawa i cols(75) no l'observà tan clarament. Així mateix Cohen i Antoniow (77) consideren que la fosforilació de la subunitat alfa altera la conformació de la quinasa de la fosforilasa de tal manera que la desfosforilació de la subunitat beta és facilitada, però aquest mecanisme encara espera una confirmació final. Molts detalls resten d'ésser esbrinats però el fet bàsic és que la quinasa de la fosforilasa pot ésser realment fosforilada per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

La quinasa de la fosforilasa també pot fosforilar-se d'altres maneres. Així, l'enzim és capaç de sofrir autoregulació per la pròpia activitat catalítica sobre les subunitats alfa i beta(78,79). El resultat és un gran nivell de fosforilació(79, 80) i conseqüentment l'activació de l'enzim, encara que no es coneix si aquest fet pot arribar a jugar un paper fisiològic.

A més, existeixen dues proteïno-quinases dependents de GMP cíclic de pulmó (81,82) i la proteïno-quinasa dependent de Ca^{++} de cervell estudiada per Nishizuka i cols. (83).

1.3.1.1.3. Proteòlisi

Altra via d'activació de la quinasa de la fosforilasa és la proteòlisi. L'efecte de la tripsina, que ha estat el més estudiat, es tradueix en una activació de l'enzim quan l'activitat d'aquesta es mesurada per la relació d'activitats a pH 6,8/8,2. La tripsina produeix, concomitantment a l'activació, la degradació de les subunitats alfa i beta(66,75) sense efecte aparent sobre les subunitats gamma o delta(66,68,75). Ja que aparentment la subunitat alfa és la primera en ésser degradada, s'ha suggerit que l'activació de l'enzim es correlaciona amb l'alliberament d'un constrenyiment de l'estructura nativa imposada per la subunitat alfa (64).

1.3.1.1.4. Calmodulina i subunitat delta.

Posteriorment al descobriment de la subunitat delta de la quinasa de la fosforilasa (69) va ésser observat que l'addició de calmodulina, en presència de calci, causava l'estimulació de l'activitat(69,84,85). Això provocà el dilema de quina era la relació entre calmodulina, subunitat delta i l'activació de l'enzim.

Mercès als últims treballs s'han aconseguit establir diferències característiques en el mecanisme d'acció de l'enzim per aquests dos efectors. Succintament, la quinasa de la fosforilasa conté calmodulina en forma de subunitat delta en quantitat equimolecular amb les altres subunitats i que està lligada fortament a la subunitat gamma de l'enzim, fins i tot en absència de calci perquè és part integrant de la proteïna. Potencialment la unió de calci a aquesta subunitat mediatitza l'activació de l'enzim. A més hi ha un segon lloc en les subunitats

alfa i beta (86) on la calmodulina afegida s'uneix, igualment d'una manera equimolecular amb les subunitats alfa, beta i gamma, i activa l'enzim. Aquesta unió és més feble i pot ésser, a diferència de la subunitat delta, eliminada tant per absència de l'ion calci, trifluoperazina (droga fenotiazínica) o per proteòlisi parcial de la quinasa de la fosforilasa amb tripsina. És a dir, es proposa una activació dual pel calci sobre la quinasa de la fosforilasa muscular: a) directament per interacció amb la subunitat delta i b) per mediació de l'addició de calmodulina.

Recentment Cohen i cols.(69) han demostrat que la Troponina C, que és també semblant a la subunitat delta per tenir una seqüència similar i ésser activada per concentracions micromolars de calci, pot assolir l'efecte de la calmodulina afegida sobre l'activitat de l'enzim. Això condueix a una implicació interessant per la possibilitat que "in vivo" la Troponina pugui lligar-se a la quinasa de la fosforilasa i d'aquesta manera establir una connexió entre l'aparat contràctil i l'enzim del metabolisme del glicogen.

1.3.1.1.5. Estimulació de l'activitat per solvents orgànics.

Recentment, ha estat descrit per Singh i Wang(88) un nou tipus d'activació de la quinasa de la fosforilasa diferent al provocat per fosforilació o per proteòlisi limitada damunt descrites. Aquesta activació és l'observada com a resposta a una gran sèrie de dissolvents orgànics com metanol, 1-propanol, metil-isobutil cetona, format etílic, formamida, etanol, 2-propanol, tetrahidrofurano i acetona entre altres. L'activació provocada anava des de tres vegades per efecte del metanol a 28 vegades per efecte de l'acetona, quan ambdós dissolvents eren

incubats a una concentració de 1 M. Amb certs dissolvents a determinades concentracions s'assolien activacions de l'ordre de les produïdes per fosforilació covalent. Així, etanol 1,72 M produí una activació de 45 vegades sobre el valor basal en comparació a les 40 vegades d'activació que s'observà pel procés de fosforilació covalent.

Es pensa que els dissolvents introdueixen canvis en les propietats físiques del medi de reacció que indueixen en la quinasa de la fosforilasa una nova conformació de més alta activitat intrínseca (88). En presència d'aquests dissolvents no es perd la dependència dels ions calci per expressar l'activitat ni la capacitat de fosforilació de la caseïna o la de la propia autofosforilació. Aquests resultats són interessants pel que fa al descobriment d'un nou tipus d'activació de la quinasa de la fosforilasa per una via no covalent, encara que es desconeixi el paper fisiològic que pugui jugar aquest tipus d'activació car les concentracions utilitzades eren realment molt elevades.

1.3.1.2. Localització del centre actiu.

A despit del gran coneixement que es frueix sobre la quinasa de la fosforilasa muscular, resta per esbrinar quina és la localització i la identitat de la subunitat catalítica que conté el centre actiu. Fins l'actualitat s'ha suggerit que tant les subunitats α com les beta poden contenir-lo (89). Fischer i cols. (89) són els majors defensors de la tesi que adreça el centre actiu a la subunitat beta. Aquests autors basen la seva teoria en el fet que la subunitat gamma no sofreix fosforilació i en l'aïllament d'un fragment radiactiu de la subunitat beta a partir de la quinasa de la fosforilasa fosforilada amb $[^{32}\text{P}]$ -gamma-ATP. Gulyaeva i cols. (90) també arriben a la mateixa

conclusió.

D'altra banda Graves i cols.(91) van obtenir una subunitat gamma purificada, essencialment lliure de la subunitats alfa i beta, amb un alt grau d'activitat que no requeria calci per la seva activitat. Aquests autors conclouen que el centre actiu resideix en la subunitat gamma.

Davant d'aquest dilema respecte a l'adreçament del centre actiu en la quinasa de la fosforilasa es planteja la possibilitat, d'altra banda aportada per Drickneite i cols.(92), que la quinasa de la fosforilasa contingui més d'un centre actiu.

1.3.1.3. Especificitat de substrat.

La quinasa de la fosforilasa va ésser descoberta per la seva capacitat de fosforilar i activar la glicogeno fosforilasa (93). Subseqüentment es va reportar la seva capacitat en fosforilar la caseïna (78) i molt especialment la k-caseïna(94).

Posteriorment, es va descriure que les troponines I i T podien ésser fosforilades per la quinasa de la fosforilasa. Addicionalment, l'enzim pot autofosforilar-se en les subunitats alfa i beta (94). Realment la quinasa de la fosforilasa sembla ésser molt més restringida en la seva especificitat de substrat que la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

Per últim la quinasa de la fosforilasa s'ha vist que és capaç de fosforilar i inactivar la glicogeno-sintasa fet que deixa oberta una ampla gama de possibilitats en l'estudi de la regulació del metabolisme del glicogen. Aquesta troballa feta per Roach i cols.(95) va ésser subseqüentment corroborada en els laboratoris de Cohen (95), Reimann i Schlender (97) i

Soderling (98).

1.3.1.4. Desfosforilació de la quinasa de la fosforilasa.

La reversió de la fosforilació de la quinasa de la fosforilasa és realitzada per activitats fosfatàsiques. Ha estat indicat (99) que les subunitats alfa i beta de la quinasa de la fosforilasa són desfosforilades per dos enzims diferents de pesos moleculars 32.000 i 33.500. Encara que sengles fosfatases tenen capacitat simultània en desfosforilar tant la subunitat beta com l'alfa de la quinasa de la fosforilasa, la fosfatasa de pes molecular 32.000 allibera fosfat de la subunitat beta 100 vegades més ràpidament que de la subunitat alfa. Al contrari, la fosfatasa de pes molecular 32.500 té una major especificitat en desfosforilar la subunitat alfa que la beta. Aquestes fosfatases tenen un significat fisiològic encara poc conegut.

1.3.2. QUINASA DE LA FOSFORILASA HEPÀTICA.

A hores d'ara són poques les dades que es coneixen sobre la quinasa de la fosforilasa hepàtica. Per gairebé la majoria dels investigadors la quinasa de la fosforilasa muscular ha estat un model en la recerca de les propietats de l'enzim hepàtic. Evidentment, encara que existeixin diferències significatives hi han característiques comuns com l'activació de l'enzim per part de l'ion calci i per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic que fan albirar quin paper pot desenvolupar aquest enzim en el control hepàtic del metabolisme del glicogen.

Estudis de sistemes hepàtics parcialment purificats

(100,101) revelaren un cert grau d'estimulació per part de l'ion calci sobre l'activitat quinasa de la fosforilasa, encara que l'extensió de l'estimulació era molt inferior a l'observada per l'enzim muscular. També, en experiments portats a terme en extractes crus es va percebre una activació de la fosforilasa via AMP cíclic on es suggeria la participació i activació de la quinasa de la fosforilasa (102). Més recentment, Chrisman i Exton (103) descriuen la presència d'una quinasa de la fosforilasa en la fracció de glicogen hepàtic que era fortament inhibida per EGTA i estimulada per l'acció de la subunitat catalítica de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

També, hom ha realitzat avanços en la purificació de la quinasa de la fosforilasa. Així Sakai i cols. (104) i Vandenhede i cols (105), reportaren la purificació de formes d'alt pes molecular de l'enzim a partir de fetge de conill i de rata, respectivament. Ambdós grups d'investigadors observaren l'estimulació de l'enzim per calci però diferien en altre punt important. Sakai i cols. (104) no pogueren demostrar l'activació de l'enzim per l'acció de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Contràriament l'enzim hepàtic de rata purificat per Vandenhede i cols. (105) sí era activat per la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid i, a més, paral·lelament a l'activació, s'observava la incorporació de fosfat en polipeptids que tenien la mateixa mobilitat electroforètica que les subunitats alfa i beta de la quinasa de la fosforilasa muscular.

Sakai i cols.(104) van ésser els primers en plantejar el problema important relacionat amb la proteòlisi de l'enzim. Així purificaren dues formes de quinasa de la fosforilasa anomenades quinasa I i quinasa II. La quinasa I tenia un pes molecular d' $1,3 \times 10^6$, i la quinasa II, que es separada per filtració per gel, era més petita amb un pes molecular aproximat de 110.000. La incubació de la quinasa I amb extractes lisosomals generava la quinasa II, amb una pèrdua corresponent

de quinasa I. Diversos inhibidors de proteases: leupeptina, quimostatina, antipaina i iodoacetat bloquejaven aquesta conversió. D'altra banda la proteòlisi de l'enzim, per exemple amb tripsina conduïa a un increment del 60 % en l'activitat de l'enzim. Aquests resultats suggerien que la forma més petita de l'enzim (quinasa II) era probablement un derivat proteolític de la quinasa I. La proteasa lisosomal responsable de la proteòlisi en els extractes sembla ésser la catepsina B (106).

La proteòlisi de l'enzim pot explicar, almenys en part, els resultats obtinguts per Chrisman i cols (107). Aquests autors purificaren i arribaren a obtenir diverses espècies de quinasa de la fosforilasa dependentment del mètode de purificació. D'altra banda aïllaren espècies de baix pes molecular (35.000) que no eren activades ni per calci ni per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. També obtingueren una espècie de pes molecular més gran (200.000), l'activitat de la qual si que era activada per calci encara que no per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. A més, la ulterior espècie de l'enzim contenia una subunitat de 80.000 daltons de pes molecular. Semble ésser doncs, que la purificació de l'enzim representa un pas difícil en mira de mantenir la integritat de la molècula i les seves característiques de control. Tanmateix, el reconeixement dels problemes introduïts per la proteòlisi serà d'ajut en les futures investigacions.

Existeixen, però, diferències fonamentals amb la quinasa de la fosforilasa muscular. Així, no ha estat descrita la presència de calmodulina en l'enzim hepàtic ni tampoc s'ha observat inhibició de l'enzim per fenotiazines. Tot i així Livanova i cols. (108) han reportat que l'addició de calmodulina no totalment purificada de fetge incrementa tres vegades l'activitat de la quinasa de la fosforilasa hepàtica. Addicionalment, encara que aquesta activitat era independent de calci, l'EGTA a una concentració de 5 mM inhibia l'activitat original en un 30%.

No es coneix si l'enzim hepàtic conté una subunitat de lta . De fet no necessàriament l'enzim ha d'ésser una rèplica exacta del seu homòleg muscular. Molt recentment, s'ha descrit l'estimulació de l'activitat de la quinasa de la fosforilasa per baixes concentracions d'heparina amb una potència d'activació semblant a la produïda per fosforilació covalent (109). Aquest fet pot tenir una encara no ben establerta significança "in vivo".

L'activació de la quinasa de la fosforilasa hepàtica ha estat observada després del tractament dels hepatòcits amb agents que incrementen l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic com ara el glucagó i l'epinefrina a molt altes concentracions (110,111). En aquest punt, cal destacar que el primer coneixement de l'activació de l'enzim hepàtic pel glucagó no va venir fins que l'homogeneïtzació i la determinació de l'activitat enzimàtica no es féu en presència de l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (110). Si l'inhibidor no hi era present l'activitat en els controls era tant alta com després del tractament de les cèl.lules amb glucagó i per tant no podia detectar-se cap activació.

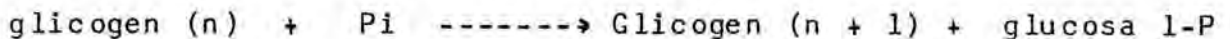
Cal fer esment , també , que fins ara no s'ha pogut detectar cap activació d'aquest enzim per efecte d'agents que incrementen l'activitat de la fosforilasa mitjançant mecanismes de "mobilització" de l'ion calci intracel.lular, ja siguin purament alfa-adrenèrgics (fenilefrina) o d'altres (vasopresina, angiotensina II).

Són altament interessants els resultats obtinguts en hepatòcits de rates deficientes en quinasa de la fosforilasa (rates gsd/gsd)(112). La incubació d'aquests hepatòcits amb fenilefrina o vasopresina produïa la mateixa mobilització de l'ion calci que en hepatòcits de rates normals, però no es detectava cap activació de la fosforilasa. Actualment existeixen, de fet,

molts resultats indirectes (112,100,113) que suggereixen fortament la hipòtesi d'un mecanisme d'activació de la quinasa de la fosforilasa per calci. Ara bé, fins ara no es té prova directe de l'activació de l'enzim per aquests agents que activen la glicogenòlisi i una mobilització concomitant de calci .

1.4. GLICOGENO-FOSFORILASA .

La glicogeno fosforilasa o simplement fosforilasa, catalitza la reacció següent:



on (n) representa el nombre de residus glucosílics que conté la molècula de polisacàrid. Malgrat que la reacció és reversible "in vitro", "in vivo" transcorre gairebé enterament en el sentit de la glicogenòlisi. Els estudis sobre les característiques d'aquesta proteïna enzimàtica han estat facilitats pel fet que l'enzim del teixit muscular pot ésser obtingut en forma cristal·lina sense grans dificultats. Els coneixements sobre l'enzim procedent d'altres teixits són més limitats que en el cas de l'enzim muscular.

1.4.1. GLICOGENO-FOSFORILASA MUSCULAR.

1.4.1.1. Estructura i propietats de la fosforilasa de múscul esquelètic.

La fosforilasa de múscul de conill existeix en dues formes moleculars (114,115). La fosforilasa b que és un dímer de pes molecular 200.000 essencialment inactiu en absència d'AMP i la fosforilasa a que és un tetràmer de 400.000 daltons, que és la forma fosforilada i activa en absència d'efectors. Es coneix tant la seqüència (116) com l'estructura de l'enzim (117,118).

La conversió de la forma b en la forma a es produeix per fosforilació de l'enzim, reacció que és catalitzada per la quinasa de la fosforilasa (119). La reacció inversa, el pas de la forma a a la b, és catalitzada per l'acció de la fosfatasa de la fosforilasa (115,120).

1.4.1.2. Els centres reguladors de l'activitat de l'enzim.

La fosforilasa és un enzim regulador amb multiplicitat de centres funcionals en les subunitats que la constitueixen i cadascun d'ells és responsable d'algun aspecte de l'activitat de l'enzim o del seu control.

Els centres principals són: 1) el catalític; 2) el d'activació alostèrica; 3) el d'inactivació; 4) el fosforilable; 5) el que fixa piridoxal-fosfat i 6) almenys dos centres d'agregació entre les subunitats que regulen la formació de les formes dimèriques i tetramèriques, respectivament.

El centre catalític o actiu fixa els tres components, glicogen, fosfat-inorgànic i glucosa 1-P, de la reacció catalitzada per la fosforilasa, i a més, alguns inhibidors com ara

la glucosa (117), 2-desoxiglucosa (121), UDP-glucosa (122), 1,5-anhidroglucitol (123) alfa-metil glucòsido (124) i fructosa 1-P(125).

L'AMP és un activador obligat de la glicogeno-fosforilasa muscular (118) i exerceix la seva acció per interacció amb el centre alostèric d'activació de l'enzim. L'AMP és essencial per l'activitat de la fosforilasa b i activa lleugerament la fosforilasa a. L'AMP indueix un canvi conformacional que aparentment redueix la Km pel glicogen, el fosfat i la glucosa-1-P (126,127). Al contrari l'ATP provoca un decreixement en l'activitat de la fosforilasa per competició directe amb l'AMP.

Recentment s'ha observat que existeix un centre diferent del d'activació alostèric que regula la inactivació de l'enzim i que s'anomena centre dels nucleòsids (128). Aquest centre es localitza a 30 Å del centre alostèric per l'AMP, lliga efectivament l'IMP, nucleòsids i purines com ara la cafeïna i la teofilina i provoca una efecte inhibidor de l'enzim. Tant la glucosa com la cafeïna actuen sinèrgicament sobre el mateix centre (128) però la cafeïna condueix a canvis més notables que els produïts per la glucosa sola i fins i tot pot exercir un efecte semblant a un modificador fisiològic (129).

La fosforilació d'un sol residu de serina per part de la quinasa de la fosforilasa converteix la fosforilasa b en a (119). Totes les formes de la fosforilasa estudiades des de el punt de vista de la fosforilació, siguin musculars o hepàtiques, presenten seqüències d'aminoàcids molt similars en els corresponents centres fosforilables (130,131) i tenen el residu de serina-14 que fixa el fosfat entre dos aminoàcids hidrofòbics situats a prop d'aminoàcids de caràcter bàsic. El centre fosforilable té una situació bastant cap a l'exterior de l'estructura de la molècula, car és fàcilment atacable per enzims proteolítics com per exemple la tripsina (132). L'acció de la trip

sina condueix a la formació d'una forma dímera de la fosforilasa, forma b', que encara és activable per l'AMP.

El piridoxal fosfat és un grup que està covalentment fixat a la estructura proteica de la fosforilasa per la Lys-679, i que actua com a cofactor en la seva catàlisi. La funció exacta d'aquest grup està rebent gran atenció en l'actualitat (133, 134, 135, 136). La forma activa del cofactor sembla ésser una forma protonada del mateix cofactor o alternativament un anion fortament constrenyit (133) i no mòvil com havia estat proposat anteriorment. No sembla que el fosfat del cofactor interaccioni per a formar un intermediari glucosil-enzim ni tan sols durant la catàlisi. Al contrari, sí que hi ha evidència que hi hagi una interacció directa fosfat-fosfat entre piridoxal-fosfat i substrat (glucosa 1-P) en la reacció reversible de la glicogeno-fosforilasa. Així, l'efecte real catalític del cofactor vindria donat per la interacció entre fosfats. Segons aquesta teoria les cargues positives en el centre actiu poden constrenyir el coenzim-fosfat en una configuració que conduïria a un fòsfor electrofílic que a la vegada facilitaria l'atac nucleofílic per part del substrat-fosfat. Com a conseqüència, el lligam de la glucosa al seu fosfat es debilitaria per la formació d'un intermediari de transició de pirofosfat, i la glucosa seria transferida a la cadena de glicogen (136).

D'altra banda el piridoxal també sembla jugar un paper important en el control de la desfosforilació de la fosforilasa a. Així, Yan i cols. (135) recentement han descrit que l'estat iònic de la posició 5' del piridoxal-fosfat és particularment important per a la regulació de desfosforilació tant per glucosa com per cafeïna.

1.4.1.3. Propietats enzimàtiques.

L'equilibri de la reacció catalitzada per la fosforilasa s'assoleix quan la reacció fosfat/glucosa 1-P, a pH 6,8 és igual a 3,6 (137).

Malgrat que existeix la possibilitat de síntesi de glicogen per la fosforilasa "in vitro", sembla segur que sota condicions fisiològiques la reacció funciona gairebé enterament en el sentit de la glicogenòlisi com ho prova el fet que l'administració d'agents com l'epinefrina, que activen la fosforilasa "in vivo" produeix sempre un estímul de la degradació del glicogen (138) i mai de la síntesi.

Han estat trobats molts compostos amb capacitat d'afectar l'activitat de la fosforilasa. Ho fan a través de diferents centres: el catalític, el centre de l'activador allostèric i el centre dels nucleòsids.

Per exemple ha estat recentment descrit (139) l'efecte d'estimulació sobre l'activitat de la fosforilasa per solvents com ara metanol, etanol, glicerol, etilen-glicol, 1,2-propanodiol, 2-metoxietanol, 1,2-dimetoxietà, trimetilortoformiat, 2-butoxi-etanol, acetona, dimetilsulfòxid i dioxà entre altres. L'efecte més potent fou assolit pel 1,2-dimetoxietà al 10 %. L'acció d'aquests solvents és mediatitzada per una alteració a nivell dels centres d'unió dels nucleòtids. Així el 1,2-dimetoxietà (10 %) provocà una disminució de la K_a per l'AMP de 10 vegades mentre que la K_i per la cafeïna era incrementada en sis vegades.

D'altra banda les polimixines A, B, D i E, estimulen l'activitat dependent d'AMP de la fosforilasa b (140). Aquests antibiòtics provoquen llur efecte per: a) desensibilització de les interaccions dirigides cap a l'AMP; b) per decreixença de la K_m pels substrats, glicogen i glucosa 1-P; i c) per reversió de l'efecte inhibitor de la glucosa 6-P.

L'estimulació de l'activitat de la fosforilasa, tant per solvents orgànics com per polimixines, depèn en un alt grau de l'estat d'activació de l'enzim. Així, la fosforilasa b és altament estimulada, i la forma a ho és en poca extensió.

Cal entendre, doncs, que la regulació alostèrica de l'enzim no dependrà únicament de la concentració d'AMP sinó que també estarà afectada en gran part per la concentració particular de cada substrat, per les dels efectors, especialment l'ATP i la glucosa 6-P que es comporten com a inhibidors alostèrics (141,142) i per la de certs cations divalents (143). La glucosa que ha estat descrita com a modulador de l'activitat de l'enzim, exerceix un efecte inhibitor "in vitro" sobre la forma a (126). La glucosa també ha estat presentada com a estimuladora de la conversió de la forma a en la b en la reacció catalitzada per la fosfatasa de la fosforilasa (144). Ara bé, els efectes de la glucosa no semblen tenir un valor fisiològic al múscul, car aquest teixit conté molt poca glucosa lliure en condicions normals(145).

1.4.2. FOSFORILASA DEL TEIXIT HEPÀTIC.

Tal com succeix amb altres enzims del metabolisme del glicogen, el nivell de coneixements que hi ha sobre les formes hepàtiques de la fosforilasa és més escàs que el que hi ha sobre les formes de múscul esquelètic.

La fosforilasa hepàtica té diferències notables respecte a la muscular. Es presenta en una forma inactiva b que passa a una altra activa a per fosforilació (146) però sense que el fenomen cursi amb l'agregació de subunitats. La forma inactiva de l'enzim és molt poc estimulable per l'AMP mentre que l'activitat de la forma a és augmentada un 40 % pel nucleòtid (146).

El pes molecular de la fosforilasa hepàtica de conill (185.000) és inferior al de l'enzim de múscul esquelètic del mateix animal (200.000) (130). En canvi, la seqüència d'aminoàcids del centre fosforilable presenta les mateixes característiques en ambdós casos (130).

Ha estat demostrada la inactivació de la fosforilasa hepàtica per l'addició de glucosa als extractes (147). La glucosa també té un efecte inhibitor sobre la fosforilasa a, almenys "in vitro", en provocar la disminució de l'afinitat pels seus substrats i també en estimular el pas de la forma a a la b en la reacció catalitzada per una fosfatasa de la fosforilasa (148).

L'AMP, malgrat que estimula poc l'activitat de la fosforilasa b hepàtica, limita aquests efectes de la glucosa (148).

L'activitat de la glicogeno-fosforilasa és modificada després de la incubació d'hepatòcits o de la infusió de fetges amb diferents efectors. Així la fosforilasa hepàtica és activada per sucres (fructosa) (149), inhibidors metabòlics (iodoacetat, 2,4-dinitrofenol, cianur) (150, 151) i per hormones glicogenolítiques, sia per un mecanisme dependent d'AMP cíclic (glucagó, epinefrina) (15, 152) o independent d'aquest nucleòtid (vasopresina, fenilefrina i angiotensina II) (153, 60). La injecció d'insulina a conills provoca una inactivació de l'enzim hepàtic (154).

1.4.2.1. Determinació de l'activitat de la fosforilasa hepàtica

La metodologia per a la determinació acurada de les formes de la fosforilasa en extractes hepàtics ha estat problemàtica i s'ha desenvolupat considerablement en els darrers

anys. Fins i tot alguns autors han invocat aquesta falta d'especificitat respecte a la determinació de les formes de la fosforilasa com la responsable d'efectes, segons ells, artificials observats sobre la interconversió de l'enzim (155).

Usualment la determinació de l'activitat fosforilasa es realitza en el sentit de síntesi de glicogen a partir de glucosa 1-P 50 mM pH 6,1-6,5. Cal fer esment que la glucosa 1-P a aquest pH és una bona substància amortidora de pH (pK 6,1) cosa per la qual no cal afegir-hi cap solució amortidora addicional, com són el maleat o glicerofosfat encara actualment utilitzats. És necessarià però la presència de FNa 0,15 M com a inhibidor de la fosfatasa de la fosforilasa present en els extractes crus. L'addició de glicogen al 1 % serveix d'iniciador per a la síntesi de glicogen en la reacció.

Per a la determinació de la fosforilasa a d'una manera específica és necessària l'addició a la barreja d'assaig d'una concentració de cafeïna 0,5 mM que inhibeix selectivament la fosforilasa b. Sota aquestes condicions l'activitat de la fosforilasa b és d'aproximadament del 1 % de la de la fosforilasa a. Adhuc en aquesta situació la fosforilasa b pot incrementar la seva activitat en presència d'AMP cosa per la qual no s'ha d'afegir el nucleòtid quan la forma b també està present en l'assaig. En qualsevol cas, l'efecte de l'AMP pot ésser limitat per altes concentracions de cafeïna (155). No existeix un assaig específic per a determinar la forma b de la fosforilasa hepàtica.

L'activitat total pot mesurar-se en presència d'AMP 1 mM i sulfat 0,5 mM puix que s'incrementa d'aquesta manera l'activitat de la fosforilasa b. Ara bé el fet que el sulfat inhibeixi la fosforilasa a en un 15 % s'ha de tenir en compte quan es tracta de determinar l'activitat total.

Recentment, però, ha estat proposada una metodologia alternativa per a la determinació de l'activitat total de la fosforilasa hepàtica. Està basada en l'efecte activador del solvent 1,2-dimetoxietà sobre la fosforilasa b. La introducció d'1,2-dimetoxietà al 10% (v/v) concentració final, en presència d'AMP estimula en gran manera l'activitat de la fosforilasa b i, a diferència del sulfat, no inhibeix l'activitat de la forma a, cosa que pot ésser útil en determinar més acuradament les diferents formes de la fosforilasa (139).

1.4.3. INTERCONVERSIÓ ENTRE LES FORMES DE LA FOSFORILASA.

Tal com ja hem esmentat la conversió de la fosforilasa b en a està catalitzada per la quinasa de la fosforilasa (119) en una reacció irreversible de transferència de fosfat del Mg-ATP al residu de serina-14 específicament fosforilable de cada subunitat. Per la fosforilasa muscular "in vitro" es poden incorporar fins a quatre mols de fosfat per mol de fosforilasa a (tetràmera) (156) però la màxima activitat enzimàtica és assolida quan solament han estat incorporats dos mols de fosfat. El procés es realitza per passos, amb l'aparició de formes parcialment fosforilades (66).

La reacció de desfosforilació està catalitzada per la fosforilasa fosfatasa (120).

1.5. QUINASES INDEPENDENTS ,

En aquesta secció s'inclouen aquelles quinases capaces de fosforilar la glicogeno-sintasa les activitats de les quals són independents de controls coneguts, com ara per part de nucleòtids cíclics, Ca^{2+} o calmodulina.

El primer coneixement de la fosforilació de la glicogeno-sintasa per una via independent d'AMP cíclic va ésser descrit per Nimmo i Cohen(157). Poc després, Schlender i Reimann(158) i Huang i cols.(159) van descriure activitats quinàsiques de la glicogeno-sintasa similars. Ja que per aquell temps només es coneixia amb capacitat de fosforilar la glicogeno-sintasa la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic era important conèixer quin grau d'inhibició introduiria l'inhibidor estable al calor sobre la fosforilació de la glicogeno-sintasa per part de les quinases independents (44). Basant-se en part en aquest assaig negatiu diversos autors confirmaren les troballes originals, i Schlender i Reimann(160) mostraren que l'activitat quinasa de la glicogeno-sintasa independent d'AMP cíclic era present en molt teixits.

El descobriment de la capacitat de la quinasa de la fosforilasa b en fosforilar la glicogeno-sintasa va venir a

enfosquir els resultats primitius. Realment, més endavant va demostrar-se que l'activitat original independent d'AMP cíclic va ésser deguda a una forma modificada de la quinasa de la fosforilasa (96). Avuí dia, però, es coneixen múltiples formes de quinases independents capaces de fosforilar la glicogeno-sintasa tretes la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i la quinasa de la fosforilasa.

La cromatografia en fosfocel·lulosa ha estat molt utilitzada en la purificació de quinases independents i consisteix un pas en comú a la majoria dels processos de purificació que condueixen a les diferents proteïno-quinases independents que es coneixen actualment.

Diverses són les característiques que diferencien unes proteïno-quinases independents de les altres:

a) capacitat de fosforilar a diferents substrats com ara a la caseïna, la fosvitina i la glicogeno-sintasa.

b) especificitat de substrat pel que fa al nucleòtid: ATP o (i) GTP.

c) Grau de fosforilació en nombre de mols de fosfat/ per subunitat de glicogeno-sintasa i inactivació subsegüent d'aquest enzim.

d) concentració de KCl a què elueixen de la columna de fosfocel·lulosa.

e) Km pels diferents substrats.

f) pes molecular.

1.5.1. QUINASES INDEPENDENTS MUSCULARS.

Soderling i cols.(161) van reportat una quinasa independent que si bé fosforilava la glicogeno-sintasa, no utilitzava GTP. Schlender i cols.(160) purificaren parcialment un enzim muscular que fosforilava la glicogeno-sintasa però no tenia activitat sobre la caseïna o la fosvitina. Per gel-filtració revelaren dues activitats de pesos moleculars 52.000 i 68.000, respectivament. L'enzim de 52.000 no utilitzava GTP.

Embi i cols. (162) també purificaren una quinasa independent anomenada quinasa 3 de la glicogeno-sintasa (GSK-3) que fosforilava pobrement la caseïna i la fosvitina. L'enzim mostrava una Km 25 vegades més alta per la GTP que per l'ATP i tant la seqüència d'aminoàcids com els centres de fosforilació d'aquest enzim foren elucidats.

Itarte i Huang (163) han purificat per succesius passos de cromatografia en fosfocel·lulosa, sefarosa 4B i gradient linial de KCl dues activitats quinàsiques de la sintasa independents d'AMP cíclic, de Ca^{++} o de calmodulina, que no eren inhibides per l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (GSK-1 i GSK-2).

Aquestes quinases eren capaces de fosforilar la caseïna, la fosvitina i la forma I de la glicogeno-sintasa, mentre que no fosforilaven la histona II A, la protamina o la fosforilasa b.

Les quinases 1 i 2 de la caseïna com van ésser anomenades, mostraren diferents pesos moleculars de 34.000 i 135.000 daltons, respectivament. La fosforilació de la glicogeno-sintasa per aquestes quinases es correlacionava amb un decreixement en la relació d'activitats $-G6-P/+G6-P$ de l'enzim. Tanmateix, la quinasa-1 catalitzava la incorporació de 4 mols de fòsfat per subunitat de glicogeno-sintasa i la quinasa-2 incorporava 0,8.

Roach i cols. (94) purificaren quatre proteïno-quinases que s'anomenaren $PC_{0,4}$, $PC_{0,5}$, $PC_{0,6}$ i $PC_{0,7}$ perquè eren separades en columna de fosfocel·lulosa per elució a les molaritats de KCl que indica cada subíndex. D'elles la $PC_{0,7}$ és la que ha estat més ben purificada, unes 50.000 vegades respecte a l'activitat fosvitina, pròxim a l'homogeneïtat.

Recentment, ha estat caracteritzada la $PC_{0,7}$ pels mateixos autors (164), Té un pes molecular de 180.000 determinat per gel-filtració i dues subunitats alfa i beta amb pesos moleculars de 43.000 i 25.000, respectivament. La subunitat alfa era susceptible de degradació, presumiblement per proteòlisi, durant la purificació; la subunitat beta era caracteritzada per la capacitat d'ésser fosforilada, per una reacció d'autofosforilació. Aquesta quinasa podia utilitzar ATP o GTP en la fosforilació i incorporava aproximadament 0,5 mols de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa. A més, hom ha establert (165) que la $PC_{0,7}$ també és capaç de fosforilar la subunitat beta del factor d'iniciació 2 de cèl·lules eucariotes (eIF-2).

També recentment Vandenhede i cols. (165) reportaren la purificació per gel-filtració d'una quinasa de la glicogeno-sintasa anomenada Fa amb pes molecular 45.000 que contenia un sol polipèptid. La fosforilació de la caseïna i de la fosvitina per part d'aquest enzim era pobre i la GTP tenia una Km sobre la fosforilació de la glicogeno-sintasa 30 vegades més alta que l'ATP. Aquesta preparació enzimàtica era particularment interessant ja que a més de la seva activitat proteïno-quinasa, tenia la capacitat d'interactuar amb, i inactivar, la proteïno-fosfatasa anomenada Fc (167). Aquesta fosfatasa també requeria la presència simultània d'ATP i Mg^{2+} per expressar la seva activitat. Tot i que per activar-se la proteïno-fosfatasa necessités ATP, Mg^{2+} i l'activitat quinàsica, no es va detectar cap fosforilació lligada al procés. A més, quan Fc i Fa no estaven associats, el complex era incapaç de fosforilar la glicogeno-sintasa. En aquest pro-

cés existeix un interessant potencial regulador. Fa i Fc lliures representen una proteïno-quinasa activa i una proteïno-fosfatasa inactiva, respectivament, mentre que el complex Fa-Fc constitueix l'invers, una proteïno-quinasa inactiva i una fosfatasa activa. És a dir, el control de l'associació de Fa i Fc podria permetre una regulació de les activitats fosforilitzants i desfosforilitzants.

Molt recentment Cohen i cols. (168) han isolat i caracteritzat dues noves proteïno-quinases independents d'AMP cíclic en múscul esquelètic de conill, anomenades quinases de la glicogeno-sintasa, 4 i 5, respectivament (GSK-4 i GSK-5). La GSK-4 és isolada per elució en columna de fosfocel.lulosa a una molaritat de NaCl de 0,4; té un pes molecular de 115.000 daltons i utilitza exclusivament ATP en la reacció de fosforilació.

La GSK-5 és eluïda també en columna de fosfocel.lulosa però a una molaritat de NaCl de 0,7; té un pes molecular aproximat de 175.000 daltons i utilitza tant GTP com ATP en la reacció de fosforilació.

1.5.2. QUINASES INDEPENDENTS DE FETGE.

L'estat de coneixença de les quinases independents d'AMP cíclic hepàtiques capaces de fosforilar la glicogeno-sintasa és molt més limitat que en el cas del teixit muscular. Efectivament si bé Schlender i Reimann (160) van descriure en extractes crus de fetge de rata l'existència d'una activitat quinàsica de la sintasa, independent d'AMP cíclic, aquests autors no purificaren ni caracteritzaren aquesta activitat.

No fou fins l'any 1979 que Itarte i cols. (169) descri-viren l'isolament per mitjà de filtració per gel en Sefarosa 6B,

de dues quinases independents d'AMP cíclic que eren capaces de fosforilar la caseïna. Posteriorment aquests mateixos autors han purificat i caracteritzat aquestes caseïno-quinases que van ésser anomenades caseïno-quinases 1 i 2, respectivament (170).

La purificació la duien a terme fent servir entre altres processos la cromatografia en fosfocel·lulosa i en caseïno-sefarosa 4B.

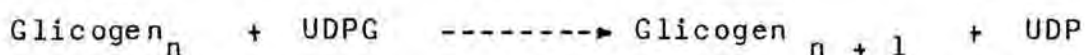
Aquestes quinases no eren activades ni per AMP cíclic ni per calci o calmodulina, ni inactivades per l'acció de l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

Tant la caseïno-quinasa-1 com la caseïno-quinasa -2 presenten diferències en el pes molecular (35.000 i 190.000 daltons, respectivament), en la sensibilitat al KCl, en la Km per la caseïna i per la fosvitina i en la Ka pel Mg^{2+} .

1.6. GLICOGENO-SINTASA .

1.6.1. MECANISME D'ACCIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA

La glicogeno-sintasa, catalitza l'addició de restes glicosílics a partir de la UDP-glucosa al glicogen i les incorpora mitjançant lligams (1-4) (171). La reacció es pot escriure:



on "n" és el nombre de restes glucosils. L'acceptor de molècules de glicogen és el mateix glicogen encara que l'amilopectina, l'amilosa i les malto-dextrines també poden funcionar com a acceptors. Fins i tot l'enzim pot funcionar utilitzant com a acceptor la mateixa molècula de glucosa (172).

La reacció catalitzada per la glicogeno-sintasa és fisiològicament irreversible. Aquesta irreversibilitat és deguda a la naturalesa de la reacció de síntesi d'UDPG a partir d'UTP i de G 1-P, ja que el pirofosfat format és ràpidament hidrolitzat per una pirofosforilasa inorgànica, i

s'allibera una gran variació d'energia lliure. Aquesta és la causa de la irreversibilitat.

Després d'estudiar el mecanisme de la reacció s'ha arribat a la conclusió que en el cas de l'enzim hepàtic es tracta d'un model seqüencial bi bi (173).

La regulació de l'activitat de la glicogeno-sintasa s'aconsegueix per una banda per la seva susceptibilitat d'interconversió entre diferents estats de fosforilació amb què s'alteren les propietats cinètiques de l'enzim i paral·lelament per l'acció de les concentracions d'efectors metabòlics trobats "in vivo". Aquestes últimes alteren en major o menor grau l'activitat enzimàtica dependent de l'estat de fosforilació en què es trobi l'enzim i d'aquesta manera s'assoleix un grau de regulació enzimàtica extremadament subtil.

1.6.2. NOMENCLATURA DE LA GLICOGENO-SINTASA.

El procés de fosforilació afecta l'activitat de la glicogeno-sintasa de la manera següent:

a) a mida que s'incrementa el nombre de fosfats covalentment lligats a la seva molècula l'enzim expressa menys activitat

b) viceversa, la progressiva desfosforilació de l'enzim incrementa l'activitat assajada de la glicogeno-sintasa.

c) en presència d'una concentració elevada de G6-P, que és un activador al·lostèric de l'enzim, totes les formes possibles de la glicogeno-sintasa (fosforilades i desfosforilades) expressen la mateixa màxima activitat.

Si bé el procés de la fosforilació múltiple de la gli-

cogeno-sintasa és ben conegut en l'actualitat, originalment hom pensava que hi havien només dues formes de la glicogeno-sintasa; una fosforilada i l'altra desfosforilada, i van ésser anomenades "forma D" i "forma I", respectivament.

Continuant amb aquesta terminologia, la "forma I" expressava la seva activitat en absència de G6-P en l'assaig de determinació de l'activitat enzimàtica, per això se la va anomenar també "forma independent" de la G6-P. Ben al contrari la "forma D" necessitava de G6-P per a expressar la seva activitat, és per això que se la va anomenar també "forma dependent" de l'èster fosfòric.

Aquesta dependència de G6-P per aconseguir la màxima activitat de l'enzim a més d'ésser la responsable de l'original nomenclatura de les formes de la glicogeno-sintasa, va generar la utilització d'un paràmetre molt simple per a mesurar l'estat d'activació de l'enzim. Aquest paràmetre és simplement la relació d'activitat de la glicogeno-sintasa mesurada en absència de G6-P referida a la determinada en presència de l'activador i decreix a mida que s'incrementa la fosforilació de la glicogeno-sintasa. Multiplicant per cent s'obté el percentatge de "forma I".

Arran del descobriment de la possibilitat de fosforilació múltiple de l'enzim hom considera que els termes "forma I" i "forma D" de la glicogeno-sintasa són otorgables únicament a formes teòriques extremes de desfosforilació i fosforilació, respectivament. Entre ambdues situacions hi ha cabuda per a nombroses possibilitats de fosforilació parcial de la glicogeno-sintasa. S'ha de tenir en compte, doncs, com han enfatitzat Roach i Larner (174), que el percentatge d'activitat I no ha d'ésser pres com a una mesura de la fracció molar de la "forma I". Concretament, com va descriure Salavert (175) aquesta relació d'activitats és funció del valor de la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa que l'enzim mostra per cadascun dels estats de fosforilació possible. A més aquest tipus de relació

d'activitats no permet una adaptació per a una millor sensibilitat de les formes de l'enzim fosforilat amb tres o més mols de fosfat per subunitat.

A més, s'ha creat un problema de nomenclatura per cadascuna de les diferents espècies de la glicogeno sintasa resultants de la fosforilació múltiple.

Certament, la nomenclatura original (formes I i D), no és adequada. Tampoc no ofereix una solució vàlida a aquest problema les normes donades per la Comissió de Nomenclatura Bioquímica (IUPAC-IUB)(176). Aquestes normes denominen la glicogeno sintasa I com a glicogeno-sintasa a i la glicogeno-sintasa D, glicogeno-sintasa b, on a i b designen les formes activa o inactiva (o menys activa), respectivament, segons la relació d'activitats de la glicogeno-sintasa. Aquestes lletres (a o b) són afegides d'un subíndex que indica el número de subunitats de la molècula enzimàtica. La glicogeno-sintasa b ha de portar entre parèntesi el número de fosfats que conté. Parant esment en el fet que el nombre de fosfats per subunitats pot ésser diferent i a més estar adreçats en centres de fosforilació també diferents, el nombre de combinacions possibles és molt gran i sobrepassen les normes impartides per la IUPAC.

De tota manera, encara que es definís el número de fosfats per subunitat, distribució en els diferents centres i/o la(es) proteïno-quinasa(es) utilitzada(es) s'ha de parar en compte que tal definició no necessàriament caracteritzaria una única població de formes de la glicogeno-sintasa.

En veritat, el problema de la nomenclatura per a les múltiples formes de la glicogeno-sintasa és de difícil resolució. Mentrestant la caracterització de l'enzim mitjançant les formes I i D és amplament utilitzada en l'actualitat per la majoria dels investigadors.

1.6.3. PURIFICACIÓ I ESTRUCTURA DE LA GLICOGENO-SINTASA.

La glicogeno-sintasa ha estat purificada en diversos graus a partir de nombrosos teixits, entre ells del muscular (177) i de l'hepàtic (178).

L'enzim muscular és el que ha estat més amplament estudiat i s'han aconseguit preparacions purificades gairebé a homogeneïtat. L'activitat específica dels enzims purificats oscil·len entre 10 i 40 U/mg de proteïna segons els diferents laboratoris d'investigació. Això juntament amb els diferents mètodes utilitzats per a la seva purificació pot ésser origen de resultats divergents, sobre tot a l'hora de determinar les propietats cinètiques de l'enzim.

L'anàlisi de la glicogeno-sintasa muscular per electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de dodecil sulfat sòdic revela espècies d'un pes molecular d'aproximadament 85.000 i d'altres, davall descrites, de pes molecular més baix (177).

El polipèptid de pes molecular 85.000 és una subunitat de la glicogeno-sintasa i segons els resultats actuals es pensa que és l'únic tipus de subunitat. Un dels millors arguments per aquesta afirmació és que després del estudi quantitatiu i de seqüenciació de la regió N-terminal d'aquests polipèptids s'ha arribat a la conclusió que només existeix una seqüència N-terminal. Una verificació rigurosa del fet que no existeix diferència entre les subunitats de 85.000 requerirà més estudis químics, però fins ara l'opinió que predomina és que la glicogeno-sintasa és un oligòmer amb un sol tipus de subunitat.

Un considerable rang de valors de pes molecular, de 155.000 a 420.000, han estat descrits per la glicogeno-sinta

sa per diferents autors que feien servir tècniques físiques diferents. Part d'aquesta variació reflecteix l'habilitat de l'enzim d'existir en diferents formes oligomèriques. Així Takeda i cols. (177) van descriure que les formes natives de la glicogeno sintasa de múscul esquelètic de conill tenien un pes molecular de 150.000 i 340.000 per la forma I i 278.000 i 350.000 per la forma D. Això representaria que la forma I existiria com a dímer i tetràmer i la forma D com a trímer i tetràmer.

Pel que fa a l'enzim hepàtic, la forma fosforilada (inactiva) ha estat purificada fins a homogeneïtat aparent per Lin i Segal (179), Mc Verry i Kim (173) i Killilea i Whelan (180). D'altra banda la forma desfosforilada (activa) ha estat purificada parcialment per Steiner i col.(181) i més recentment fins un 90% d'homogeneïtat, basat en el criteri d'electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS, per Jett i Soderling (178).

El pes molecular de l'enzim està estimat entre 156.000 i 171.000 i el de la subunitat 85.000. Els estudis més recents suggereixen que la glicogeno-sintasa desfosforilada de fetge de rata es troba "in vitro" en forma de dímer.

1.6.4. PROTEOLISI LIMITADA I ESPECIES MENORS.

Es conegut des de fa temps (182) que el tractament de la glicogeno-sintasa no fosforilada (forma I) amb tripsina o amb una proteasa dependent de calci en determinades condicions transforma aquesta forma independent de G6-P en una forma similar a la forma fosforilada (forma D) per la seva dependència de G6-P. L'interés que justifica l'estudi d'aquest procés és degut a l'orientació que ofereix sobre l'estructura de la molècula de la glicogeno-sintasa i dels seus centres fosforilables.

Takeda i cols.(177) veieren que si dos preparacions homogènies de glicogeno-sintasa de pes molecular 85.000, una 100% de "forma I" i l'altra 4% de "forma I"("forma D"), eren sotmeses a tractament amb tripsina, en ambdós casos s'obtenia un polipèptid de 75.000 daltons amb activitats enzimàtiques respectives de 20% i 0% de "forma I". De tot això se'n pot deduir que ambdues formes (I i D) de l'enzim presenten un nucli resistent, en determinades condicions, a la tripsinització. Aquest nucli anomenat "cor" que té un pes molecular de 75.000 daltons conté diversos centres fosforilables i probablement el centre d'activació allostèric per la glucosa 6-P car malgrat el descens de l'activitat de la "forma I", l'activitat específica en presència de l'activador es manté similar a la inicial. El fragment separat per l'acció de la tripsina conté almenys un centre de fosforilació (183,184).

Takeda i cols.(185) trobaren que la seqüència de l'extrem N-terminal de la subunitat de 75.000 daltons era Pro-Leu tant si partien de la glicogeno-sintasa I com D. Això suggereix fortament que tant la "forma I" de la glicogeno-sintasa com la "forma D", són degradables molt probablement pel mateix punt o molt semblant, a prop de l'extrem carboxilo-terminal, sense alterar l'extrem NH₂-terminal de la molècula.

Soderling l'any 1976 (186) va observar que la tripsinització limitada de la glicogeno-sintasa prèviament fosforilada amb proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i gamma-³²P-ATP reduïa aproximadament al 50% la quantitat de radiactivitat lligada a la sintasa. Això demostrava l'existència de dos llocs altament susceptibles d'ésser fosforilats per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic en cada subunitat de l'enzim. Posteriorment (161) va concretar que el primer mol de fosfat dels dos que incorporava la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic anava en un 70-80% al centre anomenat "sensible a la tripsina" i que solament el 20-30% anava al centre "insensible a la tripsina"("cor").

Khatra i Soderling (183) després de fosforilar la glicogeno-sintasa amb les quinases dependent i independent d'AMP cíclic provocaven la conversió d'aquesta sintasa, en "forma D", a "forma I" mitjançant fosfatases i finalment analitzaven el procés de desfosforilització amb digestions parcials de tripsina. D'aquest estudi concluíren que la desfosforilització de la regió de la glicogeno-sintasa "insensible a la tripsina" ("cor"), era la responsable de la conversió de la glicogeno-sintasa D en I. Això volia dir que el centre responsable de l'activació de la sintasa per la G6-P estava localitzat en la regió "insensible a la tripsina".

La glicogeno-sintasa purificada conté a més del polipèptid de 85.000 daltons una espècie molecular de pes molecular de 44.000 segons resultats de diversos investigadors (177,166, 187) encara que està present en una molt petita proporció. A hores d'ara no es coneix si i com aquest polipèptid es relaciona amb la glicogeno-sintasa. Tanmateix, no s'acumula després de la proteòlisi de l'enzim i per això no s'ha pogut considerar com a producte de la degradació de la subunitat de 85.000 daltons

1.6.5. FOSFORILACIÓ I INACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA.

D'una manera general es pot afirmar que la fosforilació de la glicogeno-sintasa causa la inactivació de l'enzim, cosa que es reflecteix en un increment en les seves constants cinètiques: la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa i la $M_{0,5}$ per la G6-P, sense variació de la $V_{m\grave{a}x}$ (187).

En canvi, existeix gran controvèrsia en els detalls específics de la fosforilació de la glicogeno-sintasa, degut principalment a que existeix un gran nombre de quinases capaces de fosforilar la glicogeno-sintasa, així com una gran varietat de centres fosforilables en l'enzim substrat. A més

hi han molt poques dades respecte a la fosforilació de la glicogeno-sintasa, muscular o hepàtica, catalitzada per proteïno-quinases hepàtiques.

A continuació es detalla més amplament els efectes coneguts que sobre diverses preparacions de glicogeno-sintasa, musculars o hepàtiques exerceixen cadascuna de les quinases capaces de fosforilar-la

1.6.5.1. Fosforilació de la glicogeno-sintasa muscular per la quinasa de la fosforilasa muscular.

La quinasa de la fosforilasa b incorpora de 0,5 a 1 mols de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa (96,95,68,97,98). Ha estat establert també que el lloc de fosforilació és la serina-7 prop de l'extrem N-terminal de la molècula (96). Els resultats obtinguts després de la separació electroforètica dels fragments resultants del tractament amb CNBr de la glicogeno sintasa fosforilada per la quinasa de la fosforilasa suggereixen que aquest lloc de fosforilació (serina-7) està contingut en un fragment de l'enzim de pes molecular 7.000 (188,189).

La seqüència d'aminoàcids que rodeja la serina-7 de la glicogeno-sintasa és molt similar en quan a restes bàsics a un altra lloc d'actuació de la quinasa de la fosforilasa: la serina-14 de la fosforilasa (94).

La fosforilació introduïda per la quinasa de la fosforilasa provoca la inactivació de la glicogeno-sintasa (96,95,68,97,98), efecte que es reflecteix en un increment tant en la $S_{0,5}$ per la UDPG (94) com en la $M_{0,5}$ per la G6-P (162).

1.6.5.2. Fosforilació de la glicogeno-sintasa muscular per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic muscular.

Es un fet ben palès la fosforilació i inactivació de la glicogeno-sintasa per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Ara bé existeix controvèrsia en el nombre de llocs de fosforilació en la glicogeno-sintasa susceptibles a l'acció d'aquesta proteïno-quinasa així com respecte a la importància dels diferents llocs en inactivar l'enzim.

En un estudi preliminar Soderling (190) arribà a introduir cinc mols de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa fent servir grans concentracions de proteïno-quinasa, elevats nivells d'ATP i temps llargs d'incubació. Aquest mateix autor no excluïa la possibilitat de que altres proteïno-quinases haguessin contribuït als nivells tan alts de fosforilació (190).

En investigacions més recents i no fent servir condicions tan extremes hom ha establert una estequiometria d'aquesta fosforilació en el rang de 2-3 mols de fosfat per subunitat (64,188). Això implicaria un mínim de 3 llocs de fosforilació en la glicogeno-sintasa. Els fosfats eren introduïts en dos fosfopèptids P-1 i P-2 amb una estequiometria d'aproximadament 1 i 0,25 mols de fosfat, respectivament. La fosforilació per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic induïa a un decreixement en el percentatge de la "forma I" de la glicogeno-sintasa de 0,85 a 0,35. Concomitantment es produïa un increment tant en la $M_{0,5}$ per la G6-P (de 20 a 50 μ M) com en la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa (de 0,02 a 4 mM) (191).

Huang i cols. d'altra banda només aconseguïen incorporar per l'acció d'aquest enzim d'1,2 a 1,5 mols de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa (191)

En els laboratoris de Krebs (192) i Cohen (193,194) s'han

arribat a identificar químicament 3 llocs de fosforilació per mitjà de la proteòlisi parcial de la glicogeno-sintasa per efecte de la tripsina. Aquests centres sembla que són simul tàniament fosforilats. Dos d'ells (la i i lb) estan continguts en un fragment de l'enzim de pes molecular 21.000, sensible a la tripsina. L'altra es troba en un fragment de la glicogeno-sintasa de pes molecular 7.000 i que correspon a la mateixa serina-7 fosforilada per la quinasa de la fosforilasa. Pel que fa a la inactivació de la glicogeno-sintasa per la fosforilació duta a terme per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic sembla ésser que existeix un efecte bifàsic. És a dir, la introducció del primer fosfat és menys efectiva en inacti var l'enzim que la subseqüent addició de fosfat. La inactivació més gran, comparada a la provocada per la quinasa de la fosforilasa, és observada a nivells de fosforilació per sobre de 1 mol de fosfat per subunitat. A més, ja que la inacti vació més forta es correlaciona amb l'aparició de fosfat en el fragment de pes molecular 7.000 es suggereix que el mateix centre de fosforilació, serina-7, ha d'estar involucrat en la fosforilació.

En un major o menor grau la inactivació de l'enzim s'ha correlacionat amb un decrement en el percentatge de la forma I de la glicogeno-sintasa (161,192,64,193) que a la vegada es reflecteix en un augment en les constants cinètiques de l'enzim (195).

Sembla ésser, doncs, que la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic fosforila la glicogeno-sintasa almenys en tres centres dos dels quals, la i i lb, estan inclosos en un segment de molècula de 21.000 daltons obtingut per digestió amb CNBr de l'enzim fosforilat, prop de la regió C-terminal. La fosforilació d'aquests centres condueix a una relativa ineffectivitat en inactivar l'enzim. Si s'incrementa l'estat de fosforilació s'introdueix fosfat en un altra centre d'un fragment de la molècula de pes molecular 7.000, possiblement la serina-7. La fosforilació d'aquest centre provocaria

una inactivació més efectiva de la glicogeno-sintasa.

1.6.5.3. Fosforilació de la glicogeno-sintasa muscular per quinases independents musculars.

La quinasa 3 de la glicogeno-sintasa purificada per Embi i cols.(162) gaudeix d'una bona informació en termes de fosforilació puix que els estudis de seqüenciació d'un fosfopèptid de la glicogeno-sintasa han establert un conjunt de tres residus de serina capaços d'ésser fosforilats per l'esmentada quinasa.

L'acció de la quinasa-3 de la glicogeno-sintasa provoca una fosforilació màxima d'1,6 mols per subunitat de glicogeno-sintasa. En introduir 1 mol de fosfat per subunitat condueix a una marcada inactivació de la glicogeno-sintasa del 80% al 14% de forma I de l'enzim i un increment en la $M_{0,5}$ per la G6-P d'aproximadament 25 vegades.

La quinasa-4 de la glicogeno-sintasa (GSK-4) introdueix 0,45 mols de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa en el mateix centre fosforilat per l'acció de la quinasa de la fosforilasa. Aquesta fosforilació condueix a la disminució en la relació d'activitats (-G6-P/+G6-P) de la glicogeno-sintasa (de 0,8 a 0,47)(168).

La quinasa-5 de la glicogeno-sintasa (GSK-5) incorpora 0,40 mols de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa en un residu de serina, anomenat per Cohen i cols. centre-5, i que es localitza dins de la seqüència aminoacídica següent:

His-Ser-Ser-Pro-His-Gln-Ser(P)-Glu-Asp-Glu-Glu-Glu-Pro

Aquesta fosforilació, però, no modifica l'estat d'acti-

vació de la glicogeno-sintasa mesurat per la relació -G6-P/ α G6-P (168).

La fosforilació de la glicogeno-sintasa per la quinasa independent $PC_{0,7}$ (164) produeix una incorporació d'un màxim d'1 mol de fosfat per subunitat. Aquest fosfat està introduït primàriament en el fragment de pes molecular 21.000, és a dir en la mateixa regió preferentment fosforilada per la proteïnoquinasa dependent d'AMP cíclic. Tanmateix, un estudi detallat dels fragments produïts per la ruptura de la glicogeno-sintasa per acció del CNBr i posterior tripsinització indica que la $PC_{0,7}$ i la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic actuen en centres diferents (94). La fosforilació amb la $PC_{0,7}$ provoca un lleuger decreixement en el percentatge d'activitat de la "forma I" de la glicogeno-sintasa.

La fosforilació amb la $PC_{0,4}$ incorpora aproximadament 1 mol de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa. Aquest fosfat és localitzat en el fragment de pes molecular de 7.000 daltons i sembla ésser que la fosforilació té lloc en la mateixa serina-7 susceptible a l'acció de tant la quinasa de la fosforilasa com de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. Així mateix, la fosforilació amb la $PC_{0,4}$ causa una inactivació similar a l'observada per la fosforilació en aquesta regió de la molècula per les altres proteïno-quinases. La incorporació, per part de la $PC_{0,4}$ de 0,1 mols de fosfat provoca un increment d'aproximadament 4 vegades tant de la $S_{0,5}$ com de la $M_{0,5}$ de la glicogeno-sintasa.

Huang i cols. (191) fosforilaren la glicogeno-sintasa amb la quinasa-1 de la glicogeno-sintasa i incorporaren fins a 4 mols de fosfat per subunitat de l'enzim en quatre fosfopèptids anomenats P-3, P-4, P-5 i P-6. La incorporació de fosfat en cada fosfopèptid era de 0,87, 0,77, 0,9 i 0,6 mols per fracció, respectivament.

La incorporació de fosfat en el pèptid P-5 era més ràpida que en els restants i era el que produïa un ràpid descens en la relació d'activitats (-G6-P/+G6-P) de la glicogeno-sintasa així com un concomitant increment en la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa. La fosforilació dels altres fosfopèptids incrementava la inactivació de l'enzim i conduïa a un increment en la $M_{0,5}$ per la glucosa 6-P. Finalment, d'aquests resultats Huang i cols. argüeixen que la fosforilació del pèptid P-5 regula la unió de la UDP-glucosa a la glicogeno-sintasa mentre que la fosforilació de P-3, P-4 i P-6 influència el lligam de la glucosa 6-P.

En contra d'això, Salavert i cols.(196) estudiant la fosforilació de la glicogeno-sintasa per l'aparentment mateixa quinasa, reportà una variació paral·lela tant en la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa com en la $M_{0,5}$ per la G6-P. Ambdós paràmetres s'incrementaren 250 vegades amb la introducció de quatre mols de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa. El canvi més gran en les constants cinètiques s'observà per una fosforilació per damunt dels 2 mols per subunitat de glicogeno-sintasa.

Estudis recents del nostre laboratori(197) han demostrat que la quinasa-1 de la glicogeno-sintasa fosforila almenys 4 centres i que tres d'aquests centres són diferents de dos dels tres centres fosforilats per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. També s'aconseguit establir que la quinasa 1 de la glicogeno-sintasa i la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic fosforilen el mateix centre que la quinasa de la fosforilasa b.

La proteïno-quinasa descrita per Soderling i cols.(161) fosforilava la glicogeno-sintasa a un nivell d'1,5 mols de fosfat per subunitat, primàriament en la regió de la molècula resistent a la tripsina. Amb la introducció d'1 mol de fosfat per subunitat el percentatge d'activitat de la "forma I" era menor de 10 i la $M_{0,5}$ s'incrementava de 3 a 12 vegades (198).

L'enzim Fa purificat per Vandenneede i cols.(166) incorporava 1 mol de fosfat per subunitat de glicogeno-sintasa i reduïa el percentatge de "forma I" de la glicogeno-sintasa a menys del 5%.

1.6.5.4. Fosforilació de la glicogeno-sintasa muscular per quinases independents hepàtiques.

Hom ha descrit la fosforilació de la glicogeno-sintasa muscular per dues caseïno-quinases hepàtiques (170).

La caseïno-quinasa 1 catalitza la incorporació d'aproximadament 3,6 mols de ^{32}P /subunitat de glicogeno-sintasa, cosa que produeix un decreixement en la relació d'activitats $-\text{G6-P}/+\text{G6-P}$ de la glicogeno-sintasa, de 0,83 a 0,15.

La caseïno-quinasa 2 catalitza la incorporació d'aproximadament 1,9 mols de ^{32}P /subunitat de glicogeno-sintasa i provoca una disminució en l'estat d'activació d'aquest enzim de 0,83 a 0,23, mesurat per la relació d'activitats $-\text{G6-P}/+\text{G6-P}$.

1.6.5.5. Fosforilació de la glicogeno-sintasa hepàtica per la subunitat catalítica de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic muscular i per una caseïno-quinasa independent d'aquest nucleòtid hepàtica.

Fins l'actualitat es té molt poca informació sobre la fosforilació específica de la glicogeno-sintasa desfosforilada hepàtica per part de proteïno-quinases també hepàtiques.

A tal respecte Jett i Solerling (178) l'any 1979 van

comunicar que la fosforilació de la glicogeno-sintasa hepàtica catalitzada per una caseïno-quinasa independent d'AMP cíclic incorporava 2 mols de fosfat/per subunitat de glicogeno-sintasa i que la incorporació d'1 mol de fosfat per aquesta quinasa provocava la disminució de l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa (de 0,8 a 0,36) mesurat per la relació d'activitats $-G6-P/+G6-P$.

D'altra banda la fosforilació de la glicogeno-sintasa desfosforilada hepàtica per part de la subunitat catalítica de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic muscular incorporava 3 mols de fosfat/subunitat de glicogeno-sintasa. La incorporació d'1 mol de fosfat per l'acció d'aquesta quinasa només conduïa a un decreixement en la relació d'activitats $-G6-P/+G6-P$ de la glicogeno-sintasa de 0,8 a 0,64.

Aquests autors conclouen que la quinasa independent d'AMP cíclic és més específica que la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic en catalitzar la fosforilació i la conversió de la glicogeno-sintasa hepàtica cap a les formes inactives.

1.6.6. FOSFORILACIÓ MÚLTIPLE I REGULACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA MUSCULAR.

De les dades exposades amb anterioritat sobre la fosforilació múltiple s'esdevenen obvies consideracions pel que fa a la regulació de la glicogeno-sintasa.

No se sap exactament el nombre total de centres de fosforilació de la glicogeno-sintasa muscular. Actualment per anàlisi de seqüenciació de fragments de la glicogeno-sintasa es coneix que existeixen com a mínim 6 o 7 centres diferents susceptibles d'ésser fosforilats. Aquest valor és pròxim a l'estequiometria de 6 mols de fosfat per subunitat que prèviament

trobaren Smith i cols. (199) i que foren els primers en suportar la idea de la fosforilació múltiple de la glicogeno-sintasa. Tanmateix, no es pot afirmar que no hi heguin més centres de fosforilació addicionals. És a dir si una estequiometria de per exemple dos mols de fosfat per subunitat no pot explicar-se amb menys de dos centres de fosforilació, no es pot posar tampoc un límit superior "a priori" del nombre de centres de fosforilació que puguin existir. Una mesura de la fosforilació total no diu res sobre la distribució de fosfats entre els potencials centres de fosforilació. Per tant, resta per saber la contribució exacta de cada quinasa als diferents centres de fosforilació.

Sembla ésser que no es pot introduir un fosfat en la glicogeno-sintasa sense que es produeixi una variació en les seves constants cinètiques. És a dir, cadascuna de les quinases condueixen a una modificació de l'activitat enzimàtica. Tanmateix, encara que no existeixi un acord clar sobre els efectes relatius de la fosforilació en els diferents centres, sembla apropiat afirmar que aquests centres influencien quantitativament d'una manera característica les propietats enzimàtiques. La majoria dels resultats suggereixen que la fosforilació inactiva la glicogeno-sintasa incrementant la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa i la $M_{0,5}$ per la glucosa 6-P.

Encara que no establert d'una forma concluent, dels treballs d'Embickols. (162), Brown i cols. (200) i Nimmo i cols. (201) sobre la fosforilació consecutiva de la glicogeno-sintasa per diferents proteïno-quinases. Sembla ésser que la fosforilació dels diferents centres de fosforilació de la glicogeno-sintasa poden produir un efecte gradual i additiu sobre les propietats cinètiques de l'enzim.

Dels coneixements experimentals actuals també es dedueix que cada quinasa de la glicogeno-sintasa té una especificitat característica pels potencials centres de fosforilació

de l'enzim. De fet, l'observació de l'efecte additiu de dues proteïno-quinases diferents en inactivar l'enzim, és evidència que també hi estaran involucrats diferents centres de fosforilació.

Finalment, pot donar-se la possibilitat que la fosforilació d'un centre afecti positivament o negativament la fosforilació d'un altre centre. Aquest fet no seria sorprenent ja que per exemple per la quinasa-3 de la glicogeno-sintasa existeixen molt a prop unes de les altres, diverses serines susceptibles d'ésser fosforilades. La presència d'un fosfat pot influenciar subseqüentment l'acció de la quinasa. Així, Khatra i Soderling.(183) estudiant l'acció de les fosfatases trobaren que una glicogeno-sintasa fosforilada (amb més de 2 fosfats per subunitat) era més bon substrat per la fosfatasa que un enzim menys fosforilat. Per tant, hi ha evidència que la fosforilació a part d'influenciar l'activitat directament pugui modificar altres propietat importants de la glicogeno-sintasa com ara la seva habilitat de servir com a substrat per a les proteïno-quinases.

1.6.7. INTEGRACIÓ DEL CONTROL AL·LOSTÈRIC I DEL CONTROL PER FOSFORILACIÓ.

Paral·lelament a la regulació per fosforilació, és coneguda l'existència de nombrosos efectors, inhibidors i activadors, capaços de provocar modificacions més o menys grans, en l'activitat de la glicogeno-sintasa en funció del seu estat de fosforilació. En aquest punt conflueixen el control hormonal amb el control al·lostèric de la sintasa.

El principal activador al·lostèric és la glucosa 6-fosfat. L'efecte activador de la G6-P és exercit sobre qualsevol de les formes de l'enzim i és conseqüència del decreixement

en la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa, sense variació aparent sobre la velocitat màxima de l'enzim, que l'activador provoca. Així Salavert i cols. (196) van reportar que en el cas de la glicogeno-sintasa fosforilada amb 4 mols per subunitat, es produïa un decreixement en la $S_{0,5}$ per la UDPG de 400 vegades quan l'enzim era assajat en presència de glucosa 6-P 6,6 mM, mentre que la $S_{0,5}$ de la glicogeno-sintasa desfosforilada només era minvada unes 20 vegades per l'efecte de la mateixa concentració del sucre-fosfat. És a dir, l'efecte de la G6-P consisteix en augmentar l'afinitat de totes les formes de la glicogeno-sintasa pel seu substrat (UDPG).

L'efecte activador de la G6-P pot limitar la inhibició produïda pels nucleòtids (ATP, ADP, AMP, UDP) així com l'aconseguida per creatina-fosfat i Pi.

L'ion magnesi té un efecte activador clar d'aquest enzim (174, 202, 203, 204). Les formes fosforilades de la sintasa són les activades més fortament (174). El manganès té un efecte estimulants sobre la forma fosforilada que pot resultar operatiu "in vivo" (205). L'anion sulfat també es comporta com a activador (206), incrementant-ne la velocitat màxima en presència de glucosa 6-P, efecte amb implicacions fisiològiques desconegudes.

Cal fer esment en aquest punt que l'acció de la major part dels activadors, així com també dels inhibidors, es veu condicionada per l'estat de fosforilació de l'enzim. Així l'acció inhibidòria dels efectors ATP, ADP, AMP i Pi és major sobre les formes fosforilades de l'enzim (203).

Es pot assumir que tan el control allostèric com el control per fosforilació cofluixen en un sol punt, així, en determinades condicions fisiològiques, a unes concentracions determinades dels diferents metabolits, la incorporació d'un determinat nombre de fosfats a la glicogeno-sintasa provoca-

ria unes variacions concretes en les propietats cinètiques de l'enzim; per altra banda la incorporació del mateix nombre de mols de fosfat a la sintasa immersa en diferents condicions fisiològiques provocaria unes variacions en les seves propietats d'una molt diversa intensitat. Viceversa, l'increment d'activitat de la glicogeno-sintasa aconseguida per un determinat augment en la concretració de glucosa 6-P, o disminució d'alguns dels inhibidors, seria d'una intensitat molt superior si l'enzim estigués fosforilat amb 4 mols de fosfat per subunitat, que si solament en tingués incorporat un per subunitat.

1.6.8. DESFOSFORILACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA MUSCULAR.

La separació del fosfat unit covalentment a la molècula de glicogeno-sintasa és duta a terme per l'activitat fosfoproteïno-fosfatasa. Zieve i Glinsman (207) van isolar a partir de múscul esquelètic de conill una fosfatasa amb activitat sobre la glicogeno-sintasa fosforilada i, a més, sobre la quinasa de la fosforilasa, i ambdós substrats es comportaven com a inhibidors competitiu l'un de l'altre (207). Certes preparacions de fosfatases de múscul cardíac boví (208) presenten activitat sobre la glicogeno-sintasa i sobre la fosforilasa a cosa que indica, juntament amb els resultats de Zieve i Glisman (207) que un mateix enzim pot desfosforilar més d'una fosfoproteïna.

Posteriorment Hutson i cols. (209) estudiaren l'efecte d'una fosfatasa de múscul de conill sobre formes de la glicogeno-sintasa fosforilades d'una manera diferent amb l'ajut de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i per la quinasa independent del nucleòtid. Aquest autors observaren que la desfosforilació es produïa inicialment d'una manera molt ràpida sobre un centre fosforilat que es trobava en una regió de la molècula de glicogeno-sintasa insensible a l'acció de

la tripsina. Una vegada havia estat lliurat el primer fosfat, la molècula de glicogeno-sintasa es continuava desfosforilant però molt més lentament. Finalment, van postular que el paper dels altres centres fosforilats era l'afavoriment de la desfosforilació del centre localitzat en la part insensible a la tripsina, fenomen que conduiria a la glicogeno-sintasa vers la independència de G6-P.

Les dades més detallades respecte a la desfosforilació de la glicogeno-sintasa, però, han estat trobades en el laboratori d'Huang (191,210). Aquests autors també analitzaren per separat la desfosforilació produïda per fosfatases sobre la glicogeno-sintasa fosforilada bé amb la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic o bé amb la quinasa-1 (independent d'AMP cíclic) de la glicogeno-sintasa (GSK-1).

1.6.8.1. Desfosforilació de la sintasa muscular fosforilada per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

La incubació de sintasa fosforilada (^{32}P) amb una fosfo proteïna muscular condueix a la hidròlisi completa del ^{32}P de la sintasa. La desfosforilació era acompanyada d'un increment en la relació d'activitats (-G6-P/+G6-P) de la glicogeno-sintasa de 0,35 a 0,88. L'estudi més acurat d'aquest procés manifestà que la desfosforilació del pèptid P-1 per acció d'una fosfatasa alcalina de placenta humana alliberava aproximadament el 70% del ^{32}P total de la molècula. Aquesta hidròlisi representava 0,9 mols de fosfat per fracció de P-1 i era responsable de l'increment en la relació d'activitats de la glicogeno-sintasa de 0,35 a 0,72. La desfosforilació de la fracció P-2 per una fosfo-proteïno fosfatasa muscular, hidrolitzava més ^{32}P de la sintasa i la portava a un grau més alt d'activació: 0,88 de "forma I" de l'enzim (191).

1.6.8.2. Desfosforilació de la glicogeno-sintasa fosforilada per la GSK-1.

La incubació de la sintasa fosforilada (^{32}P) amb una fosfo-proteïno fosfatasa muscular dóna lloc a la hidròlisi de més del 90% de (^{32}P) contingut en la molècula de sintasa amb una subsegüent activació de l'enzim de 0,01 a 0,85 de "forma I". L'anàlisi detallat d'aquesta desfosforilació manifestà que els fosfopèptids P-3, P-4 i P-6 eren més ràpidament hidrolitzats que el P-5. La hidròlisi dels tres primers pèptids alliberava un 70% del (^{32}P) total i produïa una activació molt lleugera de l'enzim mesurada per la relació d'activitats (-G6-P/+G6-P) (0,01 a 0,1). La $S_{0,5}$ decreixia molt lleugerament (de 23 a 18 mM) mentre que la $M_{0,5}$ ho feia més notablement (de 3,2 a 0,4 mM) és a dir 8 vegades. La hidròlisi del fosfopèptid P-5 conduïa a una activació addicional de la "forma I" de la glicogeno-sintasa (de 0,1 a 0,85) i les constants cinètiques decreixien; la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa, de 18 a 2,3 mM, i la $M_{0,5}$ per la glucosa 6-R de 0,4 a 0,02 mM, és a dir 20 vegades. Aquests resultats indicaven que la presència de fosfat en el fosfopèptid P-5 afectava, el que més, no solament la relació d'activitats de la glicogeno sintasa sinó també, i en un grau molt alt, les seves constants cinètiques (191,210).

1.7. FOSFOPROTEINO-FOSFATASES AL METABOLISME DEL GLICOGEN.

Avui dia, es coneixen aproximadament 20 enzims susceptibles de sofrir fosforilació reversible (211). Ara bé, davant l'extensa purificació, caracterització i assignació de centres específics de fosforilació pel que fa a les proteïno-quinases, la situació de coneixença dels enzims que reverteixen la fosforilació: les fosfoproteïno-fosfatases, dissortosament, és ben diferent.

Malgrat el gran esforç realitzat per molts investigadors per estudiar-les, hi ha gran controvèrsia respecte a la naturalesa i regulació cel.lular de les fosfatases. Un dels factors que ha limitat l'avanç de l'estudi d'aquestes proteïno-fosfatases ha estat la dificultat trobada per purificar-les.

Hom ha obtingut preparacions capaces de desfosforilar un gran nombre de fosfo-proteïnes, cosa que originà la idea que la fosfatasa era un enzim multifuncional Nakai i Thomas (212), Killilea i cols.(213), Khandelwal i cols.(214), Antoniow i cols.(215). Altres preparacions de fosfatases, però,

semblaven tenir una completa especificitat, bé per: la fosforilasa a, les subunitats alfa o beta de la quinasa de la fosforilasa, la glicogeno-sintasa o la troponina I, Antoniow i Cohen (99), Gratecos i cols.(216), Kikuchi i cols.(217) ,Laloux i cols.(218).Les bases per aquestes discrepàncies no es coneixen encara.

Les proteïno-fosfatases apareixen en els extractes cel·lulars en forma de complexos de pes molecular alt però fins ara ningú no ha pogut aconseguir purificar-les per tal de comparar llurs estructures i especificitat de substrat.

D'altra banda, en diferents laboratoris Brandt i cols. (219), Khandelwal i cols.(214), Gratecos i cols.(216), s'ha purificat una forma de proteïno-fosfatasa de pes molecular 35.000, presumiblement un component catalític del complex de subunitats. Quan aquest enzim era obtingut per precipitació amb etanol mostrava poca especificitat i encara que aquestes preparacions semblen ésser homogènies, la naturalesa funcional de l'enzim de 35.000 daltons sembla indicar que consisteixen en una mescla de diferents fosfatases de pes molecular similar (220).

A continuació es presenta les característiques i propietats reguladores de les proteïno-fosfatases definides amb més exactitud.

1.7.1. PROTEINO-FOSFATASA DEPENDENT DE Mn^{2+} .

Fischer i cols.(220) recentment han purificat a partir de sarcoplasma un complex de fosfatases de la fosforilasa de pes molecular 250.000 que conté tres polipèptids de 83.000, 72.000 i 32.000, respectivament, amb una estequiometria de 1:6:1. Encara no es coneix l'estructura molecular de l'enzim

però sí se sap que els enzims de 83.000 i 32.000 daltons són fosfatases catalíticament actives. La funció del polipèptid de 72.000 daltons no es coneix.

El complex total és activat 10 vegades per la presència de Mn^{2+} encara que l'activació de l'enzim no es relaciona amb la unió del metall a la proteïna. Per precipitació amb acetona i per mitjà de Sefacril S 200 s'obtingueren dos pics d'activitat.

El pic de pes molecular 83.000 presentà dependència de Mn^{2+} per la seva activitat mentre que el de 32.000 era independent de l'ion. Aquest últim polipèptid presenta característiques similars al ja purificat amb anterioritat per altres investigadors (219,214,216).

El mecanisme de l'activació per Mn^{2+} de l'enzim de 83.000 és encara obscur. L'ion no sembla incorporar-se a la proteïna i tampoc hi ha evidència que la fosfatasa sigui un metal·loenzim. Evidentment, l'explicació més simple és que l'enzim pateix un canvi de conformació per l'efecte del Mn^{2+} , encara que probablement han d'existir altres mecanismes que avui dia s'estan investigant.

1.7.2. PROTEÏNO-FOSFATASES TIPUS 1.

Les proteïno-fosfatases tipus 1 es caracteritzen per desfosforilar la subunitat beta de la quinasa de la fosforilasa i d'ésser inhibides potencialment pels inhibidors I_1 i I_2 davall descrits (221).

S'han identificat dues proteïno-fosfatases tipus 1, anomenades fosfoproteïno-fosfatasa 1 i fosfoproteïno-fosfatasa dependent d'ATP-Mg, respectivament.

1.7.2.1. Fosfoproteïno-fosfatasa 1 (PrP-1)

Aquest enzim ha estat purificat per Cohen i cols.(222). Existeix en dues formes de pesos moleculars 62.000 i 35.000 anomenades PrP-1a i PrP-1b, respectivament. Ambdues desfosforilen la subunitat beta de la quinasa de la fosforilasa i també la fosfatasa de la glicogeno-sintasa. Les dues formes de la PrP-1 són inhibides potentment per dues proteïnes musculars estables al calor anomenades inhibidor 1 (I_1) i inhibidor-2 (I_2) (223,224). I_1 presenta la capacitat d'actuar com a inhibidor només quan ha estat prèviament fosforilat en un residu de treonina per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

Del 80% al 90% de l'activitat de la fosfatasa de la fosforilasa i de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa, en extractes de múscul esquèlètic, pot ésser inhibida per I_2 (225), i més del 90% de l'activitat de la fosfatasa de la subunitat beta de la quinasa de la fosforilasa pot ésser també bloquejada per aquest inhibidor (221). Això demostra que la PrP-1 és un dels enzims reguladors més importants en el metabolisme del glicogen en teixit muscular.

1.7.2.1.1. Paper de l'inhibidor 1 en la regulació del metabolisme del glicogen.

I_1 és fosforilat per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic "in vitro" d'una manera semblant a com ho és la quinasa de la fosforilasa i la glicogeno-sintasa (226). Només es actiu en forma fosforilada i no és fosforilat ni per la quinasa de la fosforilasa ni per la quinasa-3 de la glicogeno-sintasa (162).

El fet que l'inhibidor-1 només sigui actiu quan es tro-

ba fosforilat incrementa la importància del paper de l'AMP cíclic en la regulació de la cascada glicogenolítica. De fet, aquesta sincronia d'efectes de l'AMP cíclic en estimular la fosforilació i inhibir la desfosforilació és una forma d'incrementar la sigmoicitat de la relació entre el nivell de fosforilació de l'enzim interconvertible i la concentració de l'efector. D'aquesta manera, acoblant la fosforilació dependent d'AMP cíclic de la quinasa de la fosforilasa amb la fosforilació també dependent d'aquest nucleòtid de l'inhibidor-1, l'activitat final de la glicogeno-fosforilasa resulta més sensiblement regulada pels canvis en la concentració d'AMP cíclic.

Més encara, ja que PrP-1 desfosforila centres que són fosforilables per proteïno-quinases diferents a la dependent d'AMP cíclic, l'acció de l'inhibidor-1 pot representar un mecanisme d'introduir control per l'AMP cíclic en proteïnes que són fosforilades per proteïno-quinases independents d'AMP cíclic.

Es de notar que si bé I_1 inhibeix PrP-1, I_1 no inhibeix la seva mateixa desfosforilació per part de PrP-1 fins i tot a altes concentracions de I_1 . Això pot ésser degut al fet que el lloc de fosforilació de I_1 és una treonina mentre que en les fosfoproteïnes que ell inhibeix aquest lloc és una serina. D'altra banda la desfosforilació de I_1 pot ésser inhibida per I_2 encara que es necessiten altes concentracions d'aquest últim inhibidor. En qualsevol cas, aquestes propietats de l'inhibidor-1 fan que no hagi necessitat d'invocar l'existència d'un altre enzim per desfosforilar I_1 .

Així, l'estat de fosforilació de I_1 "in vivo" pot ésser simplement un reflex de les activitats relatives de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i de la fosfoproteïno-fosfatasa-1. De tota manera, l'existència de altres fosfatases capaces de desfosforilar I_1 no pot menysprear-se i de fet "in

vitro" s'ha observat que PrP-2 pot desfosforilar I_1 (224).

1.7.2.1.2. Regulació "in vivo" del metabolisme del glicogen per l'inhibidor-1

El paper fisiològic de l'inhibidor-1 en la regulació del metabolisme del glicogen és abonat pels estudis realitzats en el laboratori de Cohen (227).

L'epinefrina provoca en múscul esquelètic un increment en l'estat de fosforilació de l'inhibidor-1 (des de un 30% a un 70%). A més, la concentració de l'inhibidor-1 en múscul, que és de 1,5 μ M és més alta que la concentració de PrP-1 (1,3 μ M) i l'afinitat de l'inhibidor per la proteïno-fosfatasa-1 és extremadament alta ($K_i=1,6 \mu$ M).

La insulina condueix a la situació inversa, és a dir, a l'estimulació de la desfosforilació de l'inhibidor amb el subseqüent decreixement en la seva activitat (2 vegades)(228). Aquesta inactivació de l'inhibidor-1 per la insulina té lloc entre els 10 i 15 min que és el temps requerit per l'activació de la glicogeno-sintasa muscular per la insulina.

1.7.2.2. Proteïno-fosfatasa dependent d'ATP-Mg

Merlevede i Riley (229) reportaren una fosfatasa de la fosforilasa l'activitat de la qual s'incrementava per incubació amb ATP-Mg. Posteriorment va ésser purificada per gel-filtració o per centrifugació en gradient de densitats de sacarosa. Finalment Goris i cols.(230) va separar d'aquest enzim, mitjançant DEAE-cel.lulosa, dos components anomenats Fc i Fa. Ambdós compostos eren necessaris per l'activitat fosfatàsica.

Fc ha estat parcialment purificat i és una fosfatasa inactiva, i Fa és el seu factor activador (231).

La fosfatasa de la fosforilasa dependent d'ATP-Mg ha estat identificada en fetge, cor i múscul esquelètic tant de rates com de conills, i en tots els casos podien separar-se els components Fc i Fa. Els components Fc i Fa de teixits diferents poden intercanviar-se (230).

Recentment, s'ha demostrat que la fosfatasa dependent d'ATP-Mg no és específica en desfosfilar la fosforilasa a i que té una especificitat de substrat pobre. Més encara, aquesta especificitat és idèntica a l'exercida per la PrP-1; així desfosforila la subunitat beta de la quinasa de la fosforilasa i és inhibida per I_1 i I_2 .

Sembla ésser que PrP-1 i Fc són formes interconvertibles d'un mateix enzim i que llurs quantitats relatives haurien de variar considerablement sota condicions diferents, metabòliques o hormonals.

El requeriment d'ATP-Mg així com el factor d'activació (Fa) per a activar Fc suggeriria que Fc és activat per fosforilació, però fins ara no hi ha cap evidència que suporti tal conclusió (221).

1.7.3. PROTEÏNO-FOSFATASES TIPUS-2

Les proteïno-fosfatases tipus-2 es caracteritzen per desfosforilar la subunitat alfa de la quinasa de la fosforilasa i d'ésser insensibles a l'acció dels inhibidors I_1 i I_2 damunt descrits (221).

Hom han identificat tres proteïno-fosfatases tipus-2

anomenades fosfoproteïno-fosfatasa -2b (PrP-2b), PrP-2a₁ i PrP-2a₂.

Aquestes tres proteïno-fosfatases van ésser separades per cromatografia en DEAE-cel.lulosa. El primer pic d'activitat fosfatasa de la subunitat alfa de la quinasa de la fosforilasa es va anomenar fosfoproteïno-fosfatasa 2b (PrP-2b) i presentava poca activitat fosfatasa de la fosforilasa. En canvi, el segon i tercer pics, anomenats PrP-2a₁ i PrP-2a₂, tenien tanta activitat fosfatasa de la fosforilasa com fosfatasa de la quinasa de la fosforilasa.

PrP-2b és predominantment abundós en múscul esquelètic, mentre que en el teixit hepàtic ho són PrP-2a₁ i PrP-2a₂.

Tamura i cols. (232,233) han purificat a homogeneïtat aquests darrers enzims. PrP-2a₁ està compost de tres subunitats, alfa, beta i gamma, els pesos moleculars dels quals són 35.000, 69.000 i 59.000, respectivament. PrP-2a₂ només té dues subunitats de pesos moleculars 35.000 i 69.000, respectivament.

Ambdós enzims poden dissociar-se per tractament amb etanol o mercaptoetanol 0,2 M cosa que els provoca una activació de quatre o cinc vegades. Mercès a la filtració per gel s'ha esbrinat que la subunitat catalítica d'aquests enzims és la subunitat alfa de 35.000 daltons. D'aquesta manera la subunitat alfa, tant de la PrP-2a₁ com de la PrP-2a₂, correspon clarament a la subunitat catalítica de la proteïno-fosfatasa hepàtica purificada prèviament per Lee i cols. La diferència entre PrP-2a₁ i PrP-2a₂ és que aquesta última manca de la subunitat gamma. A més, PrP-2b no conté la mateixa subunitat catalítica que PrP-2a₁ o que PrP-2a₂ (221).

Encara que la regulació del tipus-2 de proteïno-fosfatases no és coneguda, l'existència de dues subunitats, beta i gamma, que suprimeixen l'activitat de la subunitat catalítica

alfa suggereix la possibilitat que puguin regular l'activitat de l'enzim.

1.7.4. PROTEÏNO-FOSFATASES HEPATIQUES TIPUS C.

En els últims sis anys, en diversos laboratoris hom ha isolat una proteïno-fosfatasa de 35.000 daltons a partir de fetge, múscul esquelètic i múscul cardíac, que té poca especificitat de substrat i que és capaç de revertir la fosforilació produïda per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i d'altres tipus de proteïno-quinases (219,234). Aquest enzim, que va ésser anomenat proteïno-fosfatasa C era obtingut en un estat molt alt de purificació, a partir de cadascun dels teixits, per precipitació amb etanol a temperatura ambient.

Es pensava que aquest tractament dissociava la subunitat catalítica de 35.000 daltons d'una forma de pes molecular alta que contenia també subunitats reguladores (235). Si bé per un cert temps es va creure que aquesta proteïno-fosfatasa C era idèntica a la proteïno-fosfatasa-1b les experiències dels últims anys han manifestat que això no és així.

La proteïno-fosfatasa ha estat purificada últimament a partir de fetge de conills i sembla tenir un sol component basat en el criteri de filtració per gel. Ara bé quan es determina l'activitat d'aquesta proteïna amb quinasa de la fosforilasa com a substrat, en presència dels inhibidors I_1 o I_2 , es revela que la preparació de la proteïno-fosfatasa C és una barreja de dos enzims. Un l'activitat del qual desfosforila la subunitat beta de la quinasa de la fosforilasa molt més ràpidament que la subunitat alfa i que és inhibida potentment per I_1 i per I_2 , característiques que la fan idèntica a la PrP-1b de múscul esquelètic. La segona activitat desfosforila la subunitat alfa de la quinasa de la fosforilasa més

ràpidament que la subunitat beta i és insensible a I_1 i a I_2 , cosa que fa suggerir que la segona activitat és similar a la PrP-2 de múscul esquelètic. És a dir, sembla que la proteïno-fosfatasa tipus C de fetge de conill és una mescla de proteïno-fosfatasa tipus-2 amb petites quantitats de proteïno-fosfatasa tipus-1.

Jett i Hers(236) han estudiat la inhibició, de les formes natives de la fosfatasa de la fosforilasa i de les latents, produïdes per tractament amb etanol o per proteòlisi, per l'inhibidor estable al calor. Aquests autors observaren que en extractes frescos tant de fetge com de múscul la fosfatasa de la fosforilasa nativa era insensible a l'inhibidor, però, que per tractament suau, amb etanol o proteòlisi amb tripsina, s'inactivava progresivament la sensibilitat de l'inhibidor sobre les formes latents alliberades. Aquests autors conclouen, doncs, que probablement la sensibilitat de la fosfatasa de la fosforilasa a l'inhibidor no sigui més que un index d'una proteòlisi prèvia (218).

Tot i que les proteïno-fosfatases presenten, generalment, poca especificitat de substrat, hi han autors com Stalmans i cols.(237) que afirmen haver aconseguit purificar tres fosfatases de la glicogeno-sintasa que no contenen cap activitat detectable ni sobre la quinasa de la fosforilasa ni sobre la fosforilasa.

1.7.5. ACCIÓ D'EFECTORS DE BAIX PES MOLECULAR.

A part de les accions de metalls divalents que com el Mn^{2+} poden afectar l'activitat de les proteïno-fosfatases, altres efectors de baix pes molecular han estat descrits com a modificadors de llurs activitats.

Els nucleòtids afecten dramàticament l'activitat de les fosfoproteïno-fosfatases. Sutherland (238) va demostrar per primera vegada la inhibició de la fosfatasa de la fosforilasa per l'AMP en extractes musculars. Poc temps després Nolan i cols.(239) comunicaren que el lloc d'acció de l'AMP era el substrat, la fosforilasa a, i no la fosfatasa, perquè l'AMP no afectava la velocitat de desfosforilació d'un tetradecapèptid fosforilat derivat de la fosforilasa a per proteòlisi limitada.

Recentment ha estat proposat per Jakob i Diem(240) que el grau de complexació de Mg^{2+} amb l'ATP determina l'activitat de la fosfatasa de la fosforilasa. Així, un canvi, per exemple, un decreixement, en els nivells del nucleòtid d'adenina i de Mg^{2+} inhibirien la fosfatasa de la fosforilasa cosa que podria produir un efecte final d'activació de la fosforilasa per inhibició de la seva desfosforilació. Aquest podria ésser el mecanisme, tal com ha estat recentment descrit (151) de l'activació de la fosforilasa pel 2,4-dinitrofenol, un compost capaç de disminuir els nivells d'ATP.

L'efecte de l'ATP sobre la fosfatasa de la glicogeno-sintasa també ha estat descrit. Gilboe i Nuttall (241,242) revelaren que l'ATP a concentracions fisiològiques (2,5 mM) inhibia marcadament la interconversió de les formes "D" a "I" de la glicogeno-sintasa, i que aquesta inhibició podia ésser revertida per glucosa o glucosa 6-P.

La glucosa inactiva la fosforilasa a hepàtica i muscular. Aquest fet ha estat explicat com a conseqüència de la unió de la glucosa a la fosforilasa. Aquest complex és més fàcilment desfosforilable per la fosfatasa de la fosforilasa. D'aquesta manera la fosfatasa de la fosforilasa contribuiria en modular l'homeostasi hepàtica de carbohidrats independentment de regulació hormonal. La suposta relació entre la inactivació de la fosforilasa i l'activació de la glicogeno-sintasa repetidament argüida pel grup d'Hers es tracta a la secció 1.9.1.

L'efecte de la glucosa 6-P sobre l'activitat fosfatasa de la fosforilasa va ésser descrita per Martensen i cols.(243). Així mateix Hizukuri i Takeda (244), van descriure l'activació de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa de melsa per l'èster fosfòric en sis de la glucosa, aquest efecte va estar corroborat posteriorment per altres autors : Kato i Bishop per l'enzim de múscul esquelètic (245), Nakai i Thomas en l'enzim cardíac (208), Wang i cols.(246) utilitzant leucòcits polimorfonuclears humans, Lawrence i Larner (247) fent servir l'enzim d'adipòcits i Killilea i cols.(213) sobre una fosfatasa hepàtica altament purificada. A més, Hizukuri i Larner trobaren que la glucosa 6-P estimulava l'alliberació de $[^{32}\text{P}]$ a partir de la forma "D" de la glicogeno-sintasa (248). La possible relació entre aquest efecte i el mecanisme d'activació de la glicogeno-sintasa per part de diferents sucres és comentat a la secció 1.9.3.

1.7.6. EFECTES HORMONALS SOBRE LES PROTEINO-FOSFATASES HEPÀTIQUES.

Recentment, Shahed i cols.(249) han descrit que la insulina estimula l'activitat de la fosfatasa de la fosforilasa hepàtica tant "in vivo" com "in vitro". La mesura de la desfosforilació es realitzava per la quantificació de l'alliberació de $[^{32}\text{P}]$ a partir de $[^{32}\text{P}]$ -fosforilasa a exògena. La insulina incrementava l'activitat de l'enzim d'un 30-60% en almenys quatre condicions: en hepatòcits de rates alimentades i dejunes 24 hores; en fetge perfós i després de la injecció intravenosa de l'hormona. La identitat de la fosfatasa de la fosforilasa sensible a la insulina queda per esbrinar. L'efecte va ésser observat en extractes sotmesos a filtració per gel i, per tant, no sembla que sigui conseqüència d'efectors de

baix pes molecular.

Més recentment, Miller i cols. (250) han comunicat que l'activitat de la fosfatasa de la fosforilasa hepàtica no es modifica quan una suspensió d'hepatòcits és incubada tant en presència de glucagó com de vasopresina.

D'altra banda, quan aquests mateixos autors incubaven hepatòcits amb glucagó observaven una inactivació de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa acompanyada d'un increment en l'AMP cíclic intracel.lular i de l'activació tant de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid com de la de la fosforilasa. Aquest efecte del glucagó era limitat per l'addició simultània d'insulina. Si la incubació hom la feien amb vasopresina s'observava una inactivació similar de la fosfatasa de la sintasa, però, d'una manera independent de canvis en els nivells d'AMP cíclic o de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid. Finalment, la fosforilasa era significativament activada.

Aquests resultats suggereixen que l'activitat fosfatasa de la glicogeno-sintasa pot ésser modulada per hormones.

1.8. METABOLISME DE CARBOHIDRATS EN EL FETGE .

Els fetge juga un paper fonamental en el metabolisme de carbohidrats els quals s'interrelacionen en aquest teixit amb les vies metabòliques tant de lípids com d'aminoàcids.

El fetge està en situació anatòmica favorable per a regular el metabolisme de molts compostos, entre ells, els carbohidrats. Així, els sucres que s'absorbeixen pel budell a la sang, arriben ràpidament per la vena porta al fetge on són metabolitzats.

Els diferents monosacàrids, pateixen processos diversos en el fetge i formen compostos que a continuació entren a diferents nivells en les principals vies metabòliques.

La glicòlisi en el teixit hepàtic és baixa i es considera generalment que el seu paper en el fetge és amb preferència el de formar precursors per a processos biosintètics en lloc del de produir pirúvic per a la seva ulterior oxidació en el cicle dels àcids tricarboxílics. Per exemple, un precursor important derivat de la glicòlisi hepàtica és el glicerol-fosfat utilitzat en l'esterificació amb àcids greixosos

per a la formació de triglicèrids.

D'altra banda la gluconeogènesi hepàtica té una gran importància per la capacitat de transformar, si és necessari, làctic, glicerol i aminoàcids en glucosa. Tanmateix, si es compara la glucosa formada en fetge perfós a partir dels principals precursors gluconeogènics, s'observa que els que produeixen rendiments més alts són fructosa i dihidroxiacetona que entren en la gluconeogènesi a nivell de les trioses-fosfat.

1.8.1.METABOLISME DE LA FRUCTOSA I COMPOSTOS RELACIONATS

La fructosa de la dieta és metabolitzada principalment en el fetge ja que aquest òrgan conté els enzims necessaris per a metabolitzar-la; la fructoquinasa, l'aldolasa tipus B i la trioquinasa.

Ha estat molt controvertida si la utilització de la fructosa és via fructosa 1-P cap a la formació de dihidroxiacetona i gliceraldehid o si existeix altra via bioquímica (251, 252). Donat els alts nivells de fructosa 1-P que se'n troben després de l'administració de fructosa, hom pensa que si més no, gairabé tota la fructosa es metabolitza via fructosa 1-P (253). És a dir, majoritàriament, la fructosa és fosforilada en el carboni-1 per l'enzim fructoquinasa en presència d'ATP, K^+ , i Mg^{2+} . És interessant destacar que la fructoquinasa requereix altes concentracions de K^+ per la seva activitat.

La fructoquinasa no és específica de la fructosa puix que també fosforila en posició 1 als següents sucres: la L-sor^udosa, la D-tagatosa, la D-xilulosa, la L-galaheptulosa i la L-arabinulosa (254), és a dir l'enzim actua com a una cetoqui-nasa.

Cal fer notar que sorbosa i tagatosa són isòmers de la fructosa. Així, la L-sorbosa té canviat de posició l'hidroxil del carboni 5 respecte a la fructosa mentre que la D-tagatosa canvia el corresponent al carboni 4. Aquestes dues cetoses a l'igual que la fructosa són fosforilades en el carboni-1 per lliurar sorbosa 1-P i tagatosa 1-P, respectivament, i que tenen les mateixes característiques que la fructosa 1-P. Fins i tot s'acumulen d'igual manera després de l'administració intravenosa de les respectives cetoses.

La fructosa 1-P es desdoblada per l'aldolasa hepàtica en gliceraldehid i dihidroxiacetona-P. Aquest enzim és el mateix que desdobla la fructosa 1,6 di-P i que reuneix les dues trioses formades. L'aldolasa hepàtica s'anomena tipus B per exercir la mateixa activitat davant fructosa 1,6 di-P que a fructosa 1-P, a diferència amb la de múscul, aldolasa tipus A, més activa per la fructosa 1,6 di-P, amb una relació de unes 10 vegades sobre la fructosa.

El D-gliceraldehid és fosforilat a D-gliceraldehid 3-P per la trioquinasa i d'aquesta manera arriba a la via gluconeogènica. Tanmateix, han estat proposades dues vies alternatives per a la conversió del D-gliceraldehid a triosa-fosfat :

1) Per reducció a glicerol, mitjançant l'alcohol deshidrogenasa, tot seguit de fosforilació a alfa-glicerofosfat i subsegüent oxidació a dihidroxiacetona-P (255).

2) Per oxidació a àcid glicèric i conversió a àcid fosfoglicèric(256). No obstant, d'estudis cinètics dels enzims que metabolitzen el gliceraldehid (257) s'ha concluït que "in vivo" el D-gliceraldehid és utilitzat per la trioquinasa.

Una vegada format el gliceraldehid 3-P, pot metabolitzar-se bé per la via glicolítica o bé darrera condensació amb la dihidroxiacetona mitjançant l'aldolasa hepàtica com a fructosa 1,6 di-P que ja és en plena via gluconeogènica.

Altres composts relacionats amb el metabolisme de la fructosa és el sorbitol puix que mitjançant l'enzim sorbitol deshidrogenasa rendeix fructosa que es metabolitzarà pel seu camí particular.

La fructosa és un bon precursor gluconeogènic car l'administració intraperitoneal de la cetosa a rates provoca grans increments en els nivells de glucosa en la sang. Aquests increments són més elevats que els obtinguts a partir de dihidroxiacetona i fins i tot que els produïts pels productes finals de la glucòlisi, els àcids làctic i pirúvic.

Aquesta producció de glucosa per part de la fructosa, a més, es veu significativament incrementada per la presència de glucagò (258), epinefrina, isoproterenol i fenilefrina. Tanmateix aquest efecte d'estimulació de la gluconeogènesi per catecolamines és suprimit per l'antagonista beta-adrenèrgic propranolol i resta significativament en presència de l'antagonista alfa-adrenèrgic fentolamina. Aquestes observacions suggereixen que la formació de glucosa a partir tant de fructosa com de dihidroxiacetona és regulat únicament per un mecanisme beta-adrenèrgic.

1.9. REGULACIÓ DEL METABOLISME DEL GLICOGEN PER SUCRES.

El fetge juga un paper clau com a regulador de l'homeostasi. Així allibera glucosa a la sang quan la concentració d'aquesta baixa per sota de 5,5 mM i la capta quan excedeix aquest valor. Existeixen, doncs, mecanismes reguladors capaços d'adaptar la direcció del fluxe del metabolisme de la glucosa en el fetge.

L'any 1943, Cori i cols. van descriure que la glucosa inhibia la fosforilasa a de múscul. Així mateix Cahill i cols. (259) mostraren en tall de fetge que la síntesi de glicogen dependia en alt grau de la concentració de glucosa al medi. Posteriorment De Wulf i Hers van demostrar que l'administració de glucosa a ratolins, incrementava notablement la conversió de glucosa en glicogen hepàtic i paral·lelament l'activitat de la glicogeno-sintasa (255) .

El mecanisme detallat perquè la glicogeno-sintasa és activada per la glucosa i altres sucres en fetge ha estat estudiat per diferents autors i existeixen actualment diverses teories que intenten explicar-ho.

1.9.1. MECANISME SEQUENCIAL

En els darrers 7 anys, el grup d'Hers i cols han desenvolupat una teoria sobre els mecanismes de formació de glicogen a partir de glucosa en el fetge.

Aquesta teoria intenta d'explicar l'activació de la glicogeno-sintasa com a conseqüència de la prèvia inactivació de la glicogeno-fosforilasa que s'observa després de la incubació de les cèl.lules hepàtiques amb glucosa.

Així, segons aquests autors, la glucosa com a tal es lligaria a la fosforilasa a que adoptaria un estat conformacional més fàcilment desfosforilable per la fosfatasa de la fosforilasa i es donaria lloc la interconversió cap a la forma inactiva de la fosforilasa (forma b). Només quan l'activitat de la fosforilasa a estigués per sota d'un cert nivell (10% de la fosforilasa total) s'alliberaria la seva inhibició sobre la fosfatasa de la glicogeno-sintasa, efecte que produiria finalment l'activació de la glicogeno-sintasa. Ja que experimentalment la inactivació de la glicogeno-fosforilasa és lleugerament anterior a l'activació de la glicogeno-sintasa, aquests autors acorden que aquesta dilació és la necessària perquè la fosforilasa a sigui inactivada (260, 261, 262, 148). Aquest efecte d'inactivació també és exercit per diferents derivats de la glucosa, l'efectivitat dels quals en inhibir la fosforilasa a en ordre decreixent és: glucosa 1,5-anhidroglucitol alfa metil glucòsid 2-desoxiglucosa. El derivat 3-metil glucosa no exercí cap efecte inhibidor. (148). ESQUEMA III

Altres autors, Whitters i Avruch (263), aplicaren també aquesta teoria seqüencial com a part intregant del mecanisme d'acció de la insulina.

ESQUEMA III MECANISME SEQUENCIAL POSTULAT PER HERS I COLS.

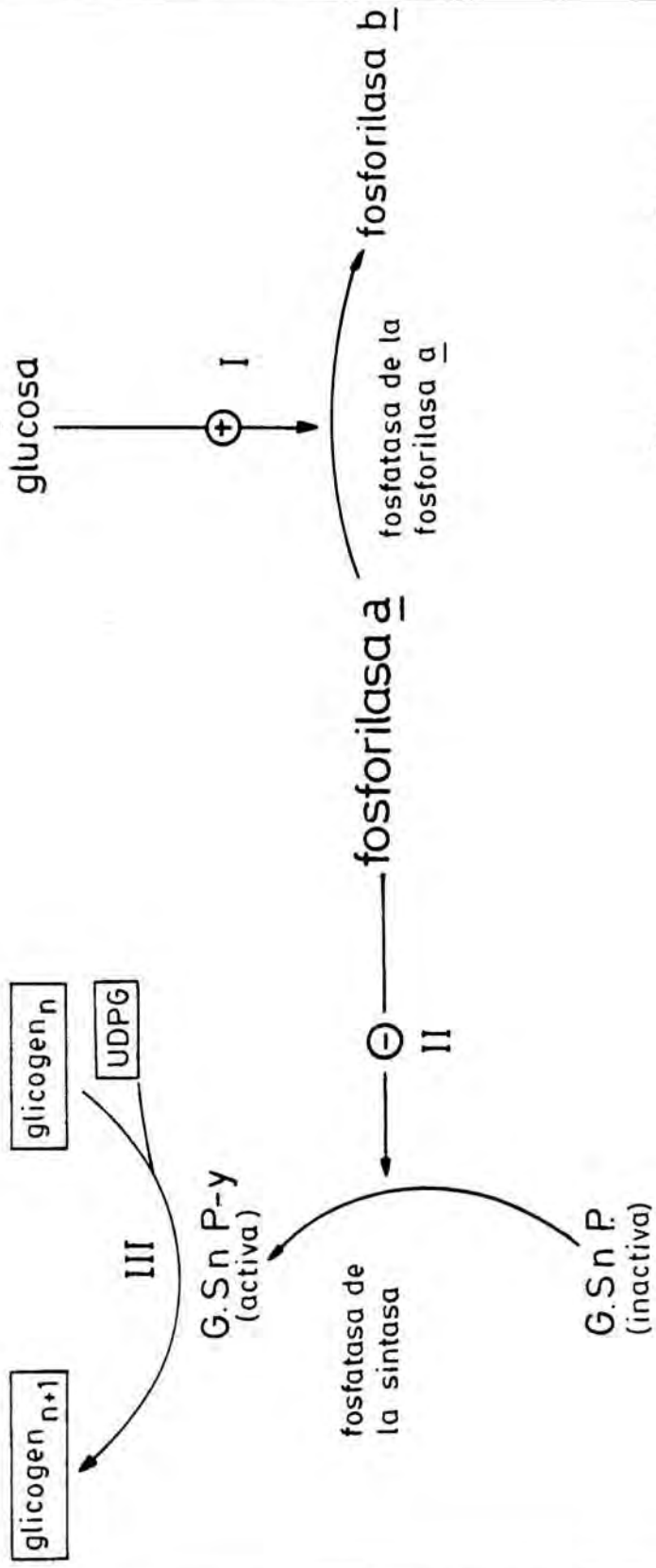
Mecanisme d'activació de la glicogeno-sintasa per la glucosa, en la cèl.lula hepàtica, tal com fou postulat pel grup d'Hers.

I. La glucosa estimula la reacció de la fosfatasa de la fosforilasa a. D'aquesta manera la fosforilasa a s'interconverteix en fosforilasa b.

II. Una vegada disminuïda l'activitat de la fosforilasa a per sota d'un cert nivell (10% de la total) i ja que la fosforilasa a és un inhibidor de la fosfatasa de la sintasa, la glicogeno sintasa és desfosforilada i subseqüentment activada.

III. La glicogeno-sintasa activada és la responsable de la síntesi de glicogen.

glucosa



cèl·lula hepàtica

1.9.2. EVIDÈNCIES PER UN MECANISME NO SEQUENCIAL

Whitton i Hems (264) observaren que la galactosa no afectava l'activitat de la fosfatasa de la fosforilasa i per tant tampoc modificava els nivells de fosforilasa a. D'altra banda la galactosa era capaç d'incrementar l'activitat de la glicogeno-sintasa. Aquests autors conclouen en afirmar que el receptor de hexoses en la cèl.lula hepàtica no necessàriament havia d'estar acoblat a l'activitat de la fosfatasa i que alternativament devia existir un altre mecanisme de síntesi de glicogen en el fetge .

Així mateix Nutall i cols. (265) van trobar un increment en l'activitat de la glicogeno-sintasa i un decreixement en la de la fosforilasa com a resposta a una dosi oral de glucosa. Ara bé la glicogeno-sintasa s'activava ràpidament mentre que la fosforilasa necessità 15 minuts per la seva inactivació. Aquests resultats suggereixen l'existència de mecanismes que controlen les activitats sintasa i fosforilasa per separat.

De manera semblant Miller (266) després d'injectar a rates normals un serum antiinsulina, no observà cap modificació en l'activitat fosforilasa hepàtica com a resposta a la infusió de glucosa mentre que la glicogeno-sintasa sí que s'activava.

1.9.3. MECANISME D'ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA MITJANÇANT ESTERS-FOSFÒRICS

Foren Lawrence i Larner (247) qui desenvoluparen una teoria per explicar l'activació de la glicogeno-sintasa que involucrava el éster fosfòric en 6 de la glucosa. Aquests autors proposaren la necessitat de la prèvia fosforilació de la glu-

cosa per la subseqüent activació de la glicogeno-sintasa en adipòcits. L'éster fosfòric en sis de l'hexosa seria el responsable de provocar un increment en l'activitat de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa. Aquesta teoria està basada en l'observació segons la qual la glucosa 6-P pot activar "in vitro" la fosfatasa de la glicogeno-sintasa. Aquest fet fou descrit inicialment per Hizukuri i Takeda en melsa (244), i posteriorment confirmat en múscul (245) i fetge (213).

Els autors esmentats (247) van demostrar "in vitro" que la glucosa 6-P i 2-deoxiglucosa 6-P incrementaven l'activitat de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa mentre que les hexoses lliures no exercien l'efecte. De la mateixa manera, Itarte i cols.(267) demostraren "in vitro" que la conversió cap a les formes més actives fisiològicament de la glicogeno-sintasa muscular de granota era altament estimulada pels sucres fosfat i pràcticament immodificada per la glucosa lliure.

D'acord amb els resultats damunt descrits aquesta teoria proposa per la glucosa com a factor principal per l'activació de la glicogeno-sintasa l'increment intracel.lular previ dels nivells de sucre-fosfat.

1.9.4. EFECTES DE LA FRUCTOSA SOBRE ELS ENZIMS REGULADORS DEL METABOLISME DEL GLICOGEN.

L'efecte de la fructosa sobre els enzims del metabolisme del glicogen és obscuriels resultats dels diferents autors són sovint contradictoris.

L'any 1974, Thurston i cols (268) i Van ded Berghe i cols (269) reportaren que l'administració d'una dosi de fructosa per via intravenosa a la rata,provocava, després de 10 minuts,una activació de la glicogeno-sintasa i una inactiva-

ció de la fosforilasa. La injecció amb els isòmers de la fructosa, tagatosa i sorbosa, no modificaven l'activitat de la fosforilasa a. Aquests autors explicaven la inactivació de la fosforilasa com a conseqüència de la reducció en el contingut de Pi i de l'increment en els nivells de fructosa 1-P. Amb anterioritat, s'havia descrit que la fosforilasa a purificada era inhibida "in vitro" per fructosa 1-P, glicerol 3-P i fructosa 1,6 di-P (270, 269, 271).

Posteriorment Walli i cols (149) en 1975, van comunicar que després de 5 minuts d'haver administrat una dosi de fructosa a rates normals, és produïa una activació de la fosforilasa, mentre que als 25 minuts s'hi trobava inactivada, molt probablement per la ràpida conversió de fructosa en glucosa, cosa que feia difícil albirar els efectes de la cetosa.

Més recentment Miller (272) en 1978, estudià en fetge perfós. l'efecte de concentracions iguals de glucosa i fructosa, afegides independentment, sobre els enzims reguladors del metabolisme del glicogen. Així, van observar que la perfusió amb glucosa conduïa a una activació de la glicogeno-sintasa i una inactivació de la glicogeno-fosforilasa, sense cap modificació en els nivells d'AMP cíclic ni en l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid. En canvi, si la perfusió es feia amb fructosa es produïa una activació de la glicogeno-fosforilasa sense cap variació en l'activitat de la glicogeno-sintasa. A més, aquest autor atribuïa la dita activació de la fosforilasa a l'increment en els nivells d'AMP cíclic i de l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid que en els seus experiments s'observava.

Jakob (273) també reportà un increment en l'activitat de la glicogeno-fosforilasa després de la infusió de fructosa en fetge perfós i relacionà l'activació de l'enzim per la cetosa a la decreixença en la relació ATP/AMP que hom podia observar.

Aquesta associació efecte a causa la va fer perquè prèviament havia observat que inhibidors metabòlics com ara l'iodoacetat i l'ion cianur disminuïen els nivells d'ATP i produïen concomitantment l'activació de la fosforilasa hepàtica. Tanmateix, aquest autor també apuntava que els canvis en la relació de nucleòtids eren només aparentment la causa de l'activació de la fosforilasa puix que després de 20min d'infusió del fetge amb fructosa la relació ATP/AMP continuava disminuïda mentre que l'activitat de la fosforilasa havia retornat al nivell basal. Finalment, suggeria que una redistribució dels ions, calci, magnesi o d'altres electrolits provocada per la ràpida caiguda intracel·lular d'ATP podia d'haver estat la causa més directa de l'activació de la fosforilasa.

Per últim Van de Werve i Hers (274) reportaren que la fructosa a concentracions que anaven des de 7-28 mM no activava la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic ni produïa canvis estables en l'activitat de la quinasa de la fosforilasa b malgrat provocar una notable activació de la fosforilasa.

A concentracions altes de la cetosa (30 mM) s'observava una activació molt lleugera i irregular tant de la histona quinasa com de la quinasa de la fosforilasa b. A més l'observació de l'activació sobre la darrera activitat enzimàtica era dependent de la presència d'ions potasi.

Així mateix observaren una dosi-dependència entre els nivells d'ATP i l'activació de la fosforilasa, Aquest autors concluíren proposant que l'activació de la fosforilasa per fructosa era deguda a l'activació de la quinasa de la fosforilasa provocada com a conseqüència del decreixement en la relació ATP/Mg^{2+}

1.10. REQUERIMENTS PER A LA SÍNTESI DE GLICOGEN

Es sens dubte la mateixa glucosa uns dels estimuladors més potents de la síntesi de glicogen en el fetge. La perfusió del fetge amb glucosa o la incubació d'hepatòcits amb glucosa mena a la síntesi de glicogen la qual és dependent de la dosi de l'hexosa emprada (275, 149, 264, 276).

L'estat de dejuni retarda, en principi, la síntesi de glicogen. Així, en fetge perfós, la velocitat de captació de restes glicosils cap a la glicogen a partir d'una concentració de glucosa de 10 mM és de 0,27 i 0,40 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de fetge de rates dejunes i alimentades, respectivament. Tanmateix, a una concentració de glucosa més alta (20 mM) la velocitat de captació de restes glucosils és la mateixa per ambdós estats i igual a 0,8 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ fetge. A una concentració de glucosa superior (40 mM) la velocitat de captació arriba a ésser de 1,6 i 2,2 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de fetge de rates dejunes i alimentades, respectivament. (275)

La velocitat de captació de restes glucosils pels hepatòcits està compresa entre el 60-70% dels valors esmentats per fetge perfós.

La velocitat de síntesi de glicogen pels hepatòcits a una concentració de glucosa de 40 mM és del voltant de 0,6 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ de fetge. La velocitat de fosforilació de la glucosa també s'incrementa paral·lelament als dos paràmetres abans esmentats (275).

La quantitat de glicogen sintetitzat és un reflexe de l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa. A tal punt és interessant l'observació d'Exton i cols (277) que afirmen que la mínima concentració de glucosa capaç d'activar la glicogeno-sintasa és 11 mM. D'acord amb aquest resultat hi ha l'observació feta per Walli i cols (278) sobre la mínima concentració de glucosa necessària per a evitar la degradació de glicogen i que és de 8-10 mM.

Hi ha diferents substrats carbonats que actuen finalment com a donadors de glucosils, així galactosa, fructosa, dihidroxiacetona són bons substrats, a part de la glucosa, per a la síntesi de glicogen.

Les condicions iòniques per a la síntesi també tenen molta importància. Així, l'ion K^+ incrementa notablement la velocitat de síntesi de glicogen a partir de glucosa (279). Un efecte similar però més ràpid en el temps és exercit per l'ion Liti (Li^+) (280).

Finalment la insulina ja a molt baixes concentracions incrementa notablement la síntesi de glicogen en el fetge.

1.11. EFECTE DEL DEJUNI SOBRE EL METABOLISME HEPATIC DEL GLICOGEN .

De gran interés és l'estudi que Shikama i cols.(281) van realitzar sobre les variacions en les activitats enzimàtiques glicogeno-sintasa i fosforilasa com a resposta al dejuni progressiu.

La seqüència d'esdeveniments que aquest autors trobaren fou la següent:

a) En una fase inicial corresponent a les hores d'alimentació dels animals la glicogeno-sintasa estava en un estat d'activació elevat i es produïa la síntesi de glicogen. Simultàneament la fosforilasa estava inactivada i s'afavoria d'aquesta manera la síntesi del polisacàrid.

b) A les 4-5 hores després de retirar el menjar a les rates es produïa una caiguda en l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa mentre que la fosforilasa començava, molt lleugerament, a activar-se. Aquesta situació es perllongava durant unes 5-6 hores més.

c) A partir d'aquest moment tant la glicogeno-sintasa com la fosforilasa s'activaven notablement. A les 24 hores de dejuni la glicogeno-sintasa es trobava en un estat molt alt d'activació, gairabé a un 80% de l'observat en el seu zenit d'activitat glicogènica en l'estat alimentari.

D'aquests resultats aquests autors conclouen que hi ha una relació recíproca entre el contingut de glicogen en el fetge i l'activitat glicogeno-sintasa. Per explicar aquest fet esgrimeixen la inhibició "feed-back" observada "in vitro" per la glicogeno-sintasa davant el seu producte, el glicogen.

L'activació de la fosforilasa és explicada pels increments en la secreció de glucagó i subseqüents nivells elevats d'AMP cíclic com a conseqüència del dejuni.(28).

Els autors fan notar el paper important que pot jugar un estat d'activació incrementat de la glicogeno-sintasa; en les condicions de dejuni, en vistes a una més ràpida resposta de síntesi de glicogen davant una subseqüent alimentació.

Goldstein i Curnow (282) també observaren un increment en l'activitat basal, tant en l'activitat independent de la glicogeno-sintasa com en l'estat d'activació de la proteïna-quinasa dependent d'AMP cíclic, com a conseqüència de l'estat de dejuni.

1.12. METABOLISME DEL GLICOGEN EN L'ESTAT DIABÈTIC .

Com a primera aproximació es pot resumir que l'estat diabètic condueix a un menor grau d'activació basal de la glicogeno-sintasa hepàtica i una resposta deprimida a la glucosa en comparació a l'observada en rates normals.

En efecte, el valor basal de l'estat d'activació de la sintasa es troba disminuït respecte al de les rates normals en un 100% com a mínim. El valor basal en la relació d'activitats $-G\ 6-P/+G\ 6-P$ de la glicogeno-sintasa per rates normals dejunes es d'aproximadament el 20% i és rebaixada a un valor del 10% o inferior a l'estat diabètic.

El valor basal de l'activitat glicogeno-fosforilasa s'incrementa lleugerament per efecte de la diabetis en fetge perfós, segons resultats de Whitton i Hems (283). D'altra banda Miller (284) treballant sobre el mateix model experimental observà un decreixement del nivell basal d'aquest enzim. És evident, doncs, que no hi ha un acord en aquest aspecte.

Que la glucosa pràcticament no incrementa l'activitat de la glicogeno-sintasa ni mena a síntesi neta de glicogen

en l'estat diabètic, és una observació compartida per tots els autors que ho han estudiat (283, 284, 285). Només a altes concentracions d'aquest sucre poden observar-se efectes molt lleugers sobre l'activitat de la glicogeno-sintasa (285).

Pel que fa a l'activitat de la glicogeno-fosforilasa Whitton i Hems (283) observaren una petita inactivació per efecte de la perfusió de fetges de rates diabètiques amb glucosa, mentre que Miller (284) no va observar cap diferència respecte als controls.

Tant l'activació de la glicogeno-sintasa com la síntesi de glicogen són parcialment restaurades en l'estat diabètic si en el medi de perfusió o en el d'incubació de les cèl·lules s'introdueixen a més de la glucosa certs substrats gluconeogènics. Així, Katz i cols. (285) van descriure un feble efecte d'activació de la glicogeno-sintasa quan dihidroxiacetona o fructosa eren afegits al medi d'incubació dels hepatòcits que ja contenia glucosa. Aquest efecte, però, fou molt petit comparat amb el produït quan s'introduïu addicionalment en el medi d'incubació la glutamina. En presència d'aquest aminoàcid, sempre segons aquests autors, s'aconseguien valors de síntesi de glicogen molt propers als determinats per hepatòcits de rates normals.

Whitton i Hems (283) observaren un efecte similar de gran increment en la síntesi de glicogen en fetge perfós de rates diabètiques, però només quan s'injectava "in vivo" als animals una barreja de glucosa més fructosa. La injecció subcutània s'efectuava 50 min abans de la perfusió del fetge, i consistia en un volum de 2 ml d'una barreja de glucosa més fructosa a una relació de concentracions de 5:1 (1,25 M glucosa més 0,25 M fructosa). L'explicació per aquesta restauració de la síntesi de glicogen en l'estat diabètic quan s'incubava la glucosa amb aquests precursors gluconeogènics és per ara desconeguda.

L'any 1969, Gold (286) descrivia que l'efecte de la diabetis consistia en un defecte del sistema interconvertidor de la glicogeno-sintasa cap a les formes més actives. Realment l'estudi del possible defecte enzimàtic relatiu a la diabetis s'esdevenia molt complexe ja que diverses eren les possibilitats per un mateix efecte final. Concretament la deficiència de la glicogeno-sintasa per activar-se podia residir tant en:

- 1-Un increment en l'activitat proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic basal i (o) com a resposta a la glucosa.
- 2-Un defecte en el sistema per a fosforilar la glucosa i lliurar glucosa 6-P.
- 3-La generació d'inhibidors de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa.
- 4-Un increment en la inhibició de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa per efecte de la fosforilasa a.
- 5-Una alteració de la molècula de la glicogeno-sintasa.
- 6-Una alteració en la molècula de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa, (ESQUEMA IV)

Mercès al treball aquests últims 13 anys i fonamentalment als experiments portats a terme en els laboratoris de Miller i de Gold les diverses probabilitats del defecte enzimàtic inherent a la diabetis s'han anat descartant encara que actualment no se sap amb precisió l'origen del defecte.

Tot seguit descrivim els resultats dels experiments realitzats atenent a la sèrie de possibilitats anteriorment esmentades.

1-La glucosa no alterava la resposta de l'activitat proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic tant en fetge perfós de rates normals com en diabètiques. I si bé el nivell inicial basal d'activitat d'aquest enzim era superior en rates diabè-

ESQUEMA IV POSSIBLES DEFECTES ENZIMÀTICS INHERENTS A LA DIABETIS EN EL METABOLISME HEPÀTIC DEL GLÍCOGEN.

El decreixement en l'activitat basal de la glicogeno-sintasa de cèl.lules diabètiques, així com la síntesi pràcticament nul.la de glicogen en hepatòcits incubats amb glucosa poden ésser conseqüència d'una o més de les alteracions següents:

I. Increment en l'estat d'activació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

II. Deficiència en la fosforilació de la glucosa per rendir glucosa 6-P.

III. Generació d'inhibidors de la reacció de la fosfatasa de la sintasa.

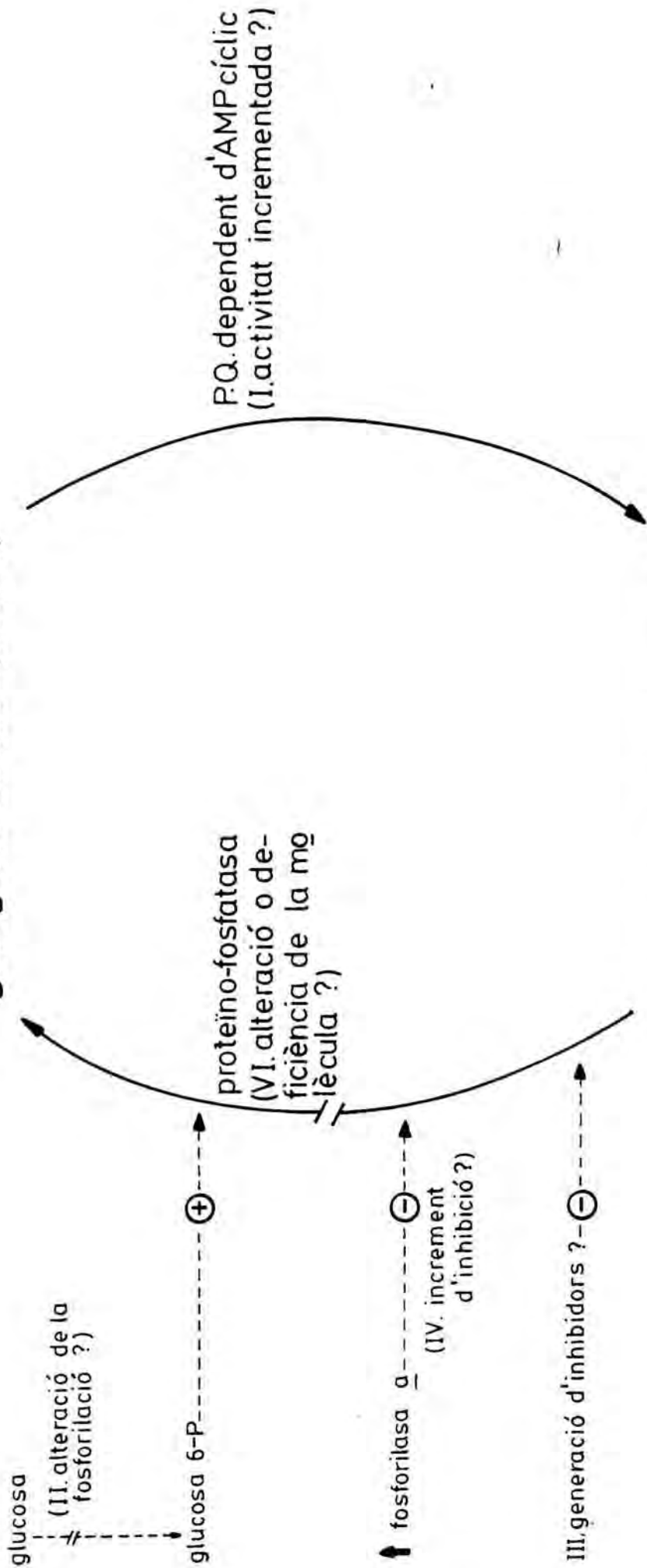
IV. Inhibició de la fosfatasa de la sintasa per uns hipotètics nivells incrementats de fosforilasa α .

V. Alteració de la molècula de la glicogeno-sintasa.

VI. Alteració o deficiència de la molècula de fosfatasa de la sintasa.

glicogeno-sintasa(activa)

glicogeno-sintasa(inactiva)
(V. alteració en la molècula ?)



tiques que en les normals, poc temps després de la perfusió (10 min) estaven igualats. De tota manera ja que la glucosa per per si sola no exercia cap efecte sobre aquesta activitat enzimàtica no semblava que la diabetis estigués relacionada amb una alteració en l'activitat d'aquesta proteïno-quinasa (284).

2-Ja que la G6-P ha estat descrita com a activador de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa, un defecte en el sistema de fosforilació de la glucosa, per exemple per part de la glucoquinasa, conduiria a nivells reduïts de G6-P i per tant a un decreixement en l'activitat de la glicogeno-sintasa. Tanmateix, els nivells de G6-P després d'una infusió del fetge perfós amb glucosa eren els mateixos tant en fetges de rates normals com de diabètiques, cosa que feia descartar la dita possibilitat (284).

3-Khandelwal i cols. (287) havien reportat l'existència d'un inhibidor de la fosfoproteïno-quinasa en el fetge de rates diabètiques. Davant d'aquesta proposta Miller i cols. (288) van determinar l'activitat fosfatasa de la fosforilasa en extractes hepàtics, progressivament diluïts, de rates diabètiques i normals, i també en una barreja de tots dos tipus d'extractes. Sí realment existien inhibidors de la fosfoproteïno-fosfatasa s'hauria d'haver revelat per l'efecte de la dilució. Ben al contrari, no s'observà cap activació addicional de la fosfatasa de la sintasa per efecte de la dilució i els efectes de les barreges dels extractes diluïts tant de rates normals com de diabètiques eren additius.

Aquests resultats suggerien que no era provable la disminució de l'activitat fosfatasa de la glicogeno-sintasa en l'estat diabètic per efecte d'un inhibidor.

4-Stalmans i cols, (261) mostraren que la fosfatasa de la glicogeno-sintasa era inhibida per la fosforilasa a i sub-

seqüenment proposaren aquest fet per a explicar la regulació de la fosfatasa de la sintasa "in vivo". Per aquesta raó i ja que en l'estat diabètic el nivell de fosforilasa a és superior al de les rates normals cabia la possibilitat que en l'estat diabètic la fosforilasa de la sintasa es trobés significativament inhibida, Miller i cols. (288) realitzaren una sèrie de determinacions de l'activitat de la fosfatasa de la sintasa en extractes de rates normals i diabètiques en presència d'un serum antifosforilasa a i arribaren a la conclusió que els nivells de fosforilasa a no semblaven jugar un paper important en la disminució de l'activitat fosfatasa de la sintasa.

5-Que en l'estat diabètic la molècula de sintasa és defectuosa per a actuar com a substrat en la reacció amb la fosfatasa no sembla tampoc ésser el defecte enzimàtic inherent a la diabetis. Miller i cols. (288) determinaren l'activitat fosfatasa utilitzant sintasa D purificada de rates normals. Adhuc en aquestes condicions l'activitat de la fosfatasa romaní un 95% per sota dels valors basals obtinguts per fetge de rates normals.

L'estudi i caracterització més detallat de la molècula de glicogeno-sintasa purificada a partir de rates diabètiques i la seva comparació amb la purificada de rates normals ha estat molt recentment descrit per Bahnak i Gold (289).

Segons aquests autors, la glicogeno-sintasa de rates normals i diabètiques tenen el mateix pes molecular per subunitat, Els dos enzims reaccionen d'igual manera amb un anticòs antisintasa. Ambdós enzims tenen la mateixa afinitat pel substrat la UDP-glucosa i per llur activador, la glucosa 6-P. Així mateix tots dos enzims són susceptibles d'ésser interconvertits. (de la "forma D" a la "I") quan són incubats "in vitro" amb fosfatasa de la sintasa parcialment purificada. Aquests autors conclouen que la diabetis no condueix a la formació d'un tipus de glicogeno-sintasa anormal que no és susceptible d'interconversió.

A hores d'ara, els resultats sobre les diferents activitats enzimàtiques del metabolisme del glicogen en l'estat diabètic apunten fortament cap a la fosfatasa de la glicogeno sintasa com a enzim responsable del defecte enzimàtic ànherent a la diabetis.

1.13. EFECTES HORMONALS SOBRE EL METABOLISME HEPÀTIC DEL GLICOGEN ,

En les anteriors seccions hem anat passant revista als principals elements que poden intervenir en els mecanismes d'acció de les hormones que afecten el mecanisme del glicogen. Si bé en determinats punts de l'exposició s'ha detallat un efecte hormonal sobre una determinada activitat enzimàtica, en les pàgines que ens ocupen intentarem exposar els coneixements sobre el control del metabolisme hepàtic del glicogen exercit per cadascuna de les hormones en particular. Bàsicament la revisió es realitzarà atenent a dos grans grups:

- a) Hormones que estimulen la glicogenòlisi
- b) Hormones que la suprimeixen

1.13.1.HORMONES QUE ESTIMULEN LA GLICOGENÒLISI

1.13.1.1.Glucagó

Es un pèptid segretat per les cèl·lules alfa del pàncreas. El glucagó provoca la glucogenòlisi en fetge perfós a concentracions tan baixes com 10^{-10} M o fins i tot menor (290).

El glucagó després d'interactuar amb el seu receptor de membrana que està associat a l'activitat adenil-ciclasa, provoca un augment en els nivells intracel·lular d'AMP cíclic. Aquest nucleòtid dispara la cascada glicogenolítica fins a arribar a l'activació de la fosforilasa que dona lloc a l'alliberament de glucosa; és a dir, la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic és activada per aquest nucleòtid i la quinasa de la fosforilasa s'activa mitjançant la intervenció de la subunitat catalítica de l'anterior enzim.

1.13.1.2. Catecolamines

Les catecolamines estimulen la glicogenòlisi a través de dos mecanismes d'acció que probablement involucren senyals secundaris. Un mecanisme que és dependent dels nivells d'AMP cíclic i un altre encara no ben conegut però que sembla ésser conseqüència de canvis tampoc ben definits en el fluxe intracel·lular del catió calci.

Els receptors de les catecolamines en el teixit hepàtic han estat classificats en alfa i beta sobre la base de l'acció de diferents grups d'antagonistes i agonistes.

Els receptors beta-adrenèrgics es caracteritzen per ésser bloquejats específicament per tant propranolol com per practolol (290). Els receptors beta-adrenèrgics estan relacionats amb l'activitat adenil-ciclasa a la qual poden activar. En aquest cas la glicogenòlisi és produïda via AMP cíclic.

Els receptors alfa-adrenèrgics són bloquejats específicament per antagonistes com fentolamina (14), fenoxibenzamina (15) i dihidroergotamina (291). L'activació dels receptors alfa-adrenèrgics es relaciona d'alguna manera amb canvis en el fluxe de calci intracel·lulars i provoquen finalment l'acti-

vació de la fosforilasa i de la glicogenòlisi.

Recentment s'han descobert subreceptors alfa específics alfa 1 i alfa 2. Els receptors alfa 1 són antagonitzats per prazosin i els alfa 2 per la yohimbina.

1.13.1.2.1. Epinefrina

L'epinefrina o adrenalina activa la glicogeno-fosforilasa i provoca la glicogenòlisi en fetge de rata normal (290). L'hipotiroidisme, d'altra banda, anul·la l'activació de la fosforilasa com de la glicogenòlisi produïda per aquesta hormona (111).

L'efecte de l'epinefrina en activar la glicogeno-fosforilasa és fonamentalment mediatitzat a través d'un mecanisme alfa-adrenèrgic, és a dir per una via independent d'AMP cíclic (15). Nogensmenys, a molt altes concentracions de l'hormona hom poden detectar lleugers increments en els nivells d'AMP cíclic i en l'estat d'activació de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid (60). En qualsevol cas aquests increments són bloquejats si prèviament s'incuben les cèl·lules hepàtiques en presència del bloquejant beta-adrenèrgic propranolol (152). En aquestes condicions de bloqueig sembla ésser que els efectes de l'epinefrina sobre l'activació de la fosforilasa són mediatitzats via calci, que actuaria com a missatger secundari. Ja que paral·lelament s'ha observat l'activació de la quinasa de la fosforilasa per quantitats micromolars de calci, Exton i cols. (292) van emetre la hipòtesi que aquest enzim podria ésser activat al·lostèricament pels canvis en el fluxe intracel·lular d'aquest catió i d'aquesta manera activar finalment la fosforilasa. Cal fer esment que encara que aquesta és una hipòtesi altament suggestiva, a hores d'ara no hi ha cap evidència experimental directa en què s'hagi

observat aquesta acció de la quinasa de la fosforilasa.

La proteïna calmodulina és considerada un receptor universal del senyal de calci capaç de modificar posteriorment l'activitat de l'enzim al que es lliga. D'altra banda la calmodulina és inhibida per drogues fenotiazíniques com ara la trifluoperazina i clorpromazina. Tenint en compte aquestes premisses diversos investigadors (293,294) van incubar cèl.lules hepàtiques amb trifluoperazina i tot seguit adicionaven epinefrina per tal de veure si l'efecte de la catecolamina sobre la fosforilasa era bloquejat o disminuït per la droga fenotiazínica. Donat que els experiments, tal com havien estat plantejats, foren afirmatius, aquests autors els interpretaren com que les catecolamines realment activaven la calmodulina via calci amb el subsegüents efectes sobre la resta d'enzims de la cascada glicogenolítica. Tanmateix el grup d'Exton ha demostrat que el veritable efecte de la droga fenotiazínica no era altre que el de lligar-se al receptor alfa adrenèrgic, efecte que impideix la unió de l'epinefrina i la seva acció intracel.lular (295). Aquesta demostració invalida les conclusions abans esmentades i anul.la l'ús d'aquestes drogues en estudis amb cèl.lules senceres almenys fins que no es trobin inhibidors específics per la calmodulina a l'interior de la cèl.lula. Aquests resultats també revelen la gran cura que s'ha de tenir quan agents farmacològics que tenen propietats característiques en un sistema s'utilitzen en altres.

1.13.1.2.2. Fenilefrina

L'agonista alfa-adrenèrgic fenilefrina és capaç de produir la glicogenòlisi per acció de la fosforilasa. Fins a una concentració de fenilefrina de 10^{-6} M, els seus efectes semblen ésser independents dels nivells intracel.lulars d'AMP cíclic. Concentracions de l'hormona més elevades, de

l'ordre de 10^{-5} i 10^{-4} M, produïen, però, una lleugera activació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (60)

L'efecte de la fenilefrina en activar finalment la fosforilasa és bloquejat per la fenoxibenzamina i immodificat pel propranolol. La incubació de les cèl.lules hepàtiques amb fenilefrina condueix, a l'igual que l'epinefrina, a un increment en la concentració citosòlica de l'ion Ca^{2+} . Encara no està ben determinat l'origen d'aquest calci (292, 296). Les dades més recents apunten a la mitocòndria com a lloc de procedència d'aquest ion. El que sembla més segur és que aquest augment en la concentració citosòlica de calci no prové del calci extracel.lular, ja que els experiments en cèl.lules incubades en un medi en absència total de calci extracel.lular conduïen al mateix increment de calci citosòlic després de l'addició de l'efector alfa-adrenèrgic.

Altres autors com Althaus-Salzman i cols.(297) advoquen com a font de calci, en l'estimulació alfa-adrenèrgica per la fenilefrina, no solament la mitocòndria sinó també un altre compartiment localitzat prop de la superfície de la cèl.lula.

Independentment de la font d'origen de l'ion calci, la majoria d'autors han emès la hipòtesi que aquest increment de calci d'alguna manera incrementa l'activitat de la quinasa de la fosforilasa i aquesta a la vegada la de la fosforilasa. Exton i cols. mantenen la teoria que aquesta activació pot ésser de tipus allostèric (296). S'ha de destacar, però, que fins ara no s'ha detectat cap increment estable en l'activitat quinasa de la fosforilasa per efecte de la fenilefrina.

1.13.1.3. Vasopresina, Angiotensina II i Oxitocina.

Aquestes tres hormones tenen una actuació en comú: l'activació de la glicogenòlisi i de l'activitat de la fosforilasa sense cap modificació en els nivells d'AMP cíclic o en l'estat d'activació de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid. Aquest resultat, malgrat semblar "negatiu" suggereix fortament l'existència d'un altre mecanisme d'activació de la fosforilasa que el relacionat amb l'increment en la concentració intracel·lular d'AMP cíclic.

Són interessants els resultats de Blackmore i Exton (112) respecte a l'efecte de la vasopresina i fenilefrina sobre hepatòcits aïllats de rates gsd/gsd, que són deficientes en l'activitat enzimàtica quinasa de la fosforilasa. La incubació d'aquestes cèl·lules amb vasopresina o amb fenilefrina condueix a la mateixa mobilització de l'ion calci que quan s'incuben cèl·lules de rates normals amb les mateixes hormones. Tanmateix, ni vasopresina ni fenilefrina, en les rates deficientes en quinasa de la fosforilasa, no produïen l'activació final de la fosforilasa. Aquests resultats són esgrimits per aquests autors a favor d'un paper revelant de la quinasa de la fosforilasa en l'activació de la fosforilasa hepàtica per efecte d'aquestes hormones.

A l'igual que les catecolamines, però, i després de la incubació dels hepatòcits amb vasopresina no s'ha pogut detectar cap increment estable en l'activitat quinasa de la fosforilasa.

1.13.2. ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENÒLISI PER INHIBIDORS METABÒLICS

L'activació de la glicogenòlisi i de l'activitat de la glicogeno-fosforilasa també pot ésser aconseguida per inhibidors metabòlics tan com l'ion cianur, 2,4-dinitrofenol, clorofenilhidrazona, valinomizina i oligomizina (150,151,296).

Aquests agents activen la glicogeno fosforilasa d'una manera dependent de la dosi. Segons Jakob i Diem (240,151) aquesta activació de la fosforilasa seria el resultat de la inhibició de la seva desfosforilació per la fosfatasa de la fosforilasa com a conseqüència del decreixement en els nivells d'ATP intracel·lulars que s'observa després d'incubar les cèl·lules amb aquests inhibidors metabòlics.

Molt recentement, també s'ha suggerit que l'activació de la fosforilasa hepàtica per efecte d'aquests inhibidors metabòlics pot estar relacionada amb la mobilització de l'ion Ca^{2+} que, d'una manera similar a les catecolamines també provoquen.

1.13.3. LA INSULINA: UNA HORMONA QUE SUPRIMEIX LA GLICOGENÒLISI.

Els efectes glicogenolítics del glucagó en el fetge poden ésser limitats per la insulina (298,299). Aquest efecte va induir a pensar durant molt de temps que l'efecte de la insulina era el de reduir l'acumulació d'AMP cíclic. Tanmateix, Larner i cols. (300) van reportar que els nivells d'aquest nucleòtid eren inafectats pel tractament del teixit hepàtic amb la insulina. Aquest mateixos autors treballant amb diafragmes de rata van descriure un efecte de la insulina en inactivar la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic per decreixement en la sensibilitat d'aquest enzim al seu modulador positiu l'AMP cíclic. Aquest decreixement en la sensibilitat a l'AMP cíclic estava postulat sobre la base de l'existència d'un inhibidor generat per la insulina (301,302). Posteriorment aquest inhibidor ha estat purificat a partir d'extractes de múscul esquelètic (303). Aquest inhibidor tenia un pes molecular que oscil·lava entre 1.000 i 1.500 i tenia la propietat d'inactivar la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i d'altra banda activar la fosfoproteïno-fosfatasa de la glicogeno-sintasa

Aquests resultats concorden plenament amb la creència generalitzada que la insulina estimula la síntesi de glicogen incrementant l'activitat de la glicogeno-sintasa a través d'un mecanisme que provoca la interconversió d'aquest enzim cap a les formes més desfosforilades.

Aquest procés ha estat clarament observat en múscul esquelètic (304), cor (305), adipòcits (306) i diafragma (307).

Ben al contrari, en el teixit hepàtic la habilitat de la insulina per a activar la glicogeno-sintasa és altament controvertible i només s'ha reportat en experiments en cèl.lules aïllades en presència de glucosa, la sola presència de la qual activa l'enzim, o en fetge perfós de rates alimentats o diabètiques en condicions que la glucosa hauria d'acumular-se (300). Amb l'hormona sola no s'ha pogut detectar cap increment en l'activitat de la glicogeno-sintasa mesurada per la relació d'activitats $-G6-P/+G6-P$.

Admetent una hipotètica activació de la glicogeno-sintasa hepàtica per la insulina, si més no per comparació amb el seu efecte en altres teixits, i ja que la glicogeno-sintasa és regulada per modificació covalent a través de fosforilació, cabria esperar que la insulina exercís la seva acció bé per estimulació de la desfosforilació catalitzada per proteïno-fosfatases o per decreixement de la fosforilació catalitzada per proteïno-quinases. Respecte a aquesta darrera possibilitat Miller i Lerner (300) demostraren que l'hormona podia rebaixar l'activitat de la quinasa-1 de la glicogeno-sintasa en fetge perfós de rates alimentades mentre que Van der Werve i cols. (154) no observaren cap variació en l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic hepàtica després d'injectar insulina a conills.

De l'anterior exposició es desprèn que el mecanisme pel qual la insulina incrementa la síntesi de glicogen en el fetge, encara que albirat, és pobrement conegut.

Altra possibilitat respecte al mecanisme d'acció de la insulina és que actués a través de les recentment descobertes proteïno-quinases independents d'AMP cíclic. Aquest mecanisme malgrat que ha estat repetidament invocat no poseeix fins al moment dades experimentals que l'abonin.

2. materials i mètodes

2.1. ANIMALS UTILITZATS .

Per a la realització d'aquest treball varen ésser utilitzades rates Wistar adultes de 180-280 g de pes i de 8-14 setmanes d'edat, alimentades amb dieta ordinària de laboratori (Sanders i Panlab).

Els animals eren mantinguts en una cambra amb temperatura controlada i estaven sotmesos al ritme normal de llum-obscuritat.

Ja que el sexe dels animals no afectava aparentment els sistemes estudiats, es van utilitzar tant mascles com femelles en totes les fases experimentals.

Tots els animals foren sacrificats entre les 9 i les 11 hores del matí per tal de reduir al mínim les diferències entre experiments degudes a la incidència de ritmes circadians sobre els processos estudiats.

Aquells animals destinats a experiències que requerien dejuni eren mantinguts en gàbies a part i únicament se'ls subministrava aigua.

L'estat diabètic en les rates era induït amb estreptozotocina (70 mg/Kg de pes corporal) dissolta en 1.0 ml de tampó de citrat sòdic pH 4.5 i administrada endovenosament sota anestèsia per dietil-èter. Les rates havien de jejunar durant 8-10 hores abans de la injecció d'estreptozotocina. Quatre dies després, la concentració de glucosa a l'orina era superior a 20 mg/ml detectada amb tires AMES i aquests nivells de glucosúria es mantenien elevats almenys durant 20 dies. Les rates tractades amb estreptozotocina perdien pes i en cas de ser alimentades llur concentració de glucosa a la sang superava la xifra de 20 mM. Les rates diabètiques eren utilitzades entre els dies 6 i 15 després del tractament amb l'estreptozotocina.

2.2. ISOLAMENT DE CÈL.LULES DE PARÈNQUIMA HEPÀTIC .

Les cèl.lules del parènquima hepàtic, que han estat les utilitzades en aquest estudi, estan disposades al fetge en una sèrie de monocapes perforades que s'anastomosen i es ramifiquen en forma de laberint per entremig del qual circulen els sinusoides o capil.lars fenestrats (308). Cada cèl.lula està unida fermament a les del voltant per formacions de membrana denominades desmosomes. Tot l'òrgan és recorregut per un esquelet de teixit fibroconnectiu compost per fibres de colagen que formen una fina trama a l'interior de cada lòbul. Unions desmosomals i trama de colagen constitueixen, doncs, els principals sosteniments del parènquima hepàtic.

Berry i Friend (309) van introduir la tècnica d'aïllament d'hepatòcits que, amb diverses modificacions, és la utilitzada més correntment en l'actualitat. Consisteix en la perfusió recirculant del fetge sencer amb una solució similar a l'emprada originalment per Howard i cols. (310), és a dir composta per colagenasa i hialuronidasa en absència de calci. Les modificacions més notables de la tècnica de Berry i Friend es deuen a Ingebretsen i Wagle (311,312)

i a Christoffersen i Berg (313) que l'han simplificada a base d'utilitzar només la colagenasa com a enzim disgregant, d'escurçar el temps de perfusió i d'operar amb el fetge separat de l'animal. i

El mètode d'obtenció d'hepatòcits que hem utilitzat consisteix en la perfusió del fetge de rata "in situ" amb una solució de colagenasa, i és el resultat de la combinació de les tècniques de perfusió esmentades més amunt modificades convenientment per Massagué (314).

Les rates eren anestesiades per injecció intraperitoneal d'àcid feniletilbarbitúric (Luminal de Bayer) a una dosi de 200 mg/Kq de pes corporal. Tot el procés de perfusió es duia a terme en una cambra atemperada per aire a 38,5° C. L'abdomen de l'animal era obert i la vena porta era encanulada amb un trocar de 12 dècimes de mm que fixàvem amb una lligadura. Per aquesta via, hom introduïa el medi de perfusió, que en aquesta primera fase es deixava fluïr lliurement amb sortida per la vena cava inferior que havia estat seccionada en la part baixa de la cavitat abdominal. El medi de perfusió era el descrit per Hanks (315) exempt de calci, amb la següent composició: NaCl 137.0 mM; KCl 5,4 mM; Na₂HPO₄ 6,7 mM; KH₂PO₄ 8,8 mM; MgSO₄ 8,1 mM; enriquit amb l'addició de glucosa 5 mM i ajustat amb HCl a pH 7,4. Prèviament el medi era atemperat a 38,5° C i gasejat intensament amb oxigen saturat d'aigua.

Immediatament després d'encanular la vena porta obríem la caixa toràcica i la vena cava inferior era encanulada via aurícula dreta amb un tub de plàstic semirígid de 15 dècimes de mm que hi era fixat i lligat, tot seguit lligàvem la vena cava inferior justament per sobre el nivell de les venes renals, cosa que obligava el perfusat a sortir del fetge per la part alta de la cava inferior. El líquid de perfusió era impulsat per una bomba peristàltica (Gilson

model Minipuls II amb capçal per a fluxes alts) i la velocitat de flux es fixava en 45 ml/min durant aquesta primera fase. Tant el perfusat que s'escolava per la cava com el que traspuava a través de les parets del fetge i que anava eliminant les darreres restes de sang, eren eliminats (uns 250-300 ml en total). Quan el volum de líquid al reservori i al circuit de perfusió es reduïa a uns 75 ml, el perfusat que sortia del fetge igual que el drenatge recollit per la platina que sostenia l'animal es feien retornar al reservori central. A partir d'aquest moment del procés la perfusió esdevenia recirculant. S'afegien al medi colagenasa i albúmina bovina (fracció V) dissoltes en 25 ml de solució de Hanks pH 7,4 de tal manera que quedessin a unes concentracions finals de 0,4 i 15 mg/ml, respectivament. Al cap de 5 minuts de perfusió amb colagenasa la velocitat de flux era incrementada a 55 ml/min i 5 minuts més tard fins a 65 ml/min. El pas de colagenasa pel fetge es feia durar entre 12 i 16 minuts, al termini del quals el fetge era extirpat curosament de l'animal i disgregat de mica en mica amb l'ajut d'unes tisores, dins un vas de plàstic que contenia 50 ml de medi de Hanks exempt de calci, addicionat amb glucosa 5 mM i albúmina bovina 15 mg/ml i ajustat a pH 7,4 amb NaOH. El recipient era gasejat amb O₂ durant un o dos minuts i després tapat. Els trossos de teixit s'anaven acabant de disgregar per agitació manual, molt suau, del recipient durant uns 15 minuts.

La suspensió, que contenia cèl.lules isolades intactes i d'altres d'alterades, partícules de teixit parenquimàtic no disgregat i restes d'altres teixits era filtrada a través d'una tela de niló amb entramat de 150 micres de separació entre les fibres. La suspensió resultant era centrifugada a 75 x g durant 90 seg (Janetzki, model T 32 C) i llençat el sobrenedant. El sediment era resuspès en més medi de Hanks oxigenat i el cicle de centrifugació i resus-

pensió es repetia dues vegades més per tal d'eliminar les cèl.lules parenquimàtiques de Kupffer i els eritròcits que encara contaminaven la suspensió. Aquests processos de disgregació, de centrifugació i de resuspensió es feien a temperatura ambient.

Fèiem la darrera resuspensió amb el medi bicarbonatat preparat segons Krebs-Ringer, que contenia: NaCl 118,5 mM; KCl 4,8 mM; CaCl₂ 2,5 mM; NaHCO₃ 25 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄ 1,2 mM amb una osmolaritat de 300 mOsm (en els experiments destinats a mesurar l'activitat quinasa de la fosforilasa la concentració de CaCl₂ era disminuïda a 50 µM). Aquest medi era gasejat amb O₂/CO₂ 19:1 durant 30 minuts abans de la seva utilització, amb la qual cosa el pH restava fixat a 7,4. La concentració final de cèl.lules a la suspensió era de 5 a 10 x 10⁶ cèl.lules/ml, en relació als experiments a què es destinaven.

Només quan s'aïllaven cèl.lules per a realitzar experiments en presència de l'antibiòtic poliènic filipina, els successius rentats així com la última resuspensió es feien amb un medi compost d'HEPES 220 mM; KOH 110 mM; KCl 4,8 mM; NaCl 4,8 mM; MgSO₄ 1,2 mM ph 7,4; aquest medi era gasejat amb O₂.

A partir de fetges de 8-9 g s'obtenien, en condicions òptimes, de 3,0 a 3,5 g de cèl.lules parenquimàtiques (pes humit). El recompte al microscopi en cambra de Thomas va donar un contingut aproximat de 120 x 10⁶ d'aquestes cèl.lules per 1 g de fetge, pes humit. La viabilitat d'aquestes cèl.lules era superior al 95% en estimació basada en el criteri de l'exclusió del Blau de Tripà (316) segons el qual les cèl.lules viables no es tenyeixen després d'haver estat incubades 30 minuts a 37° C amb una solució al 0,2% del colorant suspès en medi de Hanks. Aquestes cèl.lules també eren sensibles a les hormones tal com ho demostren

els experiments realitzats.

Per obtenir rendiments satisfactoris quant a nombre i viabilitat de les cèl.lules parenquimàtiques de fetge considerem que cal observar les condicions principals següents:

- a) Que els animals siguin mantinguts i manipulats de manera que sofreixin el més poc stress possible.
- b) Que els sigui administrada anestèsia profunda.
- c) Que el medi de perfusió haigi estat oxigenat intensament.
- d) Que el medi de perfusió utilitzat sigui exempt de calci. (l'absència de calci al medi de perfusió provoca la dissociació irreversible dels desmosomes del hepatòcits).
- e) Que el període d'actuació de la colagenasa sigui limitat a 20 minuts com a màxim.

Amb certs lots de colagenasa que presentaven una activitat molt alta, 5 minuts havien estat suficients per a la completa disgregació del fetge; es a dir el temps mínim de perfusió amb la colagenasa depenia de l'activitat que presentés el lot en concret i no vam trobar diferències ni de rendabilitat ni de viabilitat amb l'escurçament d'aquest temps. D'altra banda, períodes de perfusió amb colagenasa de més de 20 minuts, conduïen a una disminució de la viabilitat i de la sensibilitat a les hormones per part de les cèl.lules. La concentració final d'enzim necessària per a l'obtenció de rendiments òptims, en un temps aproximat de 15 minuts de perfusió era de 50 mU/ml.

Al llarg de tot l'estudi vam fer servir dues classes de colagenasa: Tipus I (Worthington) i Tipus IV (Sigma) de *Clostridium histolyticum*. Si bé tots dos tipus van donar un rendiment adequat, vam aconseguir viabilitat superior, en condicions òptimes, amb el tipus IV (Sigma).

2.3. INCUBACIÓ DELS HEPATÒCITS .

Les cèl.lules suspeses en el medi d'incubació es repartien ràpidament en vials de plàstic de 30 ml amb tap de rosca . El maneig i la dosificació de la suspensió cel.lular es feia per mitjà d'una pipeta automàtica amb punta de plàstic i de boca ampla (model Macro-Set dels laboratoris Oxford) per tal de no perjudicar els hepatòcits .

El volum màxim de suspensió cel.lular per vial era de 5 ml a fi d'obtenir les relacions entre superfície de fase líquida i volum de fase líquida i entre volum de fase líquida i volum de fase gasosa més adients .

Els vials eren gasejats en posar-hi la suspensió cel.lular i també cada cop que eren destapats per tal d'addicionar-hi solucions d'assaig . En el cas de temps llargs d'incubació , les cèl.lules eren gasejades com a mínim una vegada cada 15 minuts . Les incubacions eren fetes en un bany d'agitació amb aigua termostatitzada de tal manera que la temperatura de la suspensió fos de 37°C . La intensitat de l'agitació era la necessària per tal de mantenir les cèl.lules en suspensió sense que sedimentessin ; aquesta intensitat era , normalment , de 100 oscil.lacions per minut encara que depèn

de la concentració d'hepatòcits de la suspensió .

L'addició d'hormones , bloquejants i d'altres efectors que actuen a molt baixes concentracions , a la suspensió cel.lular , era feta en volums tan petits com el mètode permetia (10-50 ul) per tal de no alterar significativament l'osmolaritat del medi .

L'addició dels efectors a la suspensió cel.lular es realitzava a partir d'una solució concentrada d'aquests , que , sempre que era possible , es preparava de manera que donés una osmolaritat fisiològica (aproximadament de 300 mOsm) . D'aquesta manera la seva addició no modificava l'osmolaritat del medi . Un cop preparada la concentració se n'afegia a la suspensió cel.lular un volum calculat per tal que , en diluir-se en el medi , quedés a la concentració final desitjada .

Els controls eren addicionats amb volums de solució de NaCl al 0,9% equivalents als volums d'addició dels efectors que assajàvem . Quan experimentàvem amb hormones peptídiques (glucagó , insulina i vasopresina) , en les quals el solvent era HCl 3mM , els controls eren addicionats amb aquest solvent en comptes de solució de NaCl .

Al final de les incubacions el contingut de cada vial se centrifugava (3,000 g , 30 s) i tant el sediment com el sobrenedant eren tractats segons el paràmetre experimental que es volgués determinar .

2.4. FINAL DE LES INCUBACIONS .

A continuació hom descriu els detalls específics de l'homogeneïtzació o precipitació del paquet cel.lular o del sobrenedant , d'acord amb la determinació subseqüent a realitzar .

2.4.1. GLICOGENO-SINTASA I GLICOGENO-FOSFORILASA .

Homogeneïtzàvem el sediment de 3.5 ml d'una suspensió cel.lular ($4-6 \times 10^6$ cèl.lules/ml) amb 180-240 ul d'un medi , a 0-4°C , que contenia : KF 150 mM ; EDTA 15 mM : pH 7,0 en un homogeneïtzador de Potter-Elvehem amb pistil de teflon. Excepcionalment quan incubàvem l'antibiòtic poliènic filipina, homogeneïtzàvem el sediment de 3,5 ml d'una suspensió cel.lular ($8-9 \times 10^6$ /ml) amb 100 ul d'una solució de KF 600 mM ; EDTA 60 mM pH 7,0 . L'ion fluorur del medi d'homogeneïtzació tenia la finalitat d'inhibir les proteïno-fosfatases que actuen sobre els enzims interconvertibles per fosforilació , i l'EDTA la de segrestar el magnesi necessari per a les reaccions de fosforilació d'aquests mateixos enzims . Amb la qual

cosa l'estabilització de llur activitat als homogeneïtzats restava assegurada .

Aquets homogeneïtzats eren centrifugats a $10.000 \times g$ a 0° - 4° C durant 15 minuts (Sorvall model RC2-B amb rotor angular SM-24) . Hom determinava les activitats enzimàtiques en els sobrenadants obtinguts .

2.4.2. CONSTANTS CINÈTIQUES DE LA GLICOGENO-SINTASA .

El paquet cel.lular provinent de 5 ml d'una suspensió cel.lular ($8-10 \times 10^6$ /ml) era homogeneïtzat amb 125 ul d'un medi a $0-4^{\circ}$ C que contenia KF 300 mM i EDTA 30 mM ; pH 7,0 .

Els homogeneïtzats eren centrifugats a $15.000 \times g$ a $0-4^{\circ}$ C durant 20 minuts , i posteriorment sotmesos a filtració per gel en columnes de 1 cm x 15 cm reblides amb Ultrage1 AcA 202 i equilibrades amb KF 75 mM ; EDTA 15 mM ; pH 7,0 . L'eluït proteïc era dividit en dues alíquotes de 500 i 300 ul , respectivament . La primera alíquota s'utilitzava per a determinar l'activitat enzimàtica de la glicogeno-sintasa i la $M_{0.5}$ per la glucosa 6-P de l'enzim . La segona alíquota (300 ul) era incubada , durant 30 minuts a 4° C , amb 2 U de deshidrogenasa de la glucosa 6-P i 0,13 umols de $NADP^{+}$ per tal d'eliminar les traces de glucosa 6-P que haguessin pogut restar després de la filtració per gel . A continuació en aquesta alíquota es determinava la $S_{0.5}$ per l'UDP-glucosa de l'enzim .

2.4.3. ACTIVITAT DE LA PROTEÏNO-QUINASA DEPENDENT D'AMPc

El sediment de 5 ml d'una suspensió cel.lular ($6-8 \times 10^6$

/ml) era homogeneïtzada amb 320 ul d'una solució freda que contenia 150 ul KF i EDTA 10mM; pH 7,0. Els homogeneïtzats eren centrifugats a 10.000 x g durant 15 minuts i els sobrenedants, utilitzats per a la determinació de l'activitat enzimàtica. En experiments on calia l'eliminació de l'AMP cíclic, abans de la determinació de l'activitat quinàsica, els extractes eren sotmesos a filtració per gel tal com ho hem descrit abans.

2.4.4. ESTAT DE DISSOCIACIÓ DE LA PROTEINO-QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC.

El paquet cel.lular de 5 ml d'una suspensió d'hepatòcits ($8-10 \times 10^6$ /ml) era homogeneïtzada amb 150 ul d'un medi a 0-4°C que contenia KF 300 mM; EDTA 30 mM; pH 7,0. Els homogenats eren centrifugats a 15.000 x g durant 20 minuts i posteriorment preparats per a l'electroforesi tal com es descriu a la secció 2.5.5.

2.4.5. QUINASA DE LA FOSFORILASA

Alíquotes de 0,5 ml d'un vial que contenia 3,5 ml d'una suspensió d'hepatòcits ($6-8 \times 10^6$ /ml) eren centrifugats en tubs de vidre (1 x 10 cm) i el paquet cel.lular era ressuspès suaument 100 ul d'una solució a 0-4°C que contenia : NaF 100 mM; KH_2PO_4 2,5 mM; K_2HPO_4 2,5 mM; sacarosa 250 mM; EDTA 0,2 mM; inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic 2 mg/ml; mercaptoetanol 1,5 mM; iodoacetat 4 mM; Tris-HCl 50 mM; pH 7,5. Tot seguit els tubs eren introduïts en un recipient que contenia nitrogen líquid. Les mostres així congelades es mantien a -40°C fins el moment de realitzar la determinació de l'activitat enzimàtica.

2.4.6. FOSFATASA DE LA GLICOGENO-SINTASA

El sediment de 3,5 ml de la suspensió cel.lular era homogeneïtzat amb 240 ul d'una solució a 0-4°C que contenia Tris-HCl 50 mM; pH 7,8; EDTA 10mM; PMSF 0,1 mM; mercaptoetanol 50 mM i glicogen 1%. Aquestes mostres eren fetes servir sense haver estat centrifugades.

2.4.7. GLUCOSA AL MEDI.

Afegíem àcid perclòric al sobrenedant cel.lular de manera que hi quedés a una concentració final de 0,3 N. N'extrèiem per centrifugació la proteïna precipitada i determinàvem la glucosa en el sobrenedant.

2.4.8. GLUCOSA 6-P I ATP

Alíquotes de 3 ml d'una suspensió cel.lular ($7-8 \times 10^6$ /ml) eren centrifugades i afegíem 250 ul d'àcid perclòric 0,6 N al sediment. A continuació cada tub era agitat en un vibrador mecànic durant 1 minut. La proteïna precipitava i els metabolits passaven a la solució àcida; per mitjà d'una centrifugació s'aconseguia la separació i el sobrenedant era recollit en un tub. Després afegíem 250 ul més d'àcid perclòric al sediment de proteïna precipitada, i repetíem el procés d'extracció dels metabolits com abans. Les dues solucions d'extractes àcids eren barrejades i neutralitzades amb la quantitat suficient de CO_3K_2 5 M perquè el pH dels extractes fos aproximadament 7. La quantitat de CO_3K_2 que cal depèn també de la concentració de cel.lules en la suspensió d'hepatòcits emprada. En les condicions expressades, però,

neutralitzava els extractes un volum que oscil.lava entre 23 i 25 ul de CO_3K_2 5 M. Després d'aquest tractament els tubs es deixaven uns 30 minuts en un bany d'aigua i gel. Passat aquest temps els tubs eren centrifugats i el volum dels sobrenedants mesurat. Els extractes neutralitzats resultants eren emprats per a la determinació de metabolits.

2.4.9. GLICOGEN

Alíquotes de 1,5 ml d'una suspensió d'hepatòcits ($6-7 \times 10^6/\text{ml}$) eren mesclades amb 1,5 ml de KOH al 60%. Aquesta barreja s'escalfava a 100°C durant 30 minuts amb agitació ocasional, anroximadament cada 10 minuts. Després de refre-dar aquest digerit a 4°C s'hi afegia etanol fins a obtenir una concentració final del 66%, i el glicogen es deixava precipitar en fred durant un mínim de 4 hores. El glicogen era separat per centrifugació ($3.000 \times g$, 20 minuts) a 4°C . El sediment de glicogen era ressuspe's en etanol fred del 66% i tornat a centrifugat. Aquest nou sediment de glicogen una ve-gada redissolt en aigua estava a punt per a la seva determinació quantitativa.

2.4.10. AMP CÍCLIC

El paquet cel.lular obtingut per centrifugació d'1ml de suspensió d'hepatòcits ($6-7 \times 10^6/\text{ml}$) era mesclat amb 1 ml d'àcid tricloroacètic fred al 10 %. A continuació cada tub era agitat en un vibrador mecànic durant 1 minut. Després de centrifugar ($3.000 \times g$, 10 minuts) afegíem als sobrenedants separats 10 ul de HCl 10 N, que desplaçava l'àcid tricloro-acètic el qual era eliminat per mitjà de quatre extraccions amb 5 ml d'èter saturat d'aigua. La mostra era finalment

liofilitzada i el residu sec era redissolt en 50-200 μ l de solució amortidora de pH a base d'acetats (Na^+) 50 mM ajustada a pH 4,5.

La recuperació d'AMP cíclic després de tots els tractaments esmentats era controlada amb l'addició d'una quantitat petita i determinada de [^3H] -AMP cíclic en el moment de la precipitació amb l'àcid tricloroacètic i amb el recompte final d'una alíquota de la solució del producte liofilitzat.

2.4.11. PROTEINA

Les alíquotes per a la determinació de proteïna provenien dels mateixos extractes cel.lulars preparats per a la determinació de les activitats enzimàtiques.

2.5. TÈCNIQUES DETERMINATIVES ,

2.5.1. ASSAIG PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICOGE NO-SINTASA

Les activitats glicogeno sintasa dels extractes foren mesurades sempre per la incorporació de (^{14}C) -glucosa a glicogen a partir de la uridina difosfo (^{14}C) -glucosa uti litzada com a substrat en la determinació enzimàtica (317)

La solució d'assaig contenia UDP (^{14}C) -glucosa 6,67 mM; glicogen 10 mg/ml; KF 25 mM; EDTA 20 mM; Tris-HCl 50mM; pH 7,8. La radiactivitat específica de la UDP- (^{14}C) -glucosa oscil.lava entre 6.000 i 10.000 c.p.m./nmol dependent si es volia determinar l'activitat de les formes desfosforilades o de les formes més fosforilades de la glicogeno-sintasa, res pectivament. El glicogen utilitzat era passat prèviament a través d'una resina captadora d'ions (Bio Rad labs. tipus AG 501-X 8), precipitat amb etanol al 66% i eixugat a l'aire.

L'assaig es duia a terme seguint l'esquema operatiu següent: Es disposaven 60 ul de la solució d'assaig en un tub i es deixaven atemperar durant uns minuts en un bany a

30°C. Tot seguit s'hi afegien 30 ul de la solució enzimàtica a valorar i la mescla es deixava en incubació a 30°C durant el període de temps que s'estimava necessari perquè es transformés, com a màxim, el 15% del substrat present. Per aturar la reacció es prenién 75 ul de la mescla esmentada i es dipositaven sobre un quadrat de 2 x 2 cm de paper de filtre (Whatman, tipus 31 ET) que tot seguit era submergit en etanol al 66%, fred. El glicogen, que precipitava en etanol al 66% restava atrapat dins de la trama de paper mentre que els altres components de la mescla de reacció eren eliminats amb rentats successius de 10 min, 30 min i 30 minuts amb etanol al 66%. El paper se submergia, finalment, uns moments en acetona que en facilitava la dessecació obtinguda per radiació infraroja. El paper, ben sec, era introduït en un vial que contenia tolué amb PPO al 0,5% i es mesurava la radiactivitat que presentava amb un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap/300).

2.5.1.1. Mètodes per a determinar l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa.

Per tal de determinar l'estat d'activació de l'enzim, tanmateix, es van fer servir dues menes de relacions d'activitats:

- a) la relació utilitzada clàssicament $-G\ 6-P/+G\ 6-P$
- i b) la relació $G\ 6-P$ baixa/ $G\ 6-P$ alta.

En tots dos casos, l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa ve expressat pel quocient resultant de dues activitats enzimàtiques determinades a diferents concentracions de glucosa 6-P.

2.5.1.1.1. Relació d'activitats $-G\ 6-P/+G\ 6-P$

Es basa en la mesura de l'activitat de la glicogeno-sintasa en absència de G 6-P i en presència de G 6-P a una concentració final en l'assaig de 10 mM.

La solució enzimàtica a valorar provenia del sobrenedant de 10.000 x g l'obtenció del qual l'hem descrit abans en l'apartat 2.4.1.

El temps de la incubació de la barreja de reacció a 30°C oscil.lava normalment entre els 10 i els 15 min. Excepcionalment quan es determinava l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa en extractes procedents d'hepatòcits de rates diabètiques o de cèl.lules tractades amb l'antibiòtic filipina, els temps d'incubació per les mescles de reacció en absència i en presència de G 6-P eren de 20 i 15 min, respectivament.

2.5.1.1.2. Relació d'activitats mesurades a baixa concentració de G 6-P i a alta concentració de G 6-P.

Aquest mètode ha estat endegat recentment per Guinovart i cols.(318). Es basa en la mesura de l'activitat de la glicogeno-sintasa a dues concentracions de G 6-P, una de baixa i una altra d'alta. La concentració de substrat (UDPG) és 0,2 mM, molt baixa en comparació a la utilitzada en el mètode de Thomas i cols., cosa que proporciona una major sensibilitat de l'enzim al seu activador, la G 6-P.

Aquest assaig és molt sensible als canvis en les propietats enzimàtiques causades per variacions en l'estat de fosforilació de la glicogeno-sintasa.

La concentració utilitzada de G 6-P en l'assaig a alta concentració de G 6-P és de 10 mM i la que fèiem servir en l'assaig a baixa concentració de G6-P oscil.lava entre 150 i 250 μ M.

La mostra enzimàtica a determinar, que la preparàvem tal com hem descrit en l'apartat 2.4.1. era diluïda de 2 a 5 vegades prèviament a la realització de l'assaig.

2.5.2. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES DE LA GLICOGENO-SINTASA.

Les constants cinètiques estudiades foren la $S_{0,5}$ pel substrat (UDPG) i la $M_{0,5}$ pel modulador (G 6-P). S'estableix la $M_{0,5}$ com la concentració de glucosa 6-fosfat necessària per a assolir la meitat de l'activació màxima en una concentració de la UDP-glucosa de 0,2 mM.

2.5.2.1. Incubacions per a calcular posteriorment la $S_{0,5}$ i la $M_{0,5}$.

Per a calcular la $S_{0,5}$ determinàvem l'activitat de la mostra problema amb barreges de reacció que contenien concentracions creixents d'UDP-glucosa. En aquest cas la mescla de reacció estava composta per: Tris-HCl 50 mM; pH 7,8; EDTA 12,5 mM; glicogen 7,2 mg/ml i UDP- ^{14}C -glucosa a concentracions creixents. Les concentracions finals de la UDP- ^{14}C -glucosa eren: 25 uM; 50 uM; 100 uM; 200 uM; 500 uM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM i 25 mM. La radiactivitat específica de la UDP- ^{14}C -glucosa emprada era molt més elevada en les solucions de més baixa concentració que en les corresponents a major concentració del substrat.

Per a calcular la $M_{0,5}$ es feien determinacions de l'activitat enzimàtica de la mostra problema amb concentracions creixents de glucosa 6-fosfat. En aquest cas, la mescla de reacció estava composta per: Tris-HCl 50 mM; pH 7,8; EDTA 12,5 mM; glicogen 7,2 mg/ml; UDP ^{14}C -glucosa 0,2 mM i glu

cosa 6-P a concentracions creixents. La radiactivitat específica de la UDP [^{14}C]-glucosa era de 7.000 a 10.000 c.p.m./nmol. Les concentracions finals de glucosa 6-P emprades anaven des de 0 a 5 mM (5 μM ; 10 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 250 μM ; 500 μM ; 1 mM i 5 mM).

Els assaigs per a determinar tant la $M_{0,5}$ com la $S_{0,5}$ es feien segons el mateix esquema d'operacions descrit en la secció 2.5.1.

2.5.2.2. Determinació de la velocitat aparent màxima mitjançant l'extrapolació d'Eadie i Hofstee.

Una vegada conegudes les velocitats de reacció de la glicogeno-sintasa a cada una de les concentracions de glucosa 6-fosfat assajades, expressades en $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteïna, aplicàvem la representació d'Eadie i Hofstee:

$$\frac{V_a}{G_{6-P}} \quad \text{versus} \quad V_a$$

per tal de calcular així la V_a màxima.

$$V_a = V - V_0 \quad (V_0 \text{ és la velocitat en absència de glucosa 6-P)}$$

2.5.2.3. Determinació de la $S_{0,5}$ i la $M_{0,5}$ mitjançant la representació d'Hill.

Un cop conegudes la velocitat aparent màxima de la reacció expressada en $\mu\text{mols}/\text{min} \times \text{mg}$ proteïna, aplicàvem la representació gràfica d'Hill per a calcular la $M_{0,5}$.

Per això representàvem:

$$\log \frac{V_a}{V_a \text{ màx.} - V_a} \quad \text{versus} \quad \log G \text{ 6-P}$$

$M_{0,5}$ correspon a la concentració de modulador a la qual
 $V_a = V_a \text{ màx.} / 2$

Per a calcular la $S_{0,5}$ s'havia de representar:

$$\log \frac{V}{V_{\text{màx.}} - V} \quad \text{versus} \quad \log \text{ UDPG}$$

Tanmateix, donat que $V_{\text{màx.}}$ és impossible de calcular quan les velocitats són petites comparades amb $V_{\text{màx.}}$, fins i tot a les més grans concentracions d'UDP-glucosa utilitzades, es fa servir la $V_{\text{estàndard}}$ (V_{st}) com una aproximació arbitrària de la $V_{\text{màx.}}$. Així, per al càlcul de la $S_{0,5}$ representàvem

$$\log \frac{V}{V_{\text{st}} - V} \quad \text{versus} \quad \log \text{ UDPG}$$

La velocitat estàndard és la velocitat de reacció ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteïna) determinada sota condicions estàndard de l'assaig descrit en la secció 2.5.1. En aquestes condicions, ja que la concentració de glucosa 6-P és elevada, s'assoleix una velocitat que pot acceptar-se com a pròxima a la $V_{\text{màx.}}$ real.

L'equació d'Hill aplicada a mesures cinètiques és:

$$\log \frac{V}{V_{\text{st}} - V} = n \log S - \log S_{0,5}$$

$S_{0,5}$ correspon a la concentració de substrat a la qual
 $V = V_{\text{st}} / 2$

El valor de n és anomenat constant d'Hill i és una mesura

de la cooperativitat. Si $\underline{n} = 1$, no hi ha cooperativitat; si $\underline{n} > 1$, hi ha cooperativitat positiva; si $\underline{n} < 1$ la cooperativitat és negativa.

2.5.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICOGENO-FOSFORILASA

L'activitat glicogeno-fosforilasa era mesurada per la incorporació de $\left\{^{14}\text{C}\right\}$ -glucosa al glicogen a partir de $\left\{^{14}\text{C}\right\}$ -glucosa 1-P segons el mètode descrit per Gilboe i cols. (319).

La solució d'assaig contenia D- $\left\{^{14}\text{C}\right\}$ -glucosa 1-P 100 mM amb una radiactivitat específica de 4.000 c.p.m./ μmol ; KF 200 mM i glicogen 10 mg/ml i estava ajustada a pH 6,3. Si l'assaig requeria ésser específic per a la fosforilasa a la mescla de reacció contenia cafeïna a una concentració final de 10 mM.

L'assaig s'aplicava als sobrenedants de 10.000 x g obtinguts tal com es descriu a l'apartat 2.4.1., seguint el mateix esquema operatiu que en el cas de la determinació de l'activitat glicogeno-sintasa.

2.5.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LES DIFERENTS PROTEÏNO-QUINASES.

La mesura de l'activitat de les diferents proteïno-quinases es va determinar en tots els casos pel mètode d'Huang i Robinson (320). Aquest mètode es basa en la determinació de la transferència del grup fosfat terminal de l'ATP marcat amb $\gamma\left\{^{32}\text{P}\right\}$ -ATP a les proteïnes utilitzades com a substrats i la separació de la proteïna fosforilada amb $\left\{^{32}\text{P}\right\}$ del $\gamma\left\{^{32}\text{P}\right\}$ ATP lliure mitjançant la precipi

tació àcida de les proteïnes i posterior cromatografia en capa fina.

La solució d'assaig per a la determinació d'activitat de les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic es componia de: beta-glicerofosfat sòdic 25 mM; pH 7,0; DTT 1 mM; EDTA 0,5 mM; EGTA 0,5 mM; acetat magnèsic 10 mM; gamma - (^{32}P) ATP 0,125 uM amb una radiactivitat específica que oscil·lava entre 200 i 1.000 c.p.m./pmol i la proteïna substrat era la caseïna a una concentració de 4 mg/ml.

Per a la determinació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic s'utilitzava la mateixa barreja de reacció excepte que la proteïna substrat era la histona (4mg/ml). L'estat d'activació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic s'expressava com a la relació d'activitats mesurada: a) en absència d'AMP cíclic afegit i en presència d'AMP cíclic $2 \times 10^{-5}\text{M}$ (-AMPc/+AMPc), i b) en presència d'AMP cíclic 10^{-7}M i en presència d'AMP cíclic $2 \times 10^{-5}\text{M}$ (AMPc baixa/AMPc alta).

Excepcionalment, quan es mesurava l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic en extractes provinents de cèl·lules que havien estat incubades amb insulina, l'assaig es feia en presència de teofilina 1 mM a fi d'inhibir l'activitat fosfodiesteràsica.

Els extractes cel·lulars eren diluïts prèviament a la determinació enzimàtica amb Tris 50 mM; pH 7,5; glicerol 5%; DTT 1 mM i PMSF 1 mM. Aquesta dilució era normalment 1:5, excepte quan es tractava d'extractes sotmesos a filtració per gel els quals eren diluïts 1:2.

Per a la realització de l'assaig se seguí l'esquema operatiu següent: es disposaven 40 ul de la solució d'assaig en un tub i es deixaven temperar durant uns minuts en un bany a 30°C. Tot seguit s'hi afegien 10 ul de la solució enzimàtica a valorar, se sacsejava enèrgicament i la mescla es deixa

va en incubació a 30°C durant el període de temps que s'estimava que calia perquè es transformés com a màxim el 10% del substrat present, (generalment entre 5 i 10 minuts). Per a aturar la reacció s'hi afegien 10 ul d'àcid acètic a cada tub i s'agitava enèrgicament.

El gamma(^{32}P) ATP que no havia reaccionat se separava de la proteïna fosforilada amb (^{32}P) mitjançant una cromatografia ascendent en paper ITLC, tipus SG. Aquests papers estaven tallats en tires de 1,5 x 10 cm i s'hi dipositaven 30 ul de la mescla de reacció, a 1,5 cm de l'extrem inferior. Les tires es col·locaven immediatament en un recipient que contenia una solució de KCl 0,2 M en TCA al 5% com a líquid cromatogràfic. El TCA precipitava la proteïna i el KCl facilitava la separació del gamma(^{32}P) ATP lliure que pujava amb el front de la cromatografia.

Un cop desenvolupada la cromatografia ascendent (uns 5 minuts) les tires es deixaven assecar durant 30 minuts sota l'acció de raigs infraroigs. Seguidament es tallava un tros de 2,5 cm de cada tira (1,5 cm per sobre i 1,0 cm per sota de la ratlla d'aplicació) que era introduït en un vial que contenia 10 ml de tolué amb PPO al 0,5% i es mesurava la radiactivitat que presentava amb un comptador de centelleig líquid model Isocap/300 (Nuclear Chicago).

2.5.5. DETERMINACIÓ DE L'ESTAT DE DISSOCIACIÓ DE LA PROTEÏNO-QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC.

L'estat de dissociació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic era determinat pel mètode desenvolupat per Guinovart i cols. (63) que es basa en la capacitat fixadora de (^3H)-AMP cíclic per bandes de proteïnes cel·lulars específiques separades per electroforesi en gels de poliacrilamida.

La preparació dels gels per a l'electroforesi i el seu desenvolupament estaven basats en la tècnica de Davis (321).

Per a obtenir els gels de poliacrilamina al 7% (p/v) es partia de les tres solucions següents:

a) solució amortidora de pH: Tris-HCl 3M ajustada a pH 8,9 que contenia 0,23 ml/100 ml de N,N,N',N'-tetrametiletildiamida (TEMED)

b) acrilamida 28 g/100ml, bisacrilamida 0,735 g/100ml.

c) solució extemporània de persulfat amònic 112 mg/100 ml.

Es mesclaven 1 part de (a), 2 parts de (b) i 4 parts de (c) que se sotmetien al buit, amb agitació simultània, per treure l'aire. Els tubs que havien de contenir els gels eren de vidre Pyrex de 5mm de diàmetre intern i de 10 cm de longitud. Calia que estiguessin totalment nets i per tal motiu eren prèviament bullits amb mescla cròmica, esbandits i assecats. Els tubs disposats en posició vertical en un suport adient s'omplien ràpidament, fins a un nivell de 2 cm per sota de llur extrem superior, amb la mescla acabada de preparar, abans que aquesta no comencés a polimeritzar. Sobre la superfície del líquid, dins els tubs, s'hi dipositava finalment una capa d'aigua per tal d'evitar la concavitat per efectes de menisc, dels extrems dels gels. La gelificació es completava en el termini d'unes hores. Els gels amb bombolles d'aire a l'interior de llur massa eren descartats.

L'electroforesi es realitzava en un aparell refrigerable i apte per a contenir simultàneament 12 gels (Medical Research Apparatus). Mitjançant la refrigeració per aigua, els gels eren mantinguts a l'interior de l'aparell a una temperatura de 2-4°C.

Abans d'utilitzar els gels per a l'electroforesi de les mostres a analitzar s'els aplicava un procés electroforètic d'eliminació dels residus de TEMED i de persulfat amònic que

restaven inclosos dins de la massa de poliacrilamida. La solució amortidora de pH que es dipositava a les cubetes dels electrodes era Tris-HCl 375 mM ajustada a pH 8,9. S'aplicaven 2 mA per gel durant 30-45 minuts, al termini dels quals el procés es donava per finalitzat i tant l'aparell com la superfície dels gels eren curosament esbandits amb aigua.

La mostra que s'aplicava a cada gel contenia: 100 ul del sobrenedant de 10.000 x g que s'havia d'analitzar i que era obtingut segons que es descriu en l'apartat 2.4.1., 50 ul de glicerol i 5 ul de blau de bromofenol al 0,05 %. Les mostres així preparades eren dipositades curosament sobre l'extrem superior dels gels, formant una capa que no s'havia de barrejar amb la solució que els cobria. En el procés d'electroforesi la solució dipositada a les cubetes dels electrodes contenia Tris 3 mM i estava ajustada a pH 8,9 amb glicina (aminoàcid llúire). S'aplicaven 2 mA per gel i el procés es perllongava fins que al front assenyalat pel colorant li mancava aproximadament 1 cm de recorregut per arribar a l'altre extrem del gel.

Després de finalitzar l'electroforesi cada gel era extret del tub que el contenia, se li marcava el front amb una tinta no difonible (xinesa negra) i s'equilibrava amb solució de fosfats (K^+) 300 mM ajustada a pH 7,1 per immersió en ella durant tres períodes de 15 minuts, a cada nova immersió la solució era renovada. Aquest tractament es feia en un tub d'assaig adient instal·lat en un bany a 0-4°C.

Per a la reacció de fixació de (3H) AMP cíclic, que era aplicada immediatament després del darrer bany en solució de fosfats, cada gel era submergit en una solució de (3H) AMP cíclic 0,04 uM amb una activitat específica de 40 mCi/umol i fosfats (K^+) 30 mM ajustada a pH 7,1 dins un tub instal·lat en un bany a 0-4°C. Aquest tractament es feia durar 90 minuts. Tot seguit els gels eren rentats durant tres períodes consecutius de 30 minuts, 3 hores i 30 minuts amb un volum de 100

a 200 ml per gel de solució de fosfats K^+ 30 mM a pH 7,1. La solució de rentat era prèviament refredada a 0-4°C i el recipient de rentat estava instal·lat en un bany a la mateixa temperatura. Amb aquest rentats s'eliminava tot el (^3H) -AMP cíclic no fixat específicament a les proteïnes contingudes als gels.

A continuació, els gels eren congelats per contacte amb una superfície de CO_2 sòlid i eren tallats en seccions transversals d'un mil·límetre de gruix. Cada una d'aquestes seccions era disposada a l'interior d'un vial de plàstic amb 0,3 ml de H_2O_2 al 30% amb calefacció a 60°C durant 90 minuts. Aquest tractament alliberava, en el medi aquós de l'interior del vial, la radiactivitat corresponent al (^3H) -AMP cíclic fixat per cada secció del gel.

Finalment s'afegien a cada vial 4 ml de la mescla d'escintil·lació que contenia 66% de tolué; 33% de tritó X-100 i 0,5% de PPO. La radiactivitat es mesurava amb un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap/300) i a partir de les dades obtingudes es representava el perfil d'incorporació de (^3H) -AMP cíclic dels gels.

2.5.6. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LA QUINASA DE LA FOSFORILASA b

El mètode que es va posar a punt per a determinar l'activitat de la quinasa de la fosforilasa b va ésser una modificació d'altres descrits en la bibliografia i es basava en el fet de provocar la fosforilació del substrat, la fosforilasa b, i mesurar seguidament l'activitat fosforilasa a que s'havia format. Les nostres condicions diferien fonamentalment de les dels altres autors perquè fèiem servir un medi d'incubació dels hepatòcits amb baixa concentració de Cl_2Ca (50 μM) i

perquè introduïem tant en la solució d'homogeneïtzació de les cèl.lules com en la determinació de l'activitat enzimàtica, un inhibidor de les proteases.

Les mostres que es guardaven a 40°C (vegeu l'apartat 2.4.5.) eren descongelades en un bany d'aigua i gel amb agitació (100 cops per minut). Una alíquota de 30 ul d'aquest homogenat era introduïda en la barreja de reacció, a 0-4°C, composta per: NaF 100 mM; mercaptoetanol 1 mM; fosforilasa b 0,3 mg; inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic 0,5 mg/ml; Iodoacetat 1 mM; EDTA 0,1 mM; Tris-HCl 50 mM; i pH 7,5, en un volum total de 130 ul. La reacció s'iniciava introduint-hi 20 ul d'una solució d'ATP-Mg pH 7.5 ajustat amb NaOH, en concentracions de 7,5 i 15 mM, respectivament. A partir del minut zero quan els extractes encara estaven a 0°C i a intervals de 5 minuts de la incubació a 30°C es treuen alíquotes de 20 ul que eren diluïdes 10 vegades en una solució composta per beta-glicerofosfat pH 6.8; NaF 100 mM; beta-mecaptoetanol 40 mM; a 0-2°C. D'aquesta barreja s'agafaven les mostres per a la determinació de la fosforilasa a que es feia en presència d'una concentració final de cafeïna de 10 mM. L'activitat de la quinasa de la fosforilasa b s'expressava en unitats de fosforilasa a formades/minut x g de proteïna.

A fi de detallar aquest mètode cal fer notar a) la baixa concentració d'EDTA tant en la solució homogeneïtzadora com en la de la determinació de l'activitat enzimàtica venia ja introduïda amb l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic puix que en l'últim pas d'aquesta preparació conté una concentració d'EDTA a d'un mM. b) el fet d'incubar directament un homogenat sencer (sense centrifugació prèvia) implica que tant en la incubació amb l'ATP-Mg com quan es treuen les alíquotes s'ha de posar especial cura que la mescla de reacció sigui ben homogènia i convé no deixar sense agitar més de cinc minuts els tubs que s'incuben. c) la determinació de la pro

teïna es feia posteriorment en el sobrenedant de 3.000 x g dels extractes una vegada acabat l'assaig enzimàtic.

2.5.7. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA DE LA GLICOGENO-SINTASA.

La $\{^{32}\text{P}\}$ -glicogeno-sintasa era preparada per incubació en presència de (gamma- ^{32}P)-ATP de la forma desfosforilada de la glicogeno-sintasa muscular, purificada, amb la quinasa 1 de la glicogeno-sintasa (GSK-1) que és independent d'AMP cíclic.

La fosforilació es va realitzar a 30°C. La mescla de reacció contenia beta-glicerofosfat sòdic 25 mM; pH 7,6; EDTA 0,5 mM; EGTA 0,5 mM; DTT 1 mM; acetat magnèsic 10 mM; gamma- $\{^{32}\text{P}\}$ -ATP 0,125 uM amb una radiactivitat específica de 200 a 1000 c.p.m./pmol; glicogeno-sintasa desfosforilada de 100 a 150 ug/ml i la quinasa 1 de la glicogeno-sintasa (0,3 a 2 unitats/ml). Tot seguit la solució es dialitzava durant 12 hores a 4 °C amb una solució de diàlisi composta per Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; DTT 1 mM i glicerol 5% fent-hi els canvis necessaris per tal d'eliminar el (gamma- ^{32}P)ATP que no s'hagués incorporat a la proteïna.

La reacció de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa era duta a terme a 30°C en una barreja de reacció composta per 90 ul de $\{^{32}\text{P}\}$ glicogeno-sintasa preparada com abans s'ha descrit i 30 ul de l'homogeneïtzat procedent dels hepatòcits (vegeu l'apartat 2.4.6.). La quantitat remanent de $\{^{32}\text{P}\}$ glicogeno-sintasa es determinava en la barreja a 2°C (temps zero) i als 5 i 10 minuts de la incubació a 30°C. La reacció s'aturava amb la sembra de 35 ul de la barreja de reacció sobre una tira de pa

per ITLC, tipus SG, que prèviament havia estat sembrada amb 10 μ l de TCA al 10%. Les tires de paper es col·locaven immediatament en un recipient que contenia una solució de KCl 0,2 mM en TCA al 5% com a líquid cromatogràfic. El TCA precipitava la proteïna i el KCl facilitava la separació del (gamma-³²P) ATP lliure que pujava amb el front. Els següents passos de dessecació i mesura de la radiactivitat són comuns als descrits per la determinació de les activitats proteïno-quinases. L'activitat fosfatasa de la glicogeno-sintasa s'expressa en c.p.m. alliberades/min x g de proteïna.

2.5.8. DETERMINACIÓ DE GLUCOSA, DE GLUCOSA 6-P i D'ATP

La determinació de tots tres metabolits es va realitzar mesurant la quantitat de NADP⁺ format com a producte del consum total de cadascun d'ells en una reacció enzimàtica. El mètode seguit fou el que descriu Schmidt (322).

Per a la determinació d'ATP la mescla de reacció estava composta de: trietanolamina 500 mM; pH 7,5; sulfat magnèsic 4 mM; NADP⁺ 10 mM; glucosa 500 mM; deshidrogenasa de la glucosa 6-fosfat 75 U/l i hexoquinasa 125 U/l.

En aquestes condicions tot l'ATP era consumit i es formava una quantitat equivalent de NADPH un cop s'havia establitzat la reacció. L'increment d'extinció a 340 nm era mesurat en un espectrofotòmetre model "Beckman DB-GT".

Per a la determinació de la glucosa 6-fosfat es procedia exactament igual, amb l'única diferència que no s'addicionava ni glucosa ni hexoquinasa al medi.

La determinació de glucosa es feia aplicant la mateixa reacció però sense afegir-hi glucosa.

Cal fer esment que la quantitat d'extracte cel.lular neutralitzat tal com es descriu a l'apartat 2.4.8.,necessari per a observar canvis significatius en l'extinció a 340 nm després de la transformació enzimàtica d'aquest metabolits és d'aproximadament 400 ul sobre un volum final en la cuveta de 800 ul.

La concentració de glucosa ha estat expressada en nmol/l, la de glucosa 6-P en nmols/gram de fetge,pes humit,i la d'ATP en umols/g de fetge,pes humit.

Paral.lelament a la determinació enzimàtica d'aquests metabolits calia realitzar un recompte cel.lular en una alíquota de la suspensió d'hepatòcits que s'havien fet servir. El recompte es realitzava en una cambra de Thoma després d'haver diluït la suspensió cel.lular 20 vegades amb solució de Hanks.

El número d'hepatòcits que aproximadament corresponien a 1 gram de fetge pes humit era 120×10^6 .I així vam utilitzar aquesta equivalència a efectes de càlcul de les concentracions d'aquests metabolits.

2.5.9.DETERMINACIÓ D'AMP CÍCLIC

El mètode seguit va ésser descrit per Gilman (323) basat en la competència entre l'AMP cíclic de la mostra i (^3H -) AMP cíclic exogen per fixar-se a una proteïna que s'uneix específicament al nucleòtid. Aquesta proteïna, que presumiblement és la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, va ésser purificada prèviament en aquest laboratori seguint les indicacions de Gilman.

La preparació de la mostra ha estat descrita en la secció 2.4.10.

La mescla d'assaig contenia 5 ul de solució amortidora d'acetat Na^+ 0,5 M ajustada a pH 4,0; 5 ul de (^3H) AMP cíclic 0,4 uM amb una activitat específica de 40 mCi/umol i 20 ul de mostra. S'hi afegien 20 ul de la preparació de proteïna caçada enllaçar AMP cíclic, diluïda amb solució d'albumina (0,75 mg/ml) per tal que la quantitat de proteïna que s'introdueix a l'assaig no fixés més del 30% de l'AMP cíclic present. La barreja es deixava incubar a 0°C durant 60 minuts a la fi dels quals era diluïda amb 1,0 ml de solució amortidora de fosfats K^+ 20 mM ajustada a pH 6,0 i freda, i passada a través d'un filtre de cel.lulosa (Millipore, tipus HA6 prèviament reblanit en la mateixa solució de fosfats i col.locat sobre un suport enfredat. Després de passar-hi la mostra, el filtre era rentat dues vegades amb 4 ml de la solució de fosfats i, tot seguit, introduït en un vial i dissolt amb 1,5 ml d'etilenglicol monometilèter.

Finalment s'afegien al vial 4,5 ml de toluè amb 0,5% de PPO i la radiactivitat era mesurada en un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap/300).

La radiactivitat detectada era inversament proporcional a la quantitat d'AMP cíclic present a la mostra. En cada procés de determinació s'operava amb una sèrie de concentracions conegudes d'AMP cíclic valorades espectrofotomètricament.

La concentració d'AMP cíclic es va expressar en nmols/g de fetge.

2.5.10.DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA

S'aplicava el mètode descrit per Layne (324) basat en el de Gornall i cols. (325). Les proteïnes en solució formaven un complex acolorit quan es posaven en contacte durant 30 minuts

amb 4 volums d'una solució que contenia CuSO_4 6 mM; tartrat Na-K 20 mM; NaOH 0,75 M. La lectura d'extinció es feia a 550 nm en un espectrofotòmetre (Spectronic model 88 o Beckman model DB-GT) i es comparaven amb solucions de concentració coneguda d'albumina. Quan la concentració de proteïna era inferior a 2,5 mg/ml s'aplicava el mètode de Lowry i cols. (1326) Es barrejaven 0,1 ml de mostra amb 1,0 ml de solució de tartrat sòdic 1,0 mM; CuSO_4 0,4 mM; Na_2CO_3 0,2 M; NaOH 0,1 M. Al cap de 10 minuts s'afegia tot agitan-ho, 0,1 ml de reactiu de Folin i l'extinció del complex acolorit que es formava es llegia al cap de 30 minuts a 750 nm.

2.5.11.DETERMINACIÓ DEL GLICOGEN

La quantitat de polisacàrid extret de les mostres (2.4.9.) es mesurava pel mètode de Carrol i cols. (327) afegint en fred 2,5 ml de reactiu d'antrona (antrona 0,05%; tiourea 1%; H_2SO_4 72%) a 0,5 ml de la solució de glicogen. La barreja es mantenia 10 minuts a 100°C, es refredava i l'extinció del cromògen que es formava era mesurada a 620nm. El resultat era comparat al d'una sèrie de solucions patró preparades amb quantitats conegudes de glicogen.

2.5.12.DETERMINACIÓ DE LA DEGRADACIÓ DE LA INSULINA

Es va realitzar segons el mètode de Suzuki i Kono (328). Consisteix a incubar les cèl.lules amb ^{125}I -Insulina durant un cert temps al final del qual la ^{125}I -Insulina és precipitada amb l'ajut d'albumina, insulina i TCA al 10%. La radiactivitat no precipitable en aquestes condicions es considera producte de degradació de la insulina en aquell temps.

Per determinar la degradació de la insulina, doncs, incubàvem els hepatòcits amb insulina a una concentració i temps determinats en presència d'una quantitat coneguda de $[^{125}I]$ Insulina. Al final del temps d'incubació afegíem a la suspensió cel·lular TCA al 10% de concentració final, i la insulina no degradada era precipitada amb l'ajut d'albumina bovina 10mg/ml i una concentració d'insulina (0,5 μ M). Després de centrifugació a 3.000 x g es mesurava la radiactivitat en els sobrenedants als 0, 5, 10, 20 minuts de temps. La radiactivitat creixent a mesura que passava el temps era un índex de la degradació que la insulina havia sofert en contacte amb els hepatòcits.

2.5.13. PREPARACIÓ DE L'INHIBIDOR DE LA PROTEINO-QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC

La preparació d'aquesta proteïna inhibidora ha estat realitzada d'acord amb el mètode de Walsh i cols. (44) a partir de múscul de conill fins al pas que inclou la precipitació amb àcid tricloroacètic i subseqüent diàlisi amb fosfat potàssic 5 mM i EDTA 1 mM.

2.6. CÀLCULS ESTADÍSTICS .

En la majoria dels experiments, s'ofereixen les dades experimentals acompanyats de llurs desviacions estàndard, error estàndard així com el grau de significació respecte als controls.

La desviació estàndard es calculava a partir de la fórmula adient per un nombre de dades 100:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

L'error estàndard de la mitjana, es calculà de la següent manera:

$$ES = \frac{Ds}{\sqrt{n}}$$

Per a calcular el grau de significació estadística entre les respostes a dues condicions experimentals diferents calculàvem prèviament la "t" de Student a partir de les diferències entre les mitjanes segons la fórmula:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y} - d}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n_1 \bar{x}^2 + \sum y_i^2 - n_2 \bar{y}^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

Un cop obtingut el valor de "t" i els graus de llibertat, la probabilitat que la diferència entre les mitjanes sigui significativa, s'ha de buscar en les taules corresponents.

El nombre de graus de llibertat ve determinat per

$$n_1 + n_2 - 2$$

Normalment es considera que la diferència entre mitjanes és significativa quan la probabilitat que així sigui és $> 95\%$. Si no s'arriba a aquesta xifra es representa per N.S. (no significatiu).

Per conveni s'utilitzen els següent símbols:

No significatiu	N.S.	d
$0,01 < P < 0,05$	*	c
$0,001 < P < 0,01$	* *	b
$P < 0,001$	* * *	a

Un sol asterisc (* ,c) significa feblement significatiu (la probabilitat que no sigui significatiu és de l'1 al 5%).

Dos asteriscs (* * ,b) és més significatiu (només existeix la possibilitat d'un 0.1 a 1% que no ho sigui).

Tres asteriscs (* * * ,a) és altament significatiu (la probabilitat que no sigui significatiu és inferior al 0.1%).

Quan vam calcular el coeficient de correlació d'una regressió lineal es va fer mitjançant la fórmula:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \cdot \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

Tots els càlculs suara descrits es van realitzar amb l'ajut d'un calculador programat, model Casio FX 502 P.

2.7. REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS ,

Els reactius utilitzats en aquest treball i la firma comercial de procedència són els següents:

2.7.1. REACTIUS GENERALS

"Sigma Chemical Co":

- ATP, sal disòdica (de múscul equí)
- AMP cíclic àcid.
- Albúmina bovina, fracció V.
- 2-Deoxiglucosa.
- Ditiotreitol.
- EDTA disòdic
- D-(-)-3-fosfoglicerat, sal triciclohexilamònica.
- D (-) fructosa
- D (+) galactosa.
- D (+) galactosamina.
- D-Gliceraldehid.
- Glicogen (de fetge de conill)

Glucosa 1-P, sal dipotàsic.
 Glucosa 6-P, sal monosòdic.
 Glucosa 1,6-difosfat, sal tetraciclohexilamònica.
 L-Histidina, clorhidrat.
 D (+) manosa.
 Protamina (grau I, de salmó)
 D-sorbitol.
 L (-) sorbosa
 D-tagatosa
 Teofilina
 N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED).
 Tris-hidroximetil-aminometà.
 UDPG, sal disòdic (de llevat)
 UTP, sal sòdic (de múscul de cavall).
 D (+) xilosa.

"Merck":

Clorur magnèsic	beta-glicerofosfat sòdic
Carbonat sòdic.	L-glicina.
Dimetil sulfòxid	beta-mercaptoetanol.
EDTA disòdic (Titrì plex III ^R).	Piridina.
Fluorur potàsic.	Sulfat cúpric.
Reactiu de fenol Folin	sulfat magnèsic.
Cicalteau.	Tartrat sòdic-potàsic.
Fosfat monopotàsic.	Tiòurea.
Antrona.	Tris-hidroximetilamin <u>o</u> metà.

"Carlo Erba"

Acetat sòdic	fosfat sòdic
Bicarbonat sòdic.	Glicerol.
Clorur càlcic.	Alfa-D-Glucosa
Clorur potàsic	Etilenglicolmonometilèter.
Clorur sòdic.	Blau de Tripà.

"Bio Rad Labs"

Acrilamida
 Blau de Coomossie R-250.
 N.N'dimetil-bis-acrilamida.

"Baker"

Àcid acètic.
 D (+) glucosa.

"Koch-Light"

2,5-dimetil oxazol (PPO).

2.7.2. PREPARACIONS ENZIMÀTIQUES.

"Sigma Chemical Co"

Colagenasa (Tipus IV, de *Clostridium histolyticum*).
 Fosfatasa alcalina (Tipus III, de *E.Coli.*)
 3-fosfoglicerat fosfoquinasa (Tipus X, de llevat,
 sense sulfat).
 Fosfoglucomutasa (de múscul de conill)
 Fosfoglucosaisomerasa.
 Gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (exempta de
 sulfat, de llevat).
 Hexoquinasa (de llevat)
 Pirofosfatasa inorgànica (Tipus III, de llevat).
 UDPG-pirofosforilasa (Tipus X, de llevat).

"Worthington Biochemical Corp"

Colagenasa (Tipus I, de *Clostridium hystolyticum*).

"Uphjon company":

Filipina.

2.7.3. PRODUCTES D'ACCIÓ HORMONAL I FARMACOLÒGICA"

"Sigma Chemical Co":

L (-) epinefrina, bitartrat

L (-) fenilefrina, clorhidrat.

DL(±) propranolol, clorhidrat.

Glucagó.

"Eli Lilly Co":

Insulina

"Smith, Kline i French, Labs":

Fenoxibenzamina, clorhidrat.

2.7.4. PRODUCTES RADIACTIUS.

"New England Nuclear" :

(U-¹⁴C)-glucosa 1-fosfat

(³H) AMP cíclic.

"Radiochemical Center, Amersham":

alfa-D-(U-¹⁴C)-glucosa

(gamma-³²P)-ATP.

2.7.5. REACTIUS PER CROMATOGRAFIA.

"Pharmacia Fine Chemicals":

Sephadex G-50 fine.

"Whatman":

Fosfocel.lulosa (P-11)

Paper cromatogràfic, tipus 31 ET

"Gelman Instrument Co":

Paper cromatogràfic ITLC tipus SG.

2.7.6. BIOSÍNTESI D'UDP-(^{14}C)-GLUCOSA.

La uridino difosfo(^{14}C)-glucosa va ésser obtinguda pel procés biosintètic descrit per Thomas i cols. (317) a partir d'alfa-D-(^{14}C)-glucosa. Aquest procés comprenia el pas de glucosa a glucosa 6-P per acció de l'hexoquinasa, el de glucosa 6-P a glucosa 1-P per la fosfoglucosaisomerasa i el de la glucosa 1-P a UDP-glucosa per l'acció combinada de la UDPG-pirofosforilasa i de la pirofosfatasa inorgànica.

La mescla de reacció contenia Tris-acetat 10 mM ajustat a pH 7,7; UTP 10 mM; acetat magnèsic 15 mM; glucosa 1,6-difosfat 10 μM ; L-histidina 25 mM; hexoquinasa 6 U/ml; fosfoglucomutasa 35 U/ml; UDPG-pirofosforilasa 10 U/ml; pirofosfatasa inorgànica 15 U/ml i el substrat, (^{14}C)-glucosa, tot

en un volum de 0,5-1,0 ml.

Després d'incubar la mescla a 37°C, amb agitació, durant 60-90 minuts el tub que la contenia es col·locava durant 1 minut en un bany a 100°C, i els enzims flocculats eren eliminats per centrifugació (3.000 x g, 15 min). Per cada 1 ml de sobrenedant s'afegien, tot seguit, 30 µl de solució de Tris-base 0,5 M i 2 U de fosfatasa alcalina, i la nova mescla era incubada 30 minuts a 37°C. Per últim s'aplicava a la mostra un procés electroforètic d'alt voltatge sobre paper (Whatman, tipus III Chroma) a pH 4,4 (piridina 50 mM; àcid acètic) amb una intensitat de 200-220 mA (Pherograph-Frankfurt, model 64). Mitjançant aquest procés la UDP-(U-¹⁴C)-glucosa formada era separada de la (U-¹⁴C)-glucosa no transformada. Finalment el producte era extret del paper per cromatografia ascendent amb aigua al 3% en etanol.

3. resultats

3.1. REGULACIÓ DEL METABOLISME DEL GLICOGEN PER SUCRES .

Una part del treball ha estat l'estudi dels efectes de diferents sucres sobre els dos enzims limitants del metabolisme del glicogen: la glicogeno-sintasa i la glicogeno-fosforilasa.

La glucosa activa la glicogeno-sintasa i inactiva la glicogeno-fosforilasa. L'activació de la glicogeno-sintasa va precedida de la inactivació de la glicogeno-fosforilasa, que és un potent inhibidor de la fosfatasa(s) de la glicogeno-sintasa. Aquests fets permeteren emetre a Hers i cols. la teoria segons la qual la glicogeno-sintasa no es pot activar si prèviament la glicogeno-fosforilasa no és inactivada per sota d'un cert nivell. Aquesta teoria també s'anomena "mecanisme seqüencial".

El primer objectiu del treball present va ésser estudiar si altres sucres com ara la manosa, la galactosa, la fructosa i d'altres eren capaços d'activar la glicogeno-sintasa i si ho feien mitjançant el mateix mecanisme seqüencial exercit per la glucosa.

Els efectes dels sucres sobre les activitats enzimàtiques

estudiades es van poder classificar segons tres tipus d'actuació ben definits. Si bé tots ells tenien en comú l'activació de la glicogeno-sintasa, la glicogeno-fosforilasa podia ésser inactivada, restar immodificada o fins i tot resultar activada. A continuació es descriuen les característiques i efectors de cadascun dels tres patrons d'actuació esmentats.

3.1.1. ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA I INACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-FOSFORILASA.

Quan els hepatòcits eren incubats en presència de glucosa, 2-desoxiglucosa o de manosa hom podia observar un decreixement en l'activitat de la glicogeno-fosforilasa i una activació de la glicogeno-sintasa (FIGURA 1,c)

Els efectes estaven en funció de la concentració del'hexosa emprada. Així, la glucosa 10 mM produïa efectes aparents que foren màxims quan la concentració del sucre s'augmentava a 50 mM (FIGURA 1, a).

La inactivació de la glicogeno-fosforilasa era palesa als 30 segons d'incubació dels hepatòcits amb la glucosa i l'efecte màxim s'assolia entre els 2 i els 3 minuts. Amb el temps l'activitat glicogeno-fosforilasa retornava lentament al valor basal (FIGURA 1,b).

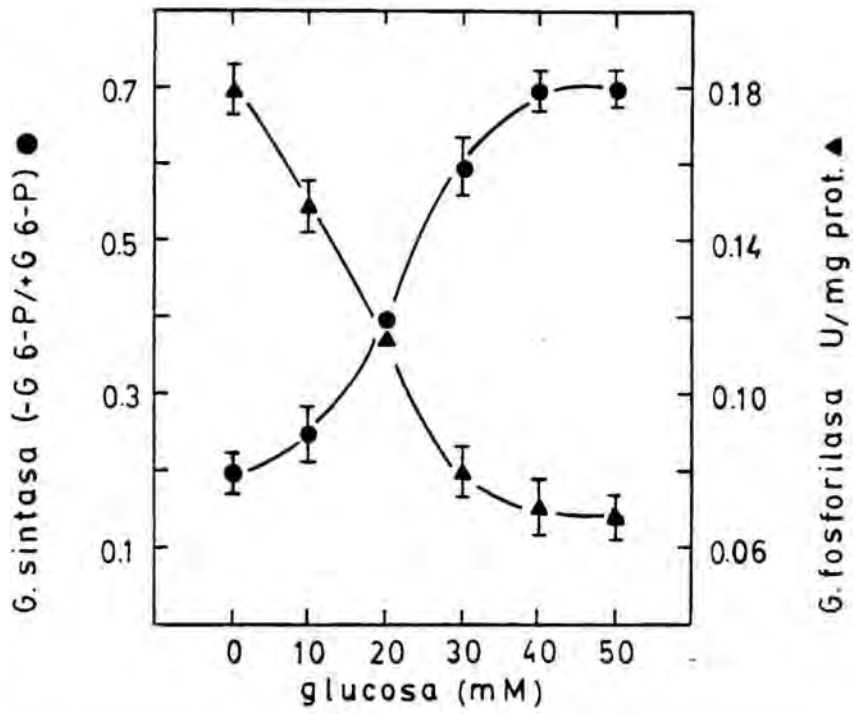
D'altra banda la glicogeno-sintasa començava a ésser activada als dos minuts d'incubació quan la inactivació de la fosforilasa ja era gairebé màxima. La glucosa produïa l'efecte màxim sobre l'activitat glicogeno-sintasa a partir dels sis minuts d'incubació.

Aquests resultats poden ésser interpretats mitjançant l'existència d'un mecanisme seqüencial d'inactivació de la glicogeno-fosforilasa i activació de la glicogeno-sintasa, com

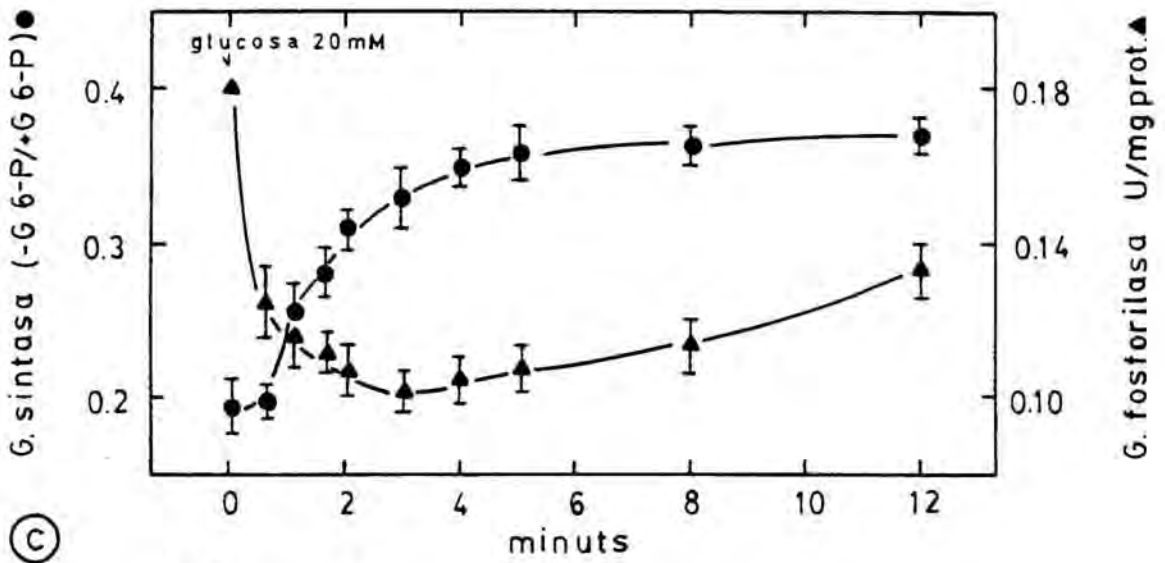
FIGURA 1 EFECTES DELS SUCRES DEL PRIMER GRUP SOBRE LES ACTIVITATS GLICOGENO-SINTASA I GLICOGENO-FOSFORILASA.

- a) Efecte de la glucosa, en funció de la concentració, sobre l'activitat de la glicogeno-sintasa (●) i de la glicogeno-fosforilasa (▲). Els hepatòcits foren incubats amb l'hexosa durant 10 minuts.
- b) Variació en el temps de les activitats sintasa(●) i fosforilasa (▲) després d'incubar els hepatòcits amb una concentració de glucosa de 20 mM.
- c) Inactivació de la glicogeno-fosforilasa i activació de la glicogeno-sintasa, produïdes després d'incubar els hepatòcits amb cadascun dels sucres que formen aquest grup, a una concentració de 50 mM durant 10 minuts.

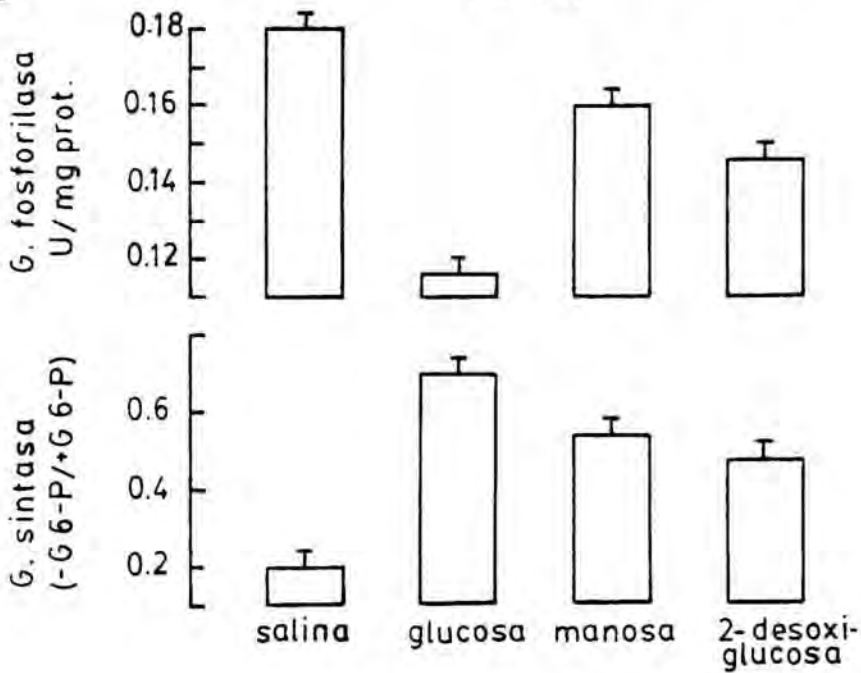
(a)



(b)



(c)



ja fou proposat per Hers i cols.

3.1.2. ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA I IMMODIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICOGENO-FOSFORILASA.

La incubació dels hepatòcits amb sucres com galactosa, galactosamina i xilitol donaren lloc a un patró d'actuació sobre les activitats enzimàtiques diferent a l'exercit per la glucosa.

Si bé l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa era incrementat pels sucres del grup de la galactosa, l'activitat de la glicogeno-fosforilasa no va ésser modificada (FIGURA 2,b).

Aquest tres sucres van ésser incubats a una concentració elevada (50mM) per temps que anaven des dels dos als 15 minuts. Tot seguit les activitats enzimàtiques eren determinades.(FIGURA 2, a)

El patró d'actuació de la glicogeno-sintasa fou el següent: l'enzim era activat clarament ja al minut dos d'incubació, l'activació màxima era aconseguida als quatre minuts i romania pràcticament constant fins al minut vuit. A partir d'aquest moment es produïa un retorn de l'activitat glicogeno-sintasa cap el seu valor basal.

D'altra banda el valor de l'activitat glicogeno-fosforilasa romangué constant i igual al valor dels controls al llarg de tot el període d'incubació amb tots tres sucres.

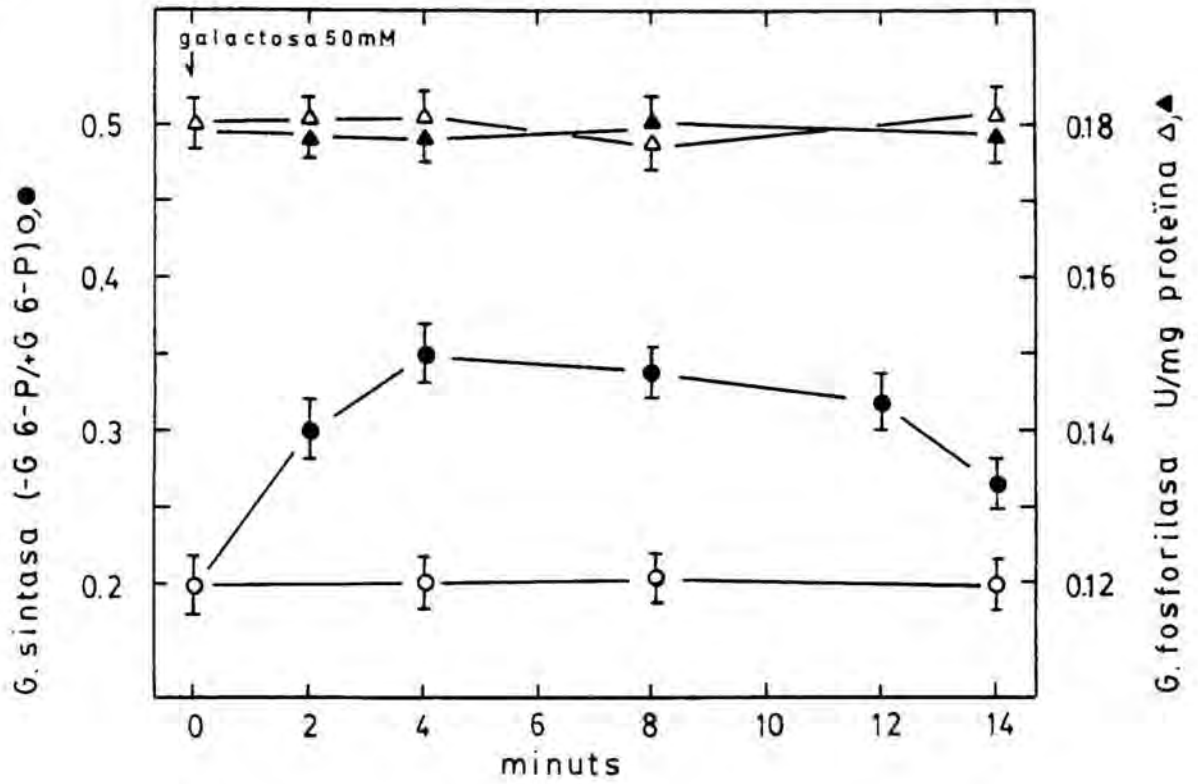
Aquestes dades provaven que la glicogeno-sintasa era susceptible d'ésser activada sense el requisit de la prèvia inactivació de la glicogeno-fosforilasa, és a dir abonaven la idea de l'existència d'un mecanisme no seqüencial d'activació de la glicogeno-sintasa.

FIGURA 2 EFECTES DELS SUCRES QUE CONSTITUEIXEN EL SEGON GRUP SOBRE LES ACTIVITATS GLICOGENO-SINTASA I GLICOGENO-FOSFORILASA.

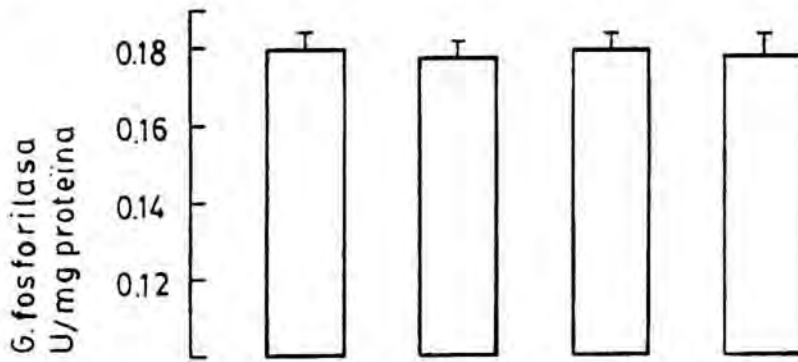
- a) Variació en el temps de les activitats glicogeno-sintasa (●) i glicogeno-fosforilasa (▲) d'hepatòcits aïllats de rates dejunades després d'haverlos incubat amb una concentració de galactosa de 50 mM.

- b) Efecte de la incubació dels hepatòcits amb una concentració de 50 mM de cadascun dels efectors d'aquest grup durant 10 min sobre les activitats glicogeno-sintasa i glicogeno-fosforilasa.

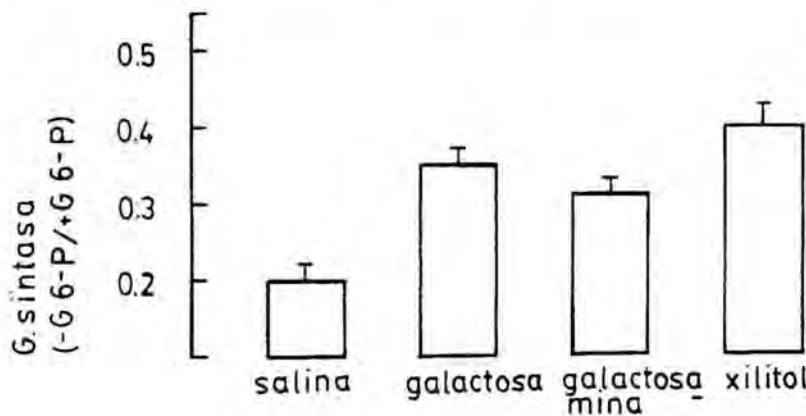
(a)



(b)



(c)



3.1.3. ACTIVACIÓ SIMULTÀNIA DE LA GLICOGENO-SINTASA I DE LA GLICOGENO-FOSFORILASA.

Un tercer grup de sucres representat per la fructosa exercí un nou patró d'actuació ben diferent dels dos esmentats anteriorment. Així, la incubació dels hepatòcits amb fructosa conduïa a l'activació concomitant d'ambdós enzims d'una manera que depenia de la dosi (FIGURA 3, a). Aquesta activació era evident, fins i tot, a concentracions de fructosa tan baixes com 2 mM.

Quan hom incubà els hepatòcits amb fructosa 50 mM, les modificacions de les activitat enzimàtiques al llarg del temps foren les següents: la glicogeno-sintasa era activada molt ràpidament des dels primers segons d'incubació fins al minut quatre (FIGURA 3, b). Aquest increment de l'activitat continuava més lentament fins al minut 12, moment a partir del qual l'activitat començava a disminuir. L'activació màxima produïda per fructosa 50 mM fou de 30 punts percentuals d'increment en el percentatge d'activitat de la forma desfosforilada "forma I" de la glicogeno-sintasa per sobre del seu valor basal.

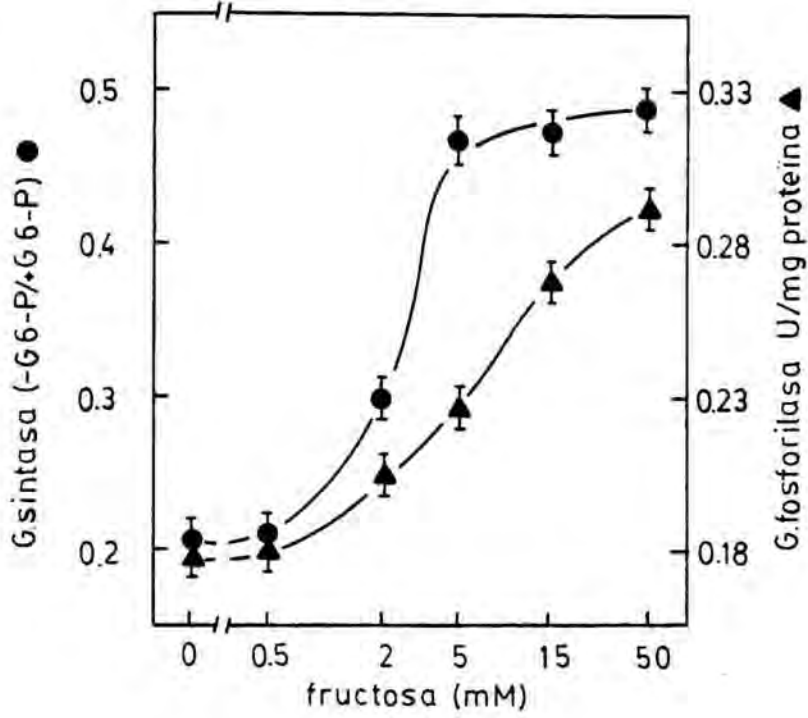
La glicogeno-fosforilasa va ésser activada simultàniament. Ja als 30 segons d'incubació s'observà una activació notable de l'enzim. La màxima activació es produïa entre els minuts dos i quatre. Des d'aquest moment l'activitat començava a disminuir cap el seu valor basal. L'activitat de la glicogeno-fosforilasa després d'incubar la cetosa 50 mM durant quatre minuts era 0,29 U/mg proteïna, és a dir, 0,11 U/mg proteïna per sobre del valor basal.

Cal fer esment que l'activació de la glicogeno-sintasa es produí quan la glicogeno-fosforilasa ja es trobava en un estat d'activació molt alt.

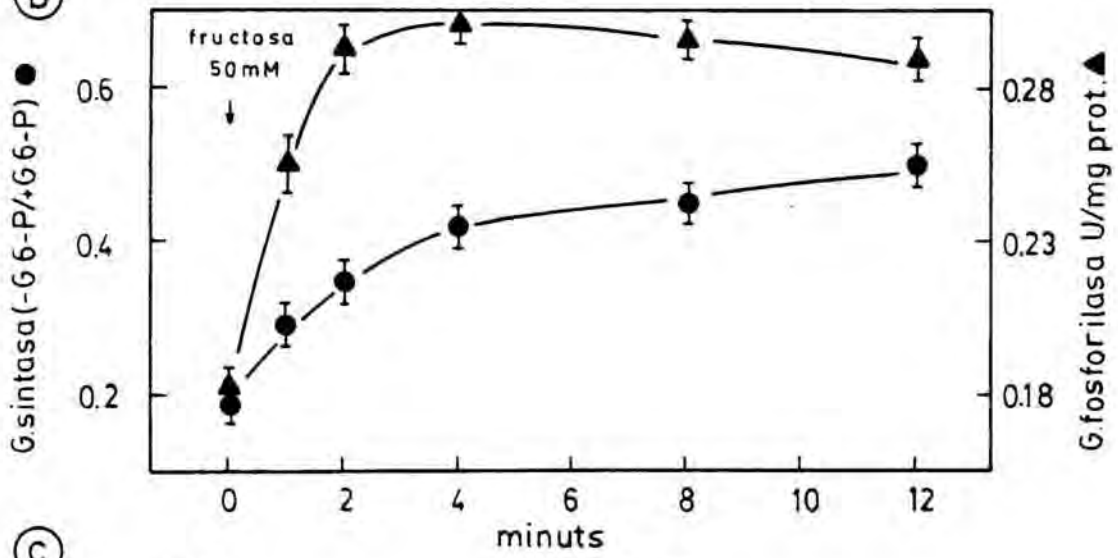
FIGURA 3 EFECTES DELS SUCRES QUE FORMEN EL TERCER GRUP SOBRE LES ACTIVITATS GLICOGENO-SINTASA I GLICOGENO-FOSFORILASA.

- a) Activitats de la glicogeno-sintasa (●) i de la glicogeno-fosforilasa (▲) d'hepatòcits aïllats de rata que havien estat incubats durant 10 min amb les concentracions que s'expressen de fructosa.
- b) Dependència del temps de l'efecte de la incubació de les cèl.lules hepàtiques amb fructosa (50 mM).
- c) Activació simultània de la sintasa i de la fosforilasa provocada per la incubació dels hepatòcits amb una concentració de 50 mM de cadascun dels sucres que formen aquest grup durant un temps de 10 min.

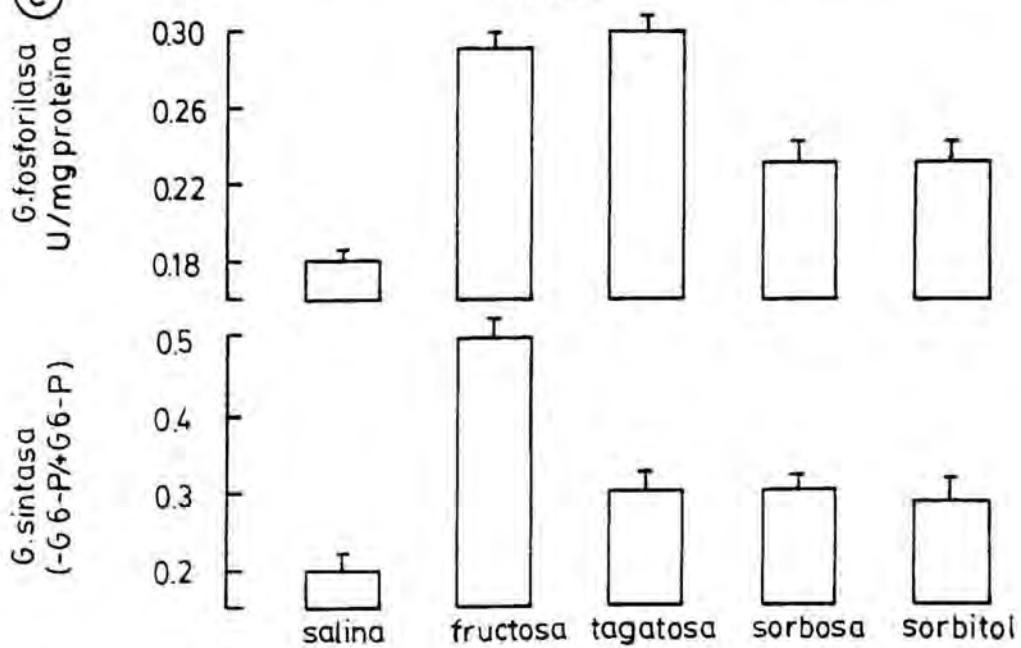
(a)



(b)



(c)



La quantitat de glucosa alliberada per les cèl.lules in cubades amb fructosa va ésser mesurada. Després de 12 minuts d'incubació amb la cetosa, la glucosa al medi era de $0,87 \pm 0,12$ (mitjana \pm S D).

Aquest patró d'actuació no era solament exercit per la fructosa puix que sorbosa, sorbitol i tagatosa , que són sucres relacionats metabòlicament amb la fructosa, també activaven simultàniament ambdós enzims (FIGURA 3,c).

Tot i complint-se el mecanisme seqüencial pel que fa a la glucosa, tanmateix, aquests resultats abonen definitivament la idea de l'existència d'un altre mecanisme no seqüencial d'activació de la glicogeno-sintasa en hepatòcits de rata aïllats.

3.1.3.1. Efecte de la fructosa després de filtració per gel dels extractes cel.lulars.

A fi de provar que l'activació de la glicogeno-sintasa i de la glicogeno-fosforilasa per la fructosa no era deguda a la presència d'un activador de baix pes molecular en els extractes crus, per exemple glucosa 6-P pel que fa a la glicogeno-sintasa, 0,5 ml dels extractes eren filtrats traspassat-los per columnes (1 x 12 cm de Sefadex G-50 fí-Pharmacia-) i tot seguit assajats per ambdues activitats enzimàtiques. Aquest procediment és capaç d'extreure més del 99% de (^{14}C) -glucosa o (^{14}C) -glucosa 6 -fosfat afegida als extractes

Com hom pot observar a la TAULA I, els extractes filtrats van mostrar una relació d'activitats de la glicogeno-sintasa lleugerament més baixa comparada amb la de les alíquotes sense filtrar, encara que diluïdes per tal d'igualar llur concentració proteica respecte als homòlegs filtrats. Aquest fet és molt probablement degut a l'eliminació de traces de glucosa 6-fosfat

TAULA I EFECTE DE LA DILUCIÓ O DE LA FILTRACIÓ A TRAVÉS DE SEFADEX G-50 SOBRE LES ACTIVITATS GLICOGENO-SINTASA I GLICOGENO-FOSFORILASA D'EXTRACTES CRUS D'HEPATÒCITS

Els hepatòcits van ésser incubats durant 3 minuts amb solució salina o amb fructosa 50 mM. La dilució dels extractes (1:1,3) es feia amb la mateixa solució amortidora emprada per a equilibrar les columnes.

Els resultats expressats són la mitjana de 3 determinacions corresponents a un experiment representatiu.

Addició	Tractament	Activitats enzimàtiques		
		Glicogeno-sintasa (-G6P/+G6P)	% Δ sobre control	Fosforilasa U/mg proteïna
a les cèl.lules	crus			
	Solució salina (control)	cap	0.22	0.17
	dilució 1:1.3		0.17	0.16
	sefadex G-50		0.15	0.19
Fructosa 50 mM	cap			
	dilució 1:1.3	0.34	+ 55	0.30
	sefadex G-50	0.27	+ 59	0.28
		0.24	+ 60	0.34
				+ 76
				+ 75
				+ 79

presentes en els extractes. Tot i així, la diferència en la relació d'activitats de la glicogeno-sintasa entre cèl.lules control i les tractades amb fructosa no va ésser afectada pel procediment.

L'activitat de la glicogeno-fosforilasa va ésser incrementada lleugerament com a conseqüència de la filtració, però aquest procés no alterà les diferències observades en els extractes no filtrats.

3.1.3.2. Efectes de compostos relacionats metabòlicament amb la fructosa

Donat que el patró d'actuació de la fructosa era el més interessant, des del punt de vista d'activació no seqüencial de la glicogeno-sintasa i per l'activació concomitant produïda sobre tots dos enzims, es va creure oportú continuar l'estudi del comportament d'aquest grup, concretament pel que fa a la fructosa.

D'altra banda era interessant de conèixer com enzims d'una mateixa via, un en el sentit de síntesi i l'altre en el de degradació podien coexistir en forma activada cosa que hauria de conduir a un estat de cicle fútil.

Per començar foren estudiats certs metabolits de la fructosa al fetge amb l'ànim de concretar si aquests continuaven produint els mateixos efectes que el sucre.

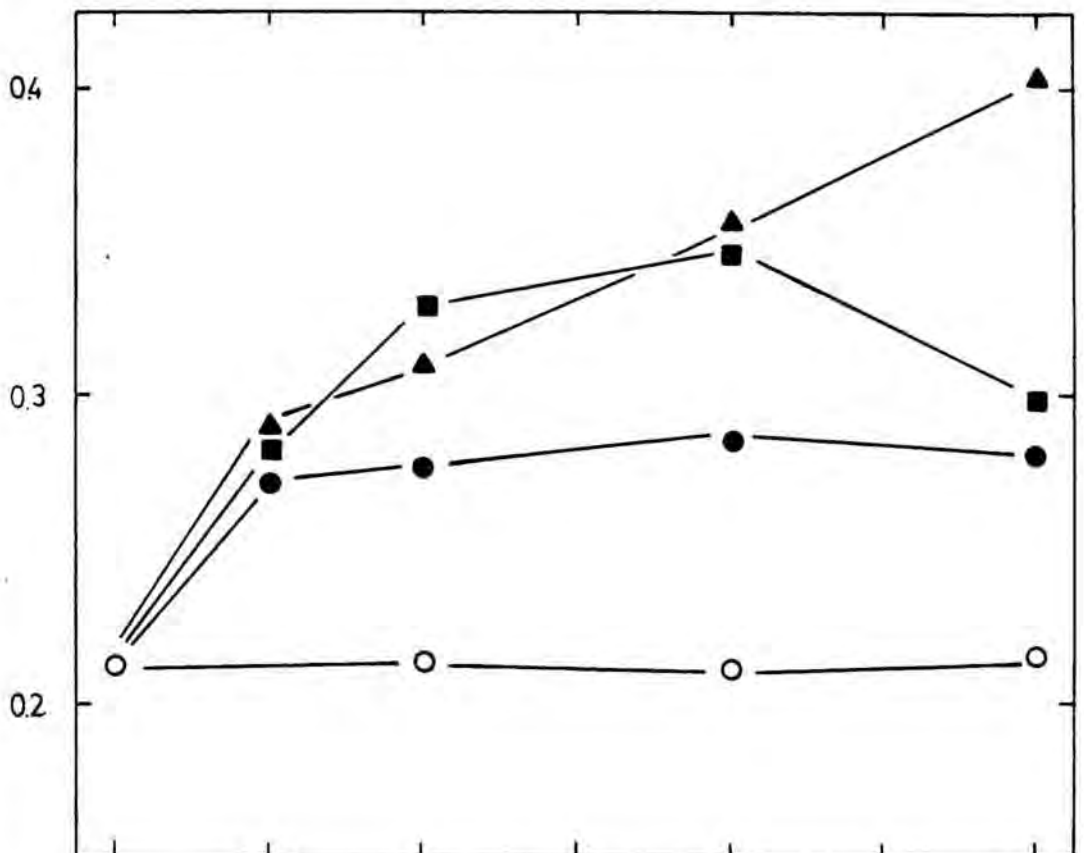
Com es va esmentar a l'apartat 1.8.1. , el gliceraldehid, la dihidroxiacetona-fosfat i alternativament el glicerol són productes directes del metabolisme de la fructosa al fetge.

D'aquesta manera, vam incubar els hepatòcits amb aquest productes exceptuant la dihidroxiacetona-fosfat, donada la im

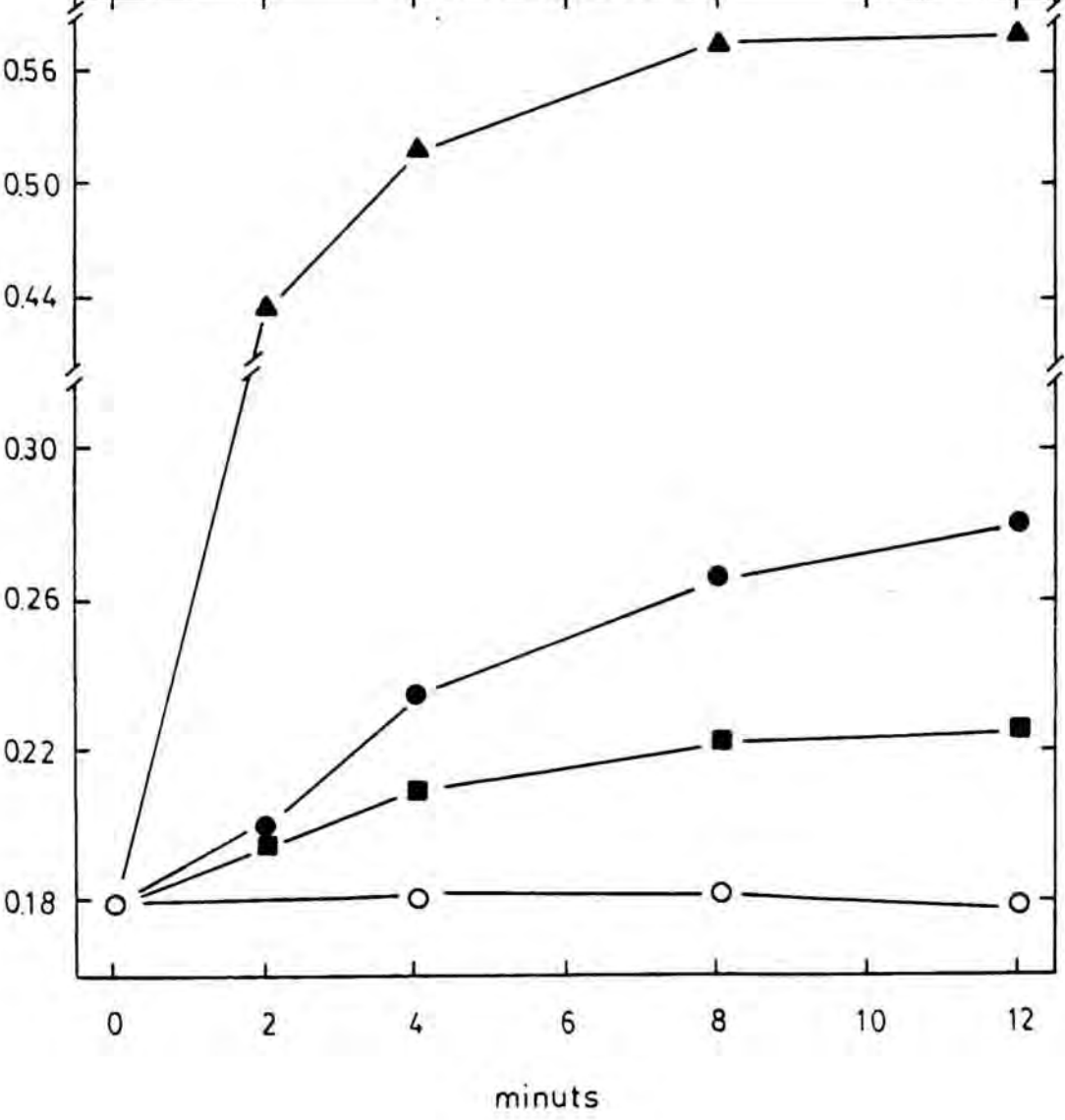
FIGURA 4 EFECTE DEL GLICEROL, DE LA DIHIDROXIACETONA I DEL GLICERALDEHID SOBRE LES ACTIVITATS SINTASA I FOSFORILASA.

Els hepatòcits foren incubats, durant temps diferents que anaven des de 2 a 12 minuts, amb glicerol 50 mM (●), amb dihidroxiacetona 40 mM (■) o amb gliceraldehid 40 mM (▲).

G.sintasa (-G 6-P/+G 6-P)



G.fosforilasa U/mg proteïna



minuts

possibilitat d'entrada de compostos fosforilats dins la cèl·lula, en condicions normals. En lloc de l'èster fosfòric es va incubar la dihidroxiacetona.

Cal assenyalar, que tots tres sucres van modificar les activitats de la glicogeno-sintasa i de la glicogeno-fosforilasa en el mateix sentit que ho féu la fructosa, si bé amb diferències d'ordre quantitativu (FIGURA 4).

Quan hom incubà cèl·lules hepàtiques aïllades amb qualsevol d'aquest metabolits es reproduïa el patró de l'activació concomitant dels dos enzims en funció tant de la concentració com del temps de la incubació.

El gliceraldehid exercí un efecte d'activació sobre la glicogeno-sintasa molt superior al produït pel gliceraldehid o per la dihidroxiacetona i gairebé igual al provocat per una concentració similar de fructosa.

Tanmateix, l'efecte del gliceraldehid sobre la glicogeno-fosforilasa fou molt superior al provocat per la fructosa, el glicerol o la dihidroxiacetona. D'aquesta manera el gliceraldehid es manifestava com un potent activador d'ambdós enzims i molt especialment de la glicogeno-fosforilasa.

3.1.4. ESTUDI DEL MECANISME D'ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-FOSFORILASA PER LA FRUCTOSA.

El fet que el gliceraldehid produís una activació poderosa de la glicogeno-fosforilasa, molt superior a la provocada per la fructosa, i fins i tot a dosis elevades de glucagó; va fer pensar en la possibilitat que l'esmentat aldehid o algun grup reactiu d'aquesta petita molècula fos el responsable de l'increment en l'activitat de la glicogeno-fosforilasa.

Un grup funcional interessant objecte d'estudi, per la seva reactivitat, era indubtablement el grup formil, de tal manera que es comença una investigació sobre l'efecte que diferents aldehids pogueren tenir sobre l'activitat de la glicogeno-fosforilasa.

3.1.4.1. Efectes dels aldehids sobre l'activitat de la glicogeno-fosforilasa.

Els hepatòcits es van incubar amb la molècula més petita que contenia un grup formil, o sia amb el formaldehid, per veure si era capaç de modificar per ell sol l'activitat de la glicogeno-fosforilasa.

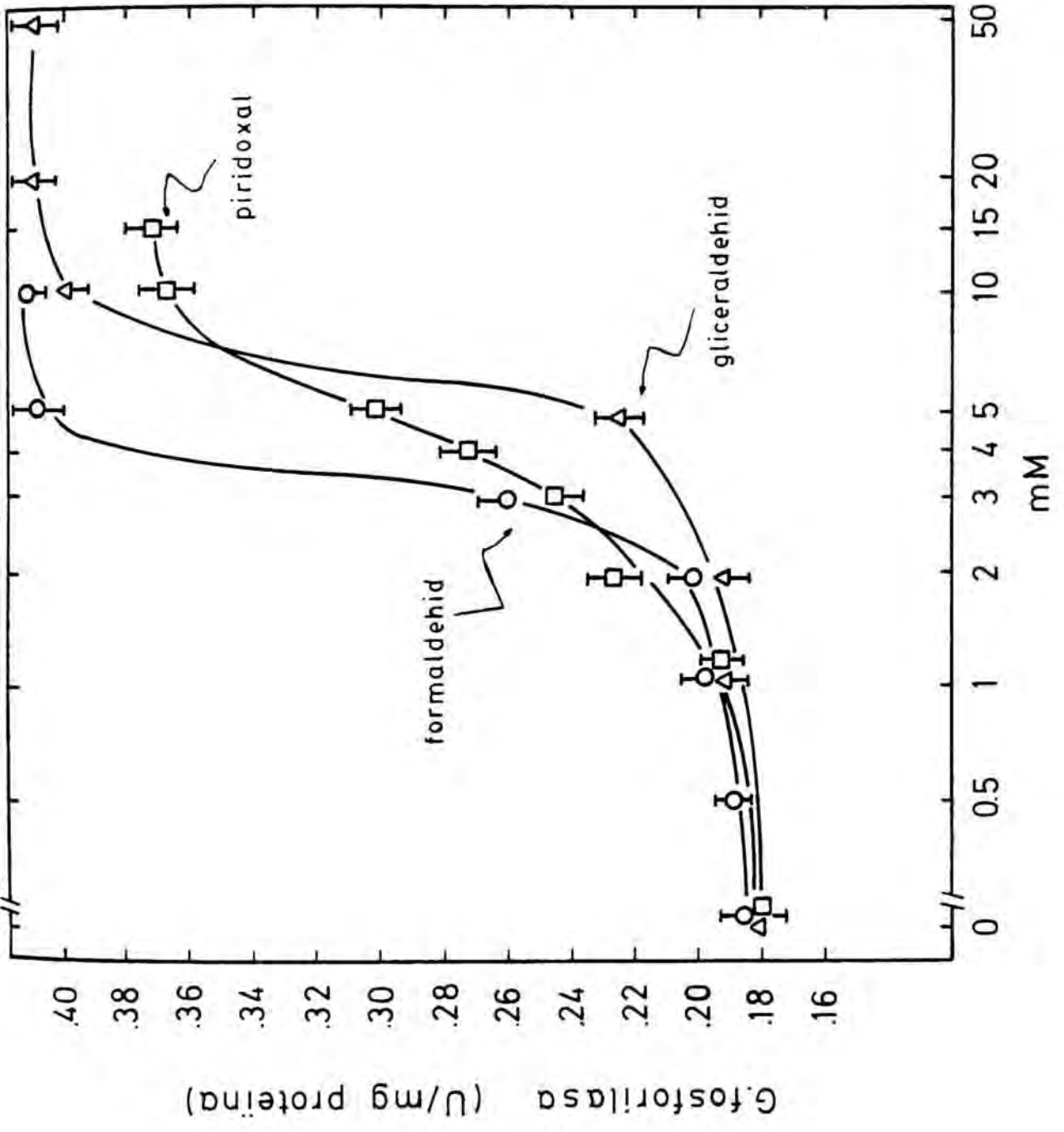
A la FIGURA 5 es representa simultàniament la relació dosi-resposta de l'enzim davant dels efectors formaldehids i gliceraldehid. Com pot observar-se la glicogeno-fosforilasa resultà activada màximament amb una concentració de 10 mM de cadascun dels aldehids. Tanmateix, la concentració d'efector que provocava la meitat de l'increment màxim en l'activitat glicogeno-fosforilasa era diferent per ambdós aldehids. El formaldehid ho feia a 3,5 mM, gairebé la meitat de la concentració necessitada pel gliceraldehid (7mM) per a assolir el mateix increment d'activitat.

Aquests resultats suggerien fortament un paper del grup formil en el mecanisme d'activació de la glicogeno-fosforilasa i mantenien la possibilitat perquè aquest grup formés part del mecanisme d'activació de l'enzim pel gliceraldehid i fins i tot per la fructosa ja que aquesta origina uns nivells alts intracel·lulars de gliceraldehid.

També a la FIGURA 5 es representa de forma paral·lela, l'efecte que sobre la glicogeno-fosforilasa provocà el piridoxal. El piridoxal també provocava l'activitat màxima de l'enzim

FIGURA 5 ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-FOSFORILASA HEPÀTICA PER ALDEHIDS.

Efecte del gliceraldehid (Δ), del formaldehid (\circ) i del piridoxal (\square), en funció de la concentració, sobre l'activitat de la glicogeno-fosforilasa d'hepatòcits. Les cèl·lules foren incubades amb els aldehids durant un temps de 10 minuts.



en una concentració de 10 mM i l'efecte meitat del màxim es produïa aproximadament en 4,5 mM.

Tots els aldehids assajats provocaren l'activació de la fosforilasa hepàtica, en funció de la concentració i del temps d'incubació (TAULA II). A més, cal destacar que quan la incubació es feia amb compostos relacionats que diferien solament en els seus grups funcionals, només aquells que contenien un o més grups formils activaven la glicogeno-fosforilasa.

D'aquesta manera, quan incubàrem els hepatòcits amb compostos de dos àtoms de carboni, com ara àcid glioxílic, glioxal, gliccoaldehid, acetaldehid, àcid oxàlic, etilen-glicol, àcid glicòlic i àcid acètic, la glicogeno-fosforilasa resultava activada només pels quatre primers, que eren els que contenien un o més grups formils a llur molècula. La resta de compostos dicarbonílics no exercien l'efecte.

Així mateix i per la família química composta per piridoxal, piridoxina, àcid piridoxòic i piridoxamina, només el piridoxal provocà l'efecte.

L'activació de la fosforilasa per fructosa i aldehids va ésser observada després de traspasar el sobrenedant de 10.000 x g dels extractes cel.lulars per columnes de Sefadex G 50 fi, per tal d'eliminar qualsevol possible activador de baix pes molecular.

Aquesta activació de la fosforilasa no sembla estar associada a la interacció dels aldehids amb la membrana cel.lular, almenys en la part externa, puix que la incubació de les cèl.lules amb piridoxal-fosfat, el qual no pot atravesar la membrana cel.lular no provocava l'activació de l'enzim.

L'activitat de la glicogeno-fosforilasa es mesurava fent servir dues barreges de reacció que diferien en la presència o absència d'una concentració de cafeïna de 10 mM. La cafeïna

TAULA II ACTIVITAT DE LA GLICOGENO-FOSFORILASA I NIVELLS D'ATP RESULTANTS DESPRÉS DE LA INCUBACIÓ DELS HEPATÒCITS AMB FRUCTOSA O DIVERSOS ALDEHIDS.

Tots els compostos foren incubats amb els hepatòcits, durant 12 minuts, a una concentració de 10 mM. L'assaig de l'activitat glicogeno fosforilasa era dut a terme tant en absència com en presència de cafeïna (0,5 mM). En aquest últim cas, l'activitat determinada corresponia específicament a la de la fosforilasa a.

Compost	Fosforilasa U/mg proteïna		ATP $\mu\text{mol/g}$ fetge
	-cafeïna	+cafeïna (0.5 mM)	
Soluci6 salina	0.18 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	2.3 \pm 0.2
Glioxal	0.29 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	2.4 \pm 0.1
Glioxilat	0.29 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	2.5 \pm 0.1
Glicoaldehyd	0.22 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	2.5 \pm 0.2
Acetaldehyd	0.21 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	2.2 \pm 0.1
Oxalat	0.18 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	
Glicolat	0.18 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	
Acetat	0.18 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	
Etilenglicol	0.18 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	
D-fructosa	0.31 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02	0.3 \pm 0.2
D-gliceraldehyd	0.40 \pm 0.03	0.39 \pm 0.03	0.5 \pm 0.2
L-lactaldehyd	0.26 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	2.3 \pm 0.2
D-1,2-propanodiol	0.19 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	
Pirivaldehyd	0.41 \pm 0.03	0.37 \pm 0.02	2.2 \pm 0.2
Piruvat	0.19 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	
Piridoxal	0.36 \pm 0.03	0.28 \pm 0.02	2.5 \pm 0.2
Piridoxina	0.19 \pm 0.01		
Piridoxat	0.17 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	
Piridoxamina	0.18 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	

inhibia selectivament la fosforilasa b, també present en els extractes, i d'aquesta manera l'assaig era específic per la fosforilasa a.

Fent servir l'assaig en presència de cafeïna l'activació observada de la glicogeno-fosforilasa és encara més dramàtica des d'un punt de vista d'increment percentual sobre el valor basal. Si bé el valor basal és molt inferior (4 vegades) en comparació amb l'obtingut en absència de cafeïna, el nivell d'activació aconseguït després de la incubació, per exemple amb el gliceraldehid, era pràcticament igual en tots dos casos. Això significa que gairebé tota la fosforilasa, després de la incubació, es trobava com a forma a, és a dir activa.

Altres aldehids que no s'expressen a la TAULAI, com ara aldehid anísic, hidrat de cloral i vainillina, van exercir també l'efecte.

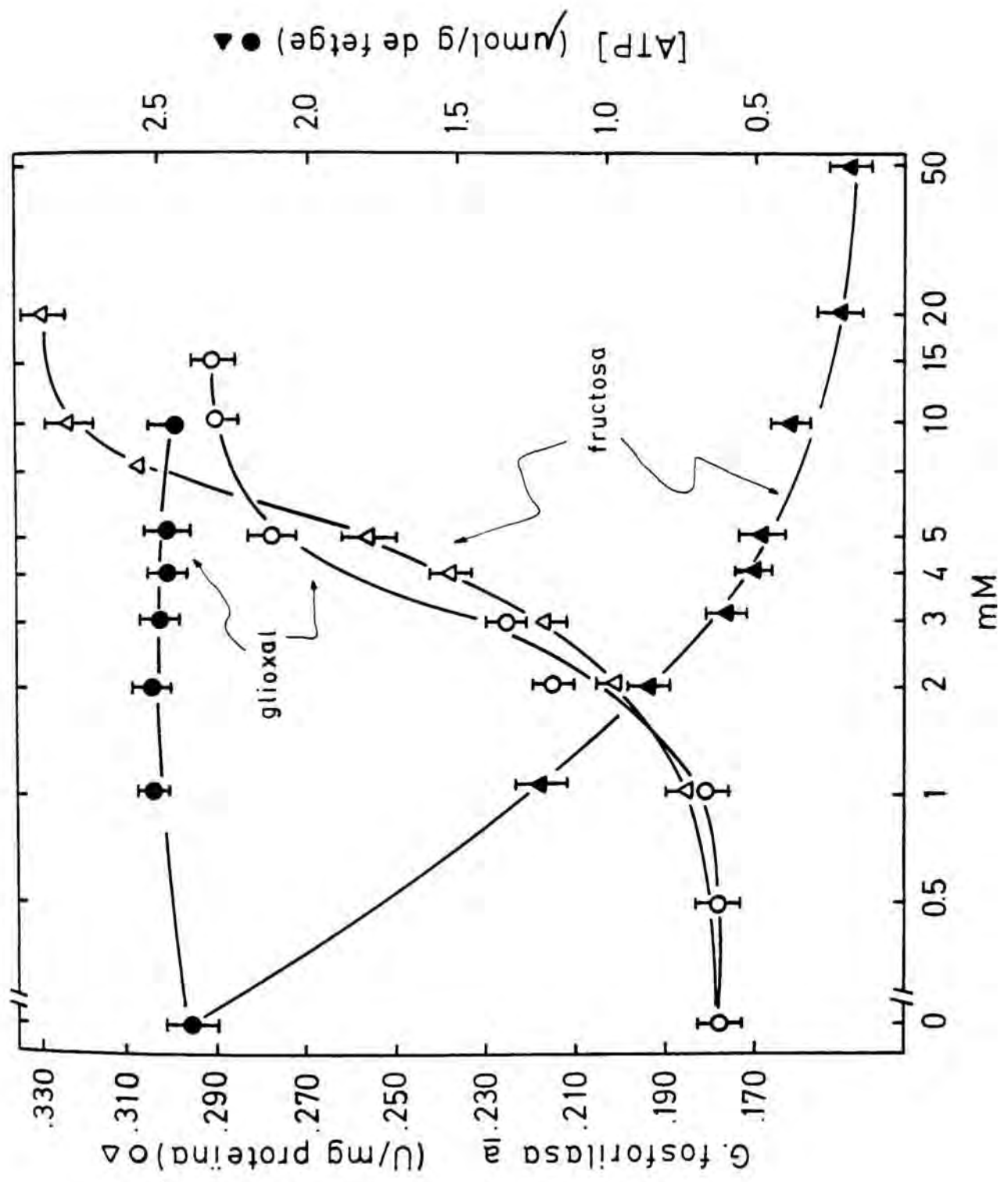
3.1.4.2. Efecte dels aldehids sobre els nivells d'ATP.

A més de constatar que era el grup formil de les molècules assajades el que produïa l'activació de la fosforilasa, era interessant determinar els nivells d'ATP intracel·lular després de la incubació dels efectors per les implicacions d'ordre mecanístic que sobre l'activació de l'enzim se'n pogueren esdevenir i arribar a establir.

Si bé quan hom incubà els hepatòcits amb fructosa o gliceraldehid es produïa un decreixement en els nivells d'ATP al mateix temps que s'activava la glicogeno-fosforilasa; la incubació amb glioxal, formaldehid, glicolaldehid i àcid glioxílic provocaven l'activació de la glicogeno-fosforilasa mentre que els nivells d'ATP romanien constants (TAULA II)

FIGURA 6 EFECTE DE LA FRUCTOSA O DEL GLIOXAL, EN FUNCIO DE LA CONCENTRACIO, SOBRE L'ACTIVITAT GLICOGENO-FOSFORILASA I ELS NIVELLS INTRACEL.LULARS D'ATP.

Les cèl.lules hepàtiques foren incubades amb les concentracions de fructosa o glioxal que s'indiquen a la gràfica durant un temps de 12 minuts.



Un estudi més detallat de les variacions en l'activitat fosforilasa i en els nivells d'ATP provocades per efecte de concentracions creixents de fructosa i de glioxal incubats amb les cèl.lules durant 12 minuts s'ofereix la FIGURA 6. El glioxal, a tots els temps a què es va incubar, no modificà la concentració intracel.lular d'ATP mentre que d'altra banda activà notablement la fosforilasa.

Ha estat postulat que l'activació de la fosforilasa per fructosa és deguda al decreixement en els nivells d'ATP intracel.lular que la cetosa provoca. I si bé els resultats que presentem concorden, almenys en part, amb aquesta hipòtesi; el fet que aldehids com ara el glioxal activin l'enzim sense reduir la concentració intracel.lular d'ATP obre una altra possibilitat segons la qual la fructosa també podria activar la glicogeno-fosforilasa a través de la funció formil del seu metabolit en el fetge, el gliceraldehid.

3.1.4.3. Limitació per glucosa i insulina de l'activació de la fosforilasa provocada per la fructosa.

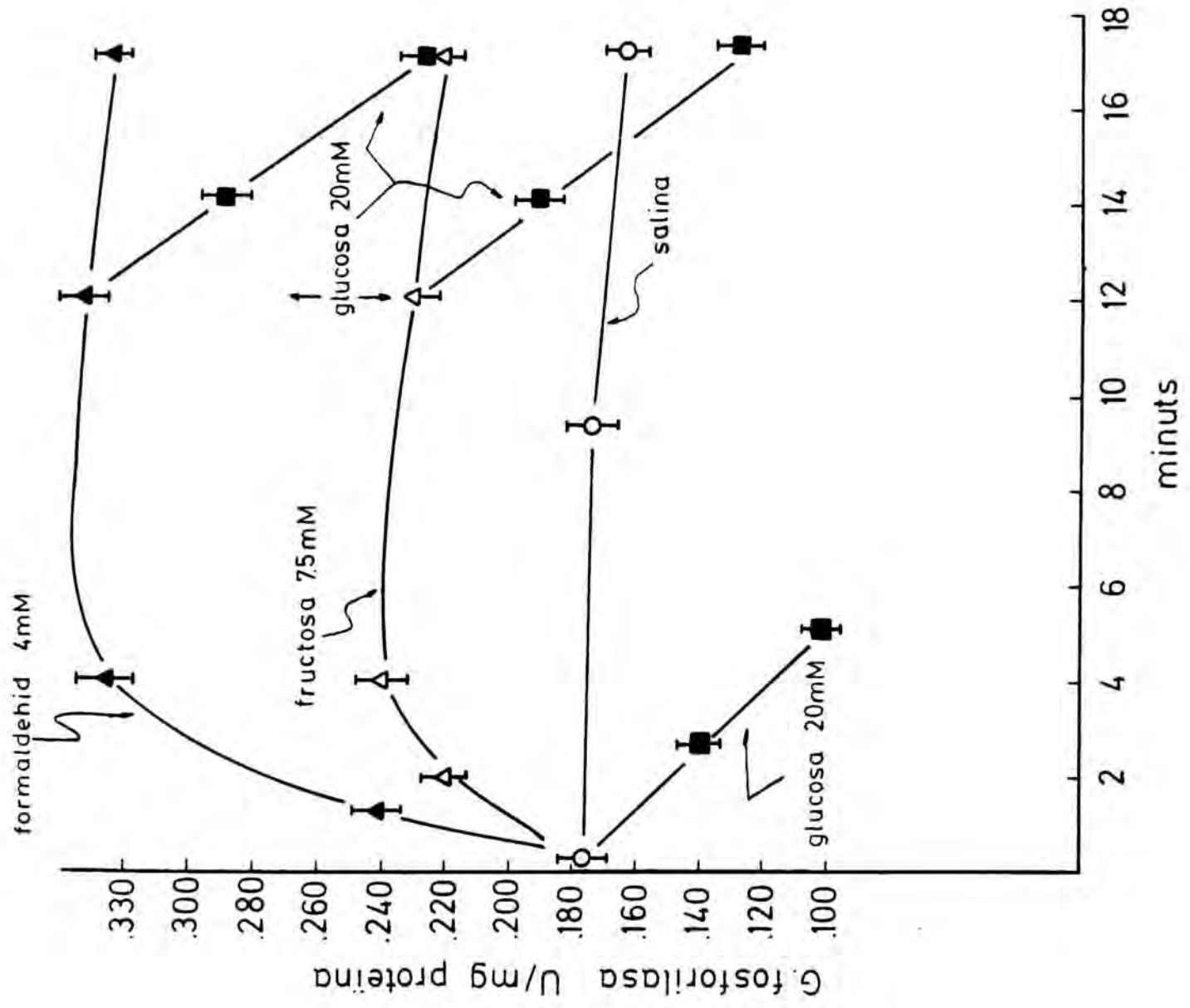
A fi d'indagar en el mecanisme d'acció pel què la fructosa i els aldehids activen la glicogeno-fosforilasa, es va investigar el possible efecte de limitació que la glucosa i la insulina pogueren exercir sobre l'esmentada activació.

És conegut que la glucosa inactiva la glicogeno fosforilasa en condicions basals, bé d'una manera directa per unió de l'hexosa a un locus inhibidor o bé perquè el complex glucosa-fosforilasa és més fàcilment desfosforilable per la fosfatasa de la fosforilasa.

D'altra banda està demostrat l'efecte de limitació de la insulina sobre la glicogeno-fosforilasa prèviament activada

FIGURA 7 LIMITACIÓ PER LA GLUCOSA DE L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA PROVOCADA PER FRUCTOSA I PER FORMALDEHID.

Els hepatòcits foren incubats amb fructosa 7,5 mM (Δ), amb formaldehid 4 mM (\blacktriangle) o amb solució salina (O) durant temps diferents que anaven des de 2 a 17 min. Al minut 12 s'hi afegia una concentració de glucosa de 20 mM i la incubació es perllongava durant cinc minuts més. Posteriorment es determinà l'activitat fosforilasa tant en els extractes procedents dels hepatòcits tractats en presència de glucosa (\blacksquare) com en aquells incubats en absència de l'hexosa en la ulterior incubació.



per dosis submàximes de glucagó, cosa que fa pensar que la insulina pot afectar d'alguna manera el paper que l'AMP cíclic té sobre la cascada glicogenolítica. A més, recentment ha estat demostrada l'activació per la insulina de l'activitat fosfatasa de la fosforilasa.

D'aquesta manera vam incubar els hepatòcits amb concentracions submàximes- és a dir, capaços de produir aproximadament un efecte meitat del màxim- de fructosa (7,5 mM) i de formaldehid (4 mM). Al minut 12, quan encara l'activació de la fosforilasa era ben palesa, s'hi afegia una concentració de glucosa de 20 mM, capaç per si mateixa de provocar una clara inactivació de l'enzim i es perllongava la incubació durant cinc minuts més. A continuació es mesurava l'activitat de la fosforilasa en els extractes procedents de les cèl.lules tractades en presència o absència de glucosa en la ulterior incubació. Com es mostra a la FIGURA 7, la glucosa era capaç de limitar l'activació provocada tant per fructosa com per formaldehid. L'efecte de limitació tenia, quantitativament, un valor molt similar a l'efecte d'inactivació produït quan s'incuba només amb glucosa.

En una altra sèrie d'experiments vam procedir a l'estudi de l'efecte de limitació per la insulina. Les cèl.lules van ésser incubades amb insulina 10^{-6} M durant 10 minuts i tot seguit s'afegia la fructosa a concentracions creixents durant un temps de quatre minuts. Com hom pot observar a la FIGURA 8, la insulina també era capaç de disminuir l'efecte de la fructosa sobre l'activació de la glicogeno-fosforilasa.

Per completar l'estudi d'aquest procés es va realitzar una experiència que conduí a establir la relació en el temps de la limitació per la insulina de l'activació de la fosforilasa per la fructosa (FIGURA 9). De la mateixa manera que a l'experiment esmentat anteriorment, les cèl.lules eren preincubades amb insulina a una concentració de 10^{-6} M durant 10 minuts al final dels quals s'incubaven amb la fructosa a una concentració de 7,5 mM durant diferents temps fins a un màxim de 18 mi-

FIGURA 8 LIMITACIÓ PER LA INSULINA DE L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA PROVOCADA PER LA FRUCTOSA (I).

Concentracions creixents de fructosa s'addicionaren al medi d'incubació que contenia hepatòcits de rates aïllats, incubats prèviament amb solució salina (Δ) o insulina 10^{-6} M (\blacktriangle) durant 10 min.

El temps d'incubació de les cèl.lules amb la cetosa es perllongava durant quatre minuts més.

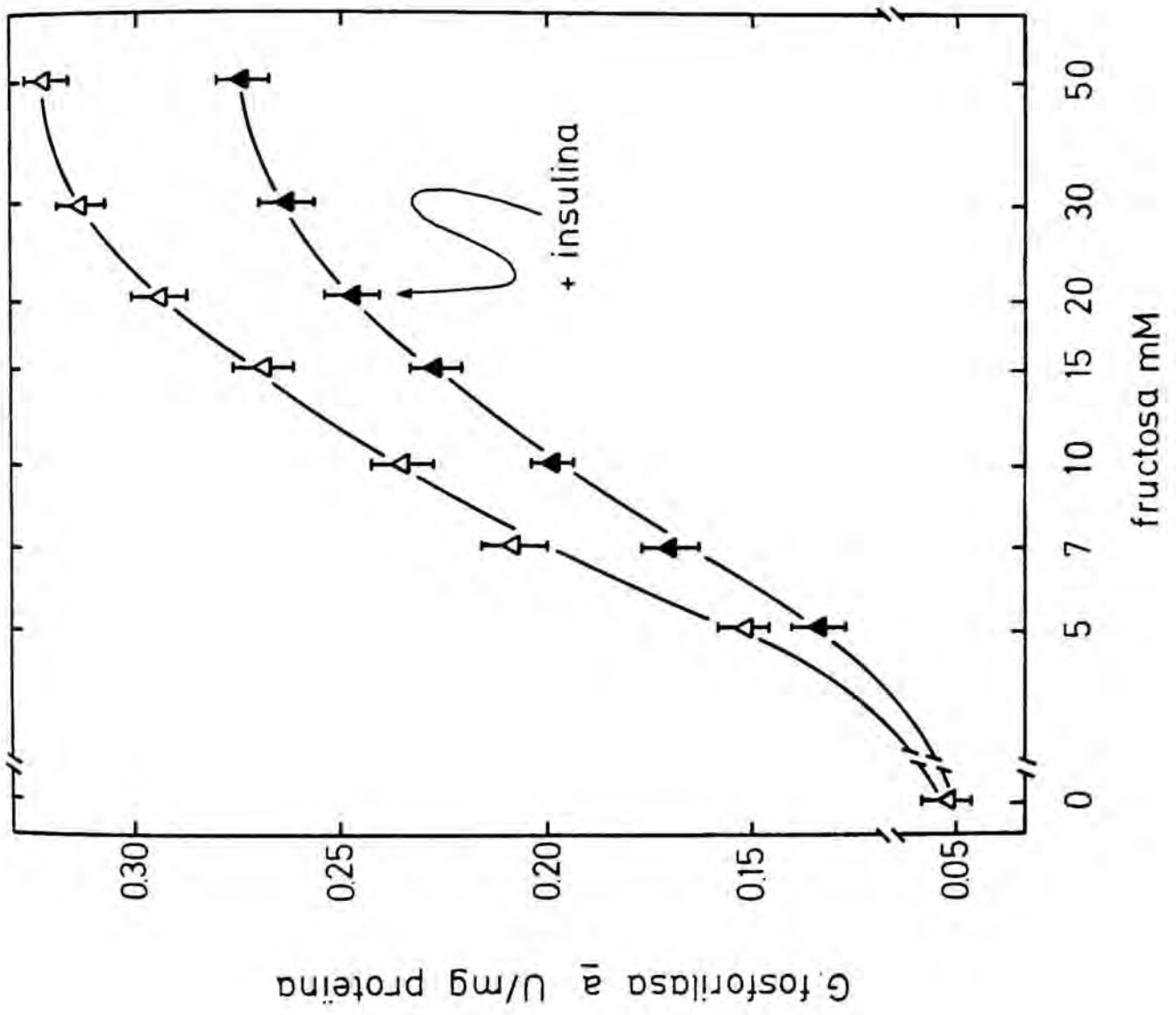
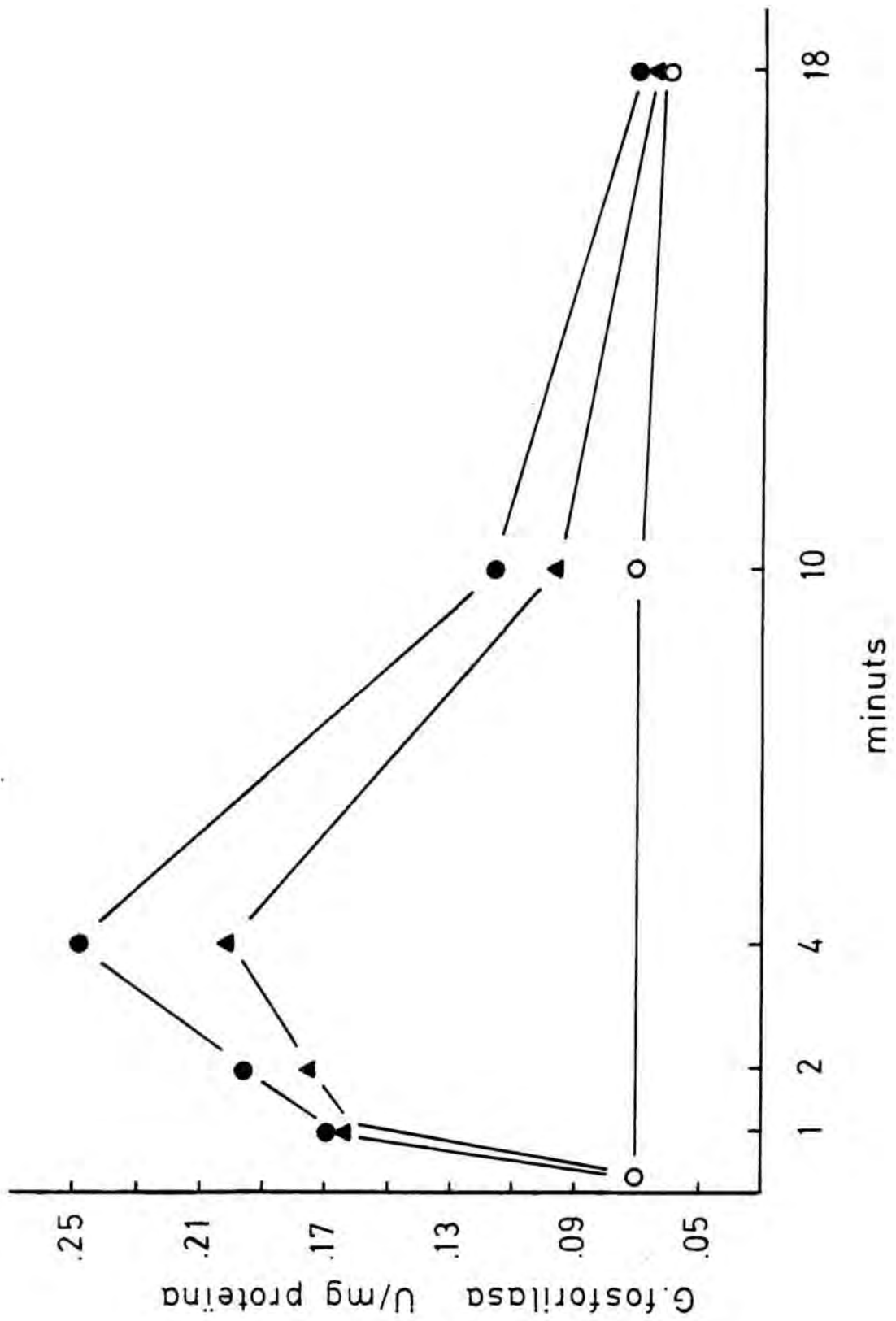


FIGURA 9 LIMITACIÓ PER LA INSULINA DE LA ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA PROVOCADA PER LA FRUCTOSA (II).

Dependència del temps sobre l'efecte d'activació de la fosforilasa per la fructosa en cèl·lules hepàtiques que havien estat incubades prèviament durant 10 min amb solució salina (●) o amb insulina 10^{-6} M (▲).



nuts . L'efecte de limitació màxima fou observat als quatre minuts de l'addició de la cetosa.

Ja que la glucosa i la insulina semblen tenir en llur mecanisme un punt en comú: l'activació de la fosfatasa de la fosforilasa, els resultats de limitació observats suggereixen la possibilitat que la fructosa conduís l'activació de la fosforilasa a través d'un mecanisme d'inhibició de la fosfatasa de la fosforilasa. Una altra possibilitat estaria en un mecanisme relacionat amb un increment en els nivells d'AMP cíclic i en l'estat d'activació de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid.

3.1.4.4. Efectes de fructosa i aldehids sobre els components de la cascada glicogenolítica.

Donat per una banda que l'activació de la fosforilasa hepàtica per hormones, com el glucagó o l'epinefrina, està associada a una activació prèvia dels enzims que formen part de la cadena de quinases en la via glicogenolítica; i d'altra banda l'observació dels efectes de limitació de la insulina damunt descrits, ens feren dissenyar i portar a terme una sèrie d'experiments per tal de veure si la fructosa o aldehids eren capaços d'activar algun dels enzims de l'esmentada cascada. Per això, es van mesurar tant els nivells d'AMP cíclic com les activitats enzimàtiques de la proteïno-quinasa dependent d'aquest nucleòtid, de les proteïno-quinases independents d'AMP cíclic i de la quinasa de la fosforilasa.

3.1.4.4.1. Efectes de fructosa i glioxal sobre els nivells d'AMPcíclic.

La incubació dels hepatòcits amb fructosa i amb glioxal

a concentracions suficients per a produir una notable activació de la fosforilasa , és a dir , 10 i 4 mM , respectivament no produïren cap canvi significatiu en el valor basal d'AMP cíclic que oscil.lava en un valor de 0,6 nmols per gram de fetge , pes humit .

3.1.4.4.2.Efectes de la fructosa i aldehyds sobre les activitats proteïno-quinases .

L'activitat proteïno-quinasa es mesurava en el sobrenedant de 10.000 x g, 15 min, després de la incubació dels hepatòcits amb fructosa o aldehyds . Com a substrat s'utilitzava histona quan es volia determinar l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i caseïna si es determinava l'activitat de les proteïno-quinases independents del nucleòtid .

Les incubacions amb els efectors es feren a concentracions que anaven des de 5 a 50 mM per temps que oscil.laven entre els 30 segons i els 12 minuts . En cap cas s'observà una variació significativa en l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i en la de les independents d'AMP cíclic que fosforilen la caseïna .

A la TAULA III es representa els valors en les activitats enzimàtiques esmentades després de la incubació de fructosa 50 mM i diferents aldehyds a 10 mM durant temps d'incubació que anaven de 2 a 12 minuts .

D'altre banda i a efecte de control positiu , el glucagó incubat a 10^{-7} M -concentració que produeix una activació de la fosforilasa aproximadament igual a la provocada per fructosa 50mM o glioxal 10 mM - sí que va activar clarament

TAULA III EFECTE DE LA FRUCTOSA DEL GLUCAGÓ I DE ALDEHIDS
SOBRE L'ACTIVITAT DE LES PROTEÏNO-QUINASES.

Els extractes cel.lulars provinents d'hepatòcits incubats amb fructosa, amb glucagó o amb aldehids, pels temps i concentracions que s'indiquen, foren assajats per l'activitat proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, utilitzant histona com a substrat (relació d'activitats -AMPc/+AMPc); i per l'activitat proteïno-quinasa independent d'aquest nucleòtid, fent servir caseïna com a substrat.

Addició	Temps d'incubació (min)	Relació d'activitats (-AMPC/+AMPC)	Activitat caseïno-quinasa pmols ³² P/min x mg
Solució salina (control)		0.43	14.2
Fructosa 50 mM	2	0.40	15.8
	12	0.43	13.8
Gliceraldehid 10 mM	2	0.44	15.6
	12	0.39	15.4
Glioxal 10 mM	2	0.45	13.2
	12	0.40	12.8
Formaldehid 10 mM	2	0.38	13.1
	12	0.37	13.6
Glucagó 10 ⁻⁷ M	2	0.92	16.8
	12	0.61	16.4

la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic en les condicions d'assaig utilitzades . Tanmateix , l'efecte del glucagó als 12 minuts es detectava només lleugerament, probablement per haver retornat en aquest temps l'activitat de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic al seu valor basal .

3.1.4.4.3. Efecte de fructosa i aldehyds sobre l'estat de dissociació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic .

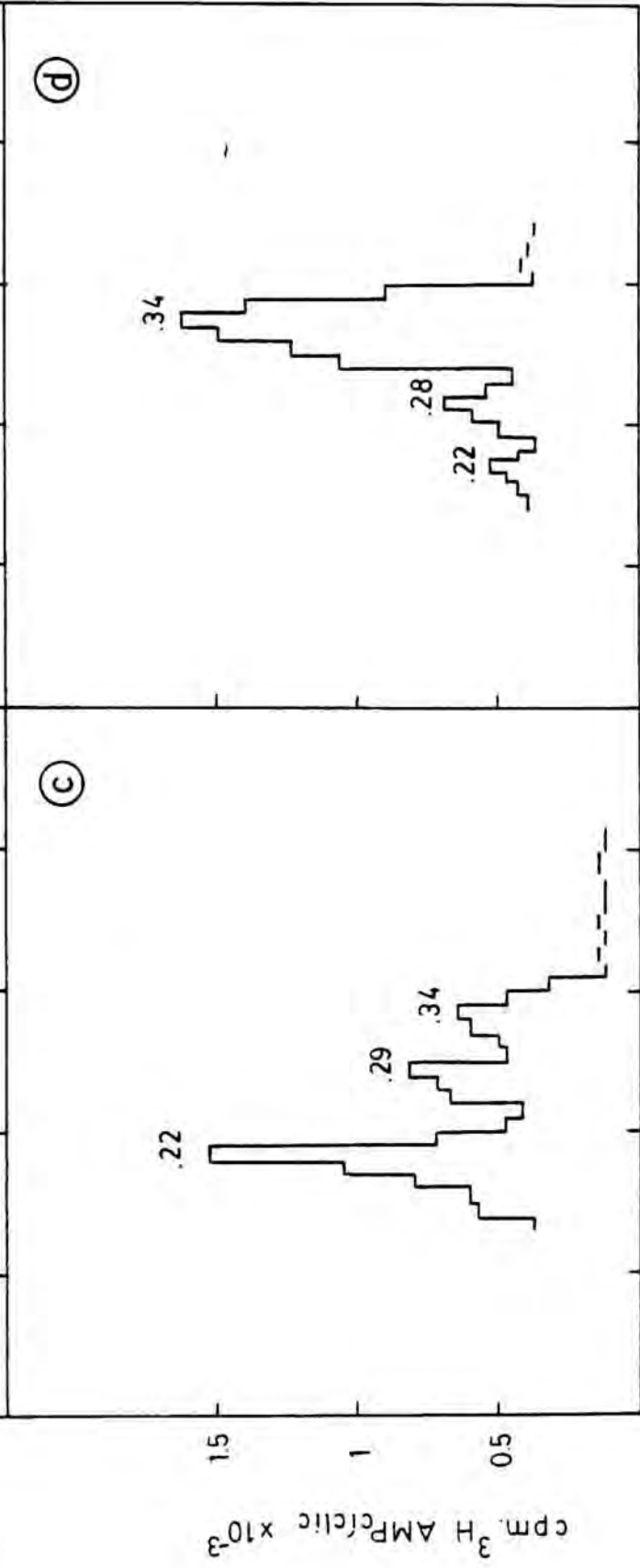
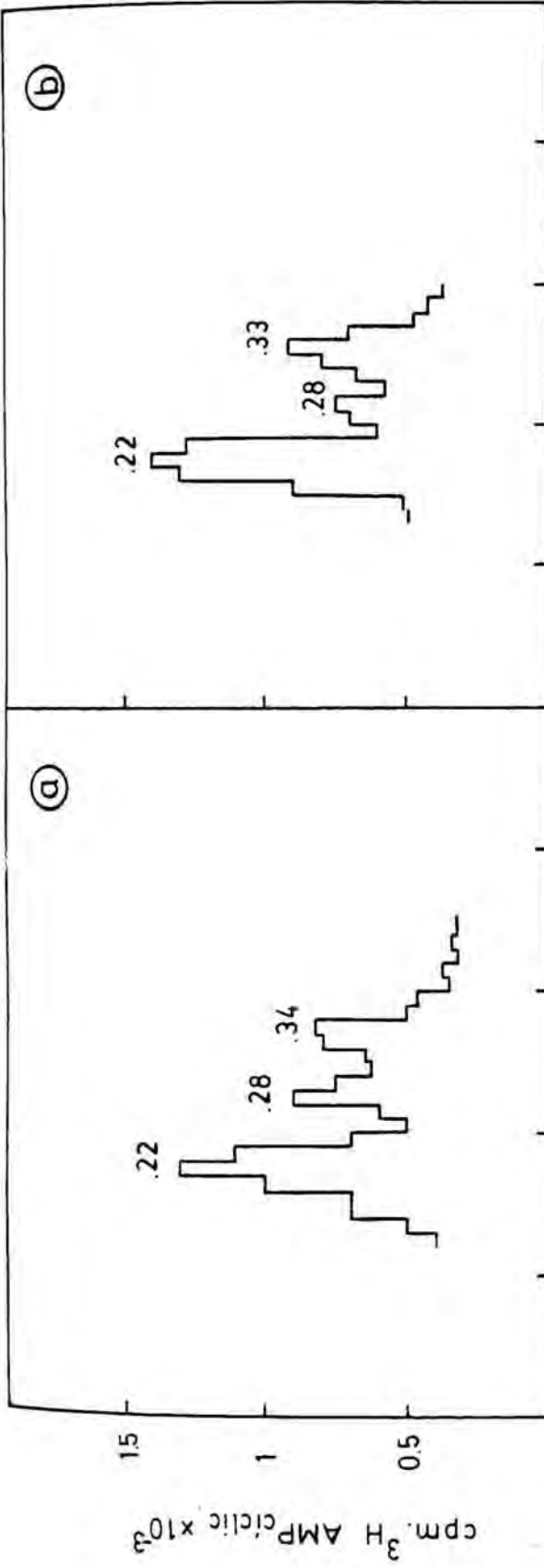
Una altra serie d'experiments van ésser duts a terme pel que fa a la determinació de l'estat de dissociació de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic , és a dir, ens interessava saber quina influència podia tenir la fructosa i els aldehyds sobre els holoenzims i subunitats reguladores d'aquesta proteïno-quinasa . A tal efecte quatre alíquotes de 0,4 g d'hepatòcits cadascuna van ésser incubats amb sel. salina, fructosa 50 mM , glioxal 10 mM i glucagó 10^{-7} M, respectivament, durant 2 minuts al final dels quals eren homogeneïtzats amb 250 ul de KF 150 mM/EDTA 15 mM .

L'homogeneïtzat de cada tub era centrifugat durant 15 minuts a $10.000 \times g$ i el sobrenedant preparat per a l'electroforesi en gels de poliacrilamida que va ésser aplicada tal com es descriu a Mètodes .

Després de l'electroforesi , els holoenzims i les subunitats reguladores separades en el gel eren revelats per la seva capacitat de fixar-ne o d'intercanviar AMP cíclic . Després d'aquest revelat en els gels apareixien tres pics principals de fixació de 3H .AMP cíclic . Aquests pics corresponien a uns valors de R_f de 0,22 (pic 1), 0,30 (pic 2) i 0,34 (pic 3) respecte al front electroforètic marcat pel colorant aniónic .

FIGURA 10 PERFIL DE FIXACIÓ DE ^3H .AMP CÍCLIC DESPRÉS D'ELECTROFORESI D'EXTRACTES CRUS D'HEPATÒCITS INCUBATS AMB FRUCTOSA, AMB GLIOXAL O AMB GLUCAGÓ.

Els hepatòcits foren tractats dos minuts, amb solució salina (a), amb glioxal 10mM (b), amb fructosa 50 mM (c) o amb glucagó 10^{-7} M (d).



En estudis previs al nostre laboratori s'havia arribat a correlacionar els pics 1 i 2 amb sengles holoenzims H_1 i H_2 , i el pic 3 amb les subunitats reguladores lliures (R).

Així, pel cas del control incubat amb solució salina s'obtingué un patró de fixació d'AMP cíclic tritiat que es representa a la FIGURA 10,a), amb un pic corresponent a l'holoenzim H_1 d'àrea clarament superior al de l'holoenzim H_2 . L'àrea del pic corresponent a les subunitats reguladores està en relació amb el baix estat de dissociació de la proteïno-quinasa propi del control.

Els patrons de fixació del (3H) AMP cíclic pels gels corresponents a fructosa i glioxal no mostraven modificació significativa respecte al patró del control (FIGURA 10,b i c) la qual cosa indica que no s'havia produït cap dissociació dels holoenzims per produir subunitats lliures. Cal observar, però, en el patró de fixació d'AMP cíclic tritiat del gel corresponent al glucagó - que s'havia incubat a una concentració capaç de produir un increment similar en l'activitat glicogeno-fosforilasa al provocat per fructosa i glioxal - com efectivament s'havia dissociat la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. A la FIGURA 10 es pot constatar la dramàtica disminució de l'holoenzim H_1 com a conseqüència del tractament amb el glucagó i l'augment del pic corresponent a les subunitats reguladores lliures.

Les darreres dades indicaven que l'activació de la glicogeno-fosforilasa per fructosa i aldehyds no estava relacionada amb un increment en els nivells d'AMP cíclic, activació o dissociació de la proteïno-quinasa dependent del nucleòtid ni de les independents que fosforilaven la caseïna.

3.1.4.4.4. Activitat de la quinasa de la fosforilasa després de la incubació amb fructosa i aldehyds.

Tot i que no semblava factible l'activació de la fosforilasa com a resultat dels efectes de l'AMP cíclic en el fetge, cabia la possibilitat que la quinasa de la glicogenofosforilasa b hepàtica fos o bé activada via Ca^{2+} o bé estimulada per efecte de la fructosa o els aldehyds. Ja ha estat descrit a la secció 1.3.1.1.5, com solvents orgànics com ara el metanol, la formamida, el butanol, l'acetona i d'altres són estimulants de la quinasa de la glicogenofosforilasa muscular actuant directament sobre la mateixa molècula de l'enzim.

El mot "estimulació" es refereix aquí a qualsevol increment en l'activitat enzimàtica degut a mecanismes no-covalents a diferència del "d'activació" que es refereix a un increment en l'activitat de l'enzim com a resultat d'una modificació covalent de l'enzim. Per tal d'investigar aquestes possibilitats es van portar a terme dos tipus d'experiments; uns que tenien com a objectiu veure si la fructosa i els aldehyds podien activar la quinasa de la fosforilasa b després de la incubació dels efectors amb els hepatòcits; i uns altres per veure si l'activació es podria produir com a conseqüència de la incubació directe dels efectors en un homogenat d'hepatòcits .

A la primera serie d'experiments, la fructosa s'incubava amb els hepatòcits en un rang de concentracions que anaven des de 5 a 50 mM , i els diferents aldehyds a una concentració de 10 mM, durant 2 minuts al final dels quals els hepatòcits eren centrifugats i el líquid sobrenedant eliminat. El paquet de cèl.lules era resuspès en el tampó d'homogeneïtzació, que incloïa l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, i tot seguit era congelat ràpidament amb l'ajut de nitrògen líquid . Les mostres eren guardades sota refrigeració (- 40°C) fins el moment de procedir a la determinació .

Les mostres eren descongelades en un bany d'aigua-gel

TAULA IV ACTIVITAT DE LA QUINASA DE LA FOSFORILASA RESULTANT DESPRÉS DE LA INCUBACIÓ DE LES CÈL.LULES HEPÀTIQUES AMB FRUCTOSA, AMB ALDEHIDS O AMB GLUCAGÓ.

L'activitat de la quinasa de la fosforilasa en els extractes d'hepatòcits fou determinada pel grau de formació de fosforilasa a en unitat de temps. Tant la solució d'homogeneització de les cèl.lules com la de la barreja de la determinació de l'activitat enzimàtica contenien l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic.

Només es va detectar una modificació significativa en l'esmentada activitat quan els hepatòcits s'incubaven amb glucagó.

Addició	Temps d'incubació (min)	Quinasa de la fosforilasa U/min x g de proteïna
Solució salina (control)		72 ± 5
Fructosa 30 mM	0.5	75 ± 7
	2	74 ± 5
	4	71 ± 6
Gliceraldehid 10 mM	2	69 ± 5
Glioxal 10 mM	2	68 ± 6
Glucagó 10 ⁻⁷ M	2	140 ± 10

amb agitació contínua (100 cops per minut). Una alíquota de cada homogenat descongelat era introduïda a la barreja de reacció, destinada a la determinació de l'activitat enzimàtica, que contenia també l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic a més de fosforilasa b com a substrat. La reacció s'inicià amb 20 ul d'ATP-Mg, 1-2 mM concentració final, respectivament. A partir del minut zero i a intervals de cinc minuts es treien alíquotes que eren diluïdes 10 vegades en tampó de beta-glicero-fosfat a 0°C. D'aquesta mescla posteriorment s'agafaven les mostres per a la determinació de l'activitat fosforilasa a formada en els transcurso de l'anterior reacció. Aquest assaig era efectuat en presència d'una concentració elevada de cafeïna per tal de lliurar l'assaig específic a la forma a de la fosforilasa.

Ni la fructosa, a cap de les concentracions assajades, ni els aldehids produïren cap increment de l'activitat de la quinasa de la fosforilasa en les condicions expressades, (TAULA IV).

A la segona sèrie d'experiments es partia d'un homogenat hepàtic en presència de l'inhibidor de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic. L'homogenat es dividia en alíquotes a cada una de les quals s'afegien els efectors a una concentració de 10 mM. Després de 15 minuts d'incubació a 30°C es determinava l'activitat de la quinasa de la fosforilasa amb el mateix procediment esmentat anteriorment. En aquest cas tampoc es detectà cap modificació de la activitat enzimàtica estudiada.

Cal fer notar que en els experiments duts a terme amb hepatòcits es va introduir, a mena de control positiu, una concentració de glucagó capaç d'activar la glicogeno-fosforilasa a un nivell similar al produït per la fructosa i els aldehids a les concentracions assajades. Del glucagó es coneix que activa la quinasa de la fosforilasa i així ho féu

en els nostres experiments .

Els darrers resultats suggereixen la no implicació de les quinases de la cascada glicogenolítica en l'activació de la glicogeno-fosforilasa per la fructosa o els aldehids.

3.1.4.5. Efecte dels nivells d'ATP sobre la glicogeno-fosforilasa

A fi de comprovar si el decreixement en els nivells d'ATP provocats per la fructosa podia ésser el responsable de l'activació de la fosforilasa, es va incubar les cèl.lules amb 2,4-dinitrofenol, agent desacoplant de la fosforilació oxidativa mitocondrial i que mena a uns valors disminuïts d'ATP d'una manera dosi-dependent.

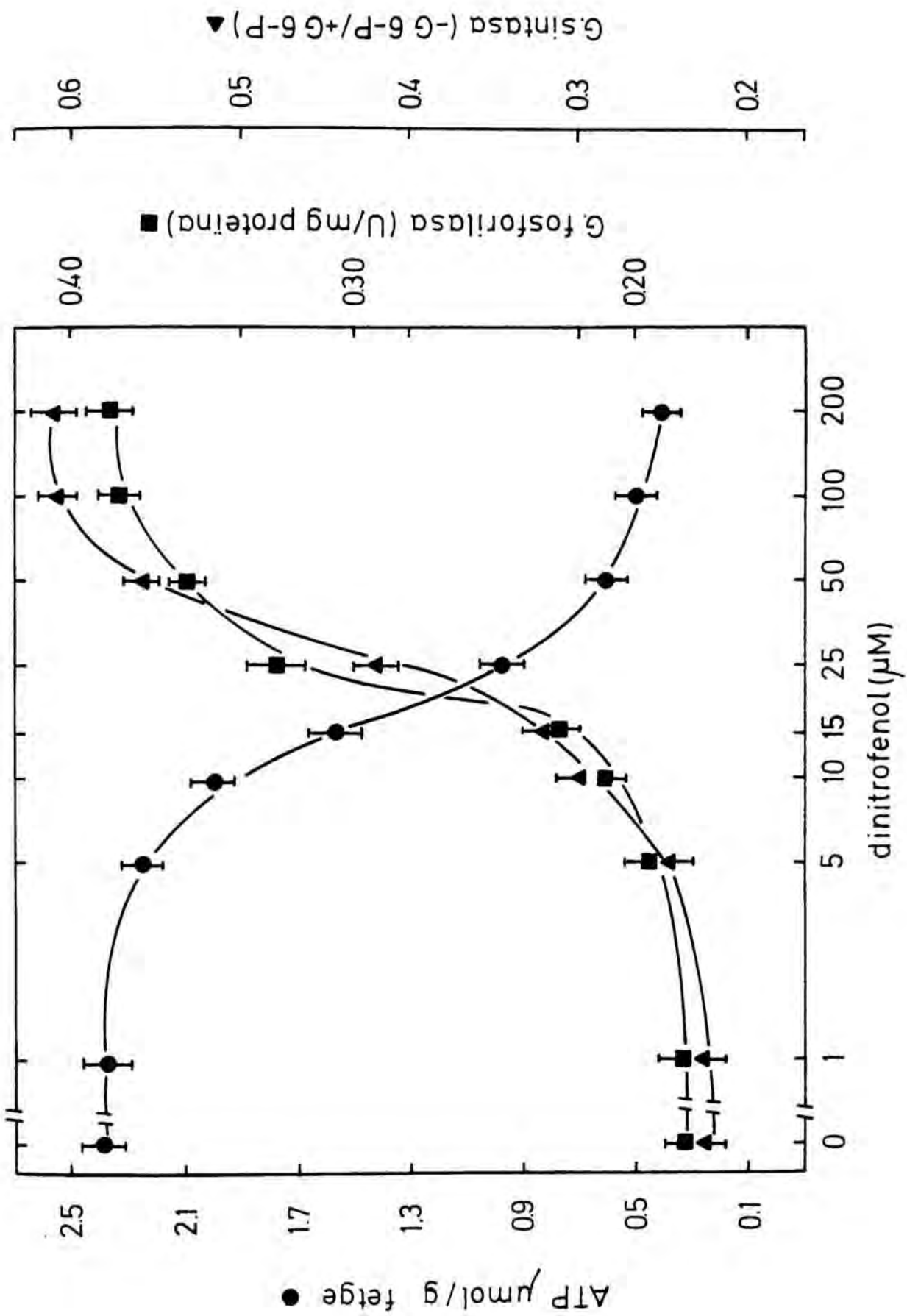
Així, després d'una curta incubació prèvia a 37°C dels hepatòcits aïllats a partir de rates dejunes 24 hores, se'ls afegien concentracions creixents de 2,4-dinitrofenol per un temps de 10 minuts al final del quals les cèl.lules eren homogeneïtzades i l'activitat de la glicogeno-fosforilasa determinada.

EL 2,4-dinitrofenol era dissolt en dimetilsulfòxid (DMSO) i afegit a la suspensió cel.lular de tal manera que la concentració final del dissolvent fos 1% volum/volum. En primer lloc es va comprovar que el DMSO no afectés per ell sol l'activitat de la glicogeno-fosforilasa. De fet, i a la concentració emprada, el DMSO no va modificar significativament el valor basal de la fosforilasa respecte als controls incubats en la seva absència .

Els valors d'ATP com a conseqüència de la incubació amb el 2,4-dinitrofenol experimentaren un decreixement dosi-dependent (FIGURA 11). La glicogeno-fosforilasa simultàniament,

FIGURA 11 EFECTE DEL 2,4-DINITROFENOL, EN FUNCIO DE LA CONCENTRACIO, SOBRE ELS NIVELLS INTRACEL·LULARS D'ATP I LES ACTIVITATS GLICOGENO-SINTASA I GLICOGENO-FOSFORILASA.

El 2,4-dinitrofenol era dissolt en dimetil - sulfòxid (DMSO). Aquesta solució era afegida a la suspensió cel·lular de tal manera que la concentració final del dissolvent (DMSO) fos sempre d'un 1% volum/volum, i la de 2,4-dinitrofenol aquella que s'expressa en la figura. El temps d'incubació d'aquest compost amb els hepatòcits fou de 10 min.



va resultar activada amb una perfecta sincronia respecte a la decreixença d'ATP.

Cal fer notar, tal com s'expressa a la FIGURA 11 que la activitat glicogeno-sintasa, mesurada en els mateixos extractes de l'experiència anterior, també s'anava incrementant d'una manera perfectament coincident amb el decreixement en els nivells d'ATP.

Aquest patró d'actuació exercit pel 2,4-dinitrofenol manté una perfecta analogia amb els efectes provocats per la fructosa tant sobre la glicogeno-fosforilasa com sobre la glicogeno-sintasa.

Ja sia que la fructosa i el 2,4-dinitrofenol no tenen metabolits en comú i que l'únic efecte compartit observat era el de reduir els nivells d'ATP, es va assumir que l'activació que ambdós efectors provocaven sobre la glicogeno-fosforilasa era deguda precisament a la caiguda, per si mateixa o per algun esdeveniment associat, dels nivells del nucleòtid. En aquest punt es suggestiva la proposta per part de certs autors (151) que l'activitat de la fosfatasa de la fosforilasa és regulada pels nivells d'ATP-Mg. Una decreixença d'aquests podria conduir a la inactivació de la fosfatasa de la fosforilasa i finalment a l'activació de la fosforilasa per un mecanisme d'inhibició de la seva desfosforilació

D'altra banda sembla clar que l'activació de la fosforilasa per fructosa i aldehyds pot dur-se a terme en principi per vies diferents puix que el glioxal i d'altres aldehyds no disminueixen els nivells d'ATP.

Adicionalment, el fet que el 2,4-dinitrofenol conduís a l'activació de la glicogeno-sintasa després de rebaixar els nivells d'ATP, al igual que ho féu la fructosa, era un punt interessant per començar un estudi dels requeriments de la

glicogeno-sintasa per activar-se .

3.1.5. ESTUDI DEL MECANISME D'ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA .

3.1.5.1. Activació per decreixença en els nivells d'ATP

La incubació dels hepatòcits amb 2,4-dinitrofenol rebaixava els nivells d'ATP en una manera dosi-dependent i concomitantment menava l'activació de la glicogeno-sintasa (FIGURA 11). Aquest fet és altament coincident amb el patró exercit per la fructosa sobre aquests paràmetres (vegeu FIGURA 3 a, i 6) .Aquestes dades, doncs, suportaven la possibilitat que la concentració del nucleòtid pogués ésser un dels factors en la regulació de l'activitat de la glicogeno-sintasa "in vivo" . De fet , "in vitro" ja havia estat observada la inhibició per l'ATP de la interconversió de la forma D a I de la glicogeno-sintasa.

3.1.5.2. Efecte del glioxal sobre l'activitat glicogeno-sintasa .

Ja que el glioxal activa la glicogeno-fosforilasa sense disminuir els valors d'ATP era interessant d'estudiar quin seria l'efecte produït per aquest aldehyd sobre l'activitat glicogeno-sintasa .

Hepatòcits procedents tant de rates dejunes com d'alimentades eren incubats amb concentracions creixents de glioxal (1-5 mM) durant 8 minuts. Després d'homogeneïtzar les cèl.lules l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa era

determinat mitjançant dues relacions d'activitat: a) la clàssica relació $-G6-P/+G6-P$, que es va fer servir en el cas de rates dejunes, i b) la relació $G6-P$ baixa/ $G6-P$ alta que, com s'indica a la secció 2.5.1.1.2., és un index molt més sensible de l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa: aquesta relació s'utilitzà a concentracions de $G6-P$ de 0,25 i 10 mM, respectivament, i era aplicada en el cas de rates alimentades.

Independentment de l'estat nutricional dels animals, el glioxal provocà una inactivació de l'enzim que depenia de la concentració de l'efector emprada (FIGURA 12,a). Aquesta inactivació també va resultar ésser dependent del temps (FIGURA 12,b). El temps d'activació màxima fou 8 minuts.

El fet que el glioxal, a més de no reduir els nivells d'ATP, inactivés la glicogeno-sintasa abonava la idea de l'existència de dues vies d'actuació, una per fructosa i una altra pels aldehyds, per la comú activació de la fosforilasa hepàtica. Cal assenyalar que el glioxal exercí un patró d'actuació sobre les activitats de la glicogeno-sintasa i de la glicogeno-fosforilasa que concorda plenament amb el provocat pel glucagó, l'hormona glicogenolítica de més potència al fetge.

3.1.5.3. Efecte del glioxal sobre la glicogenòlisi hepàtica.

Les modificacions en les activitats enzimàtiques provocades pel glioxal eren idònies per activar la glicogenòlisi. Per tal motiu, vam dissenyar i dur a terme uns experiments de mesura de l'activitat glicogenolítica.

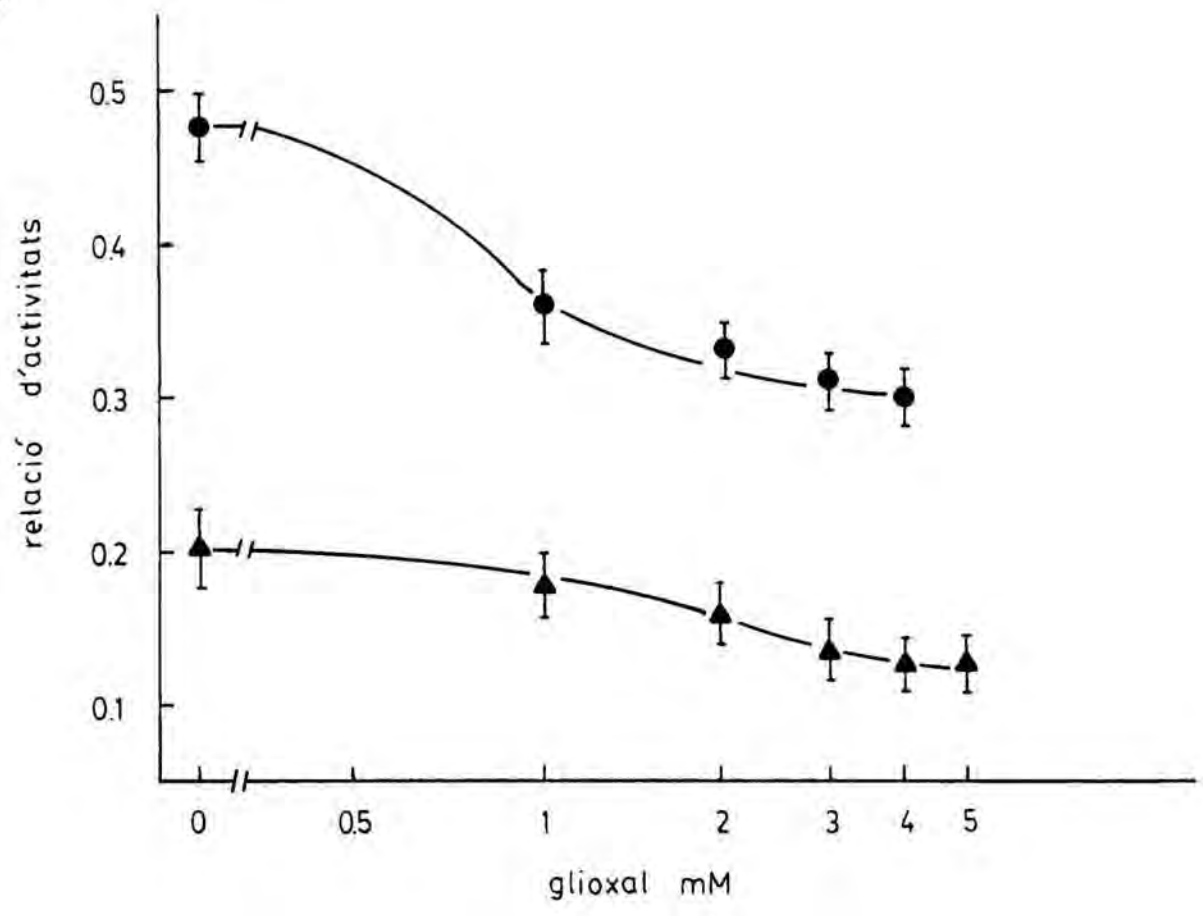
La glicogenòlisi es va avaluar per l'alliberament net de restes glucosils al medi d'incubació, és a dir, per la quantitat de glucosa alliberada per les cèl.lules en resposta a l'efector una vegada feta la diferència amb la glucosa alliberada per les cèl.lules control en el mateix temps d'incubació. Com era d'esperar atenent als resultats sobre les activitats enzimàtiques es produí una gran glicogenòlisi que era

FIGURA 12 ACCIÓ DEL GLIOXAL SOBRE ELS HEPATÒCITS AÏLLATS DE RATA.

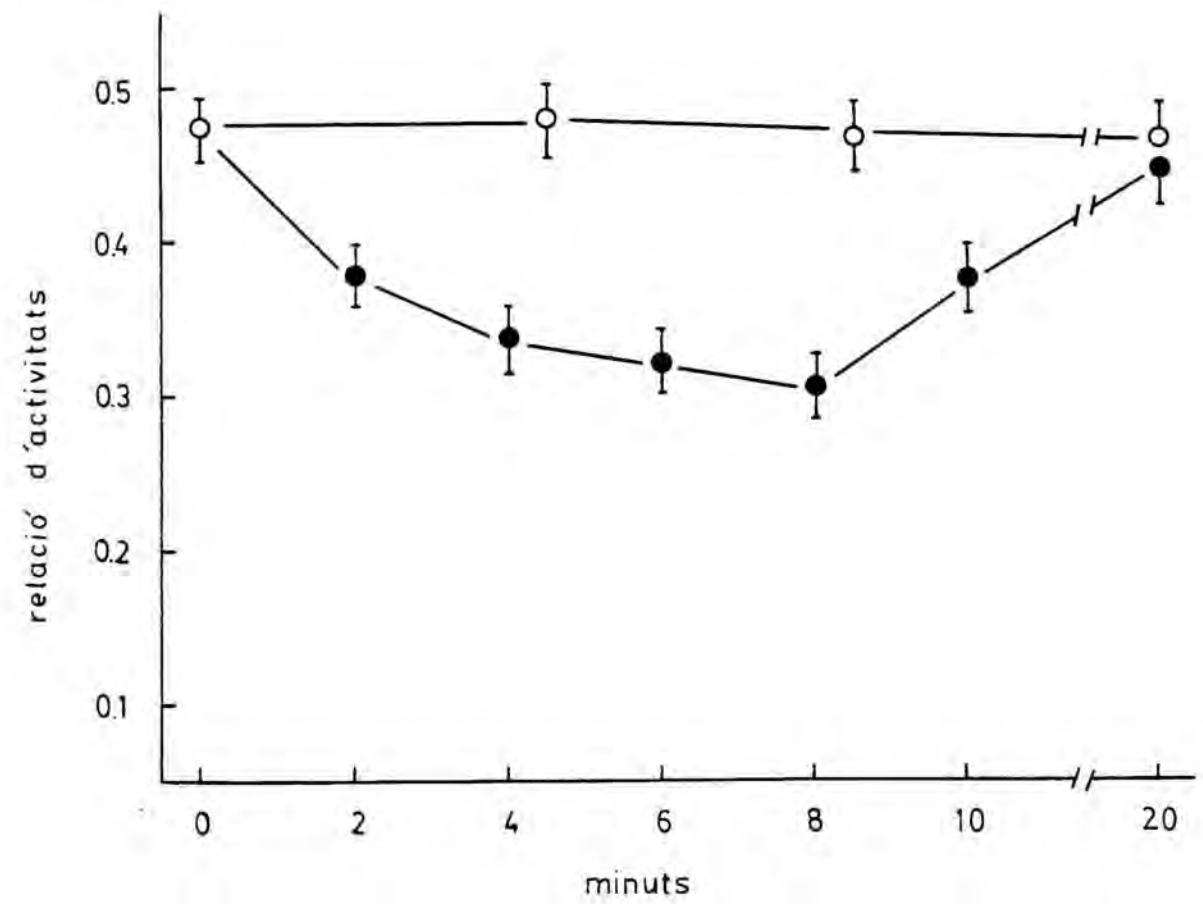
- a) Efecte de concentracions creixents del glioxal sobre l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa. Aquest es va determinar tant en hepatòcits aïllats de rates dejunes (\blacktriangle) (fent servir la relació d'activitats $-G\ 6-P/+G\ 6-P$), com en cèl·lules isolades d'animals alimentats normalment (\bullet) (utilitzant la relació $G\ 6-P\ 250\ \mu M/G\ 6-P\ 10\ mM$).

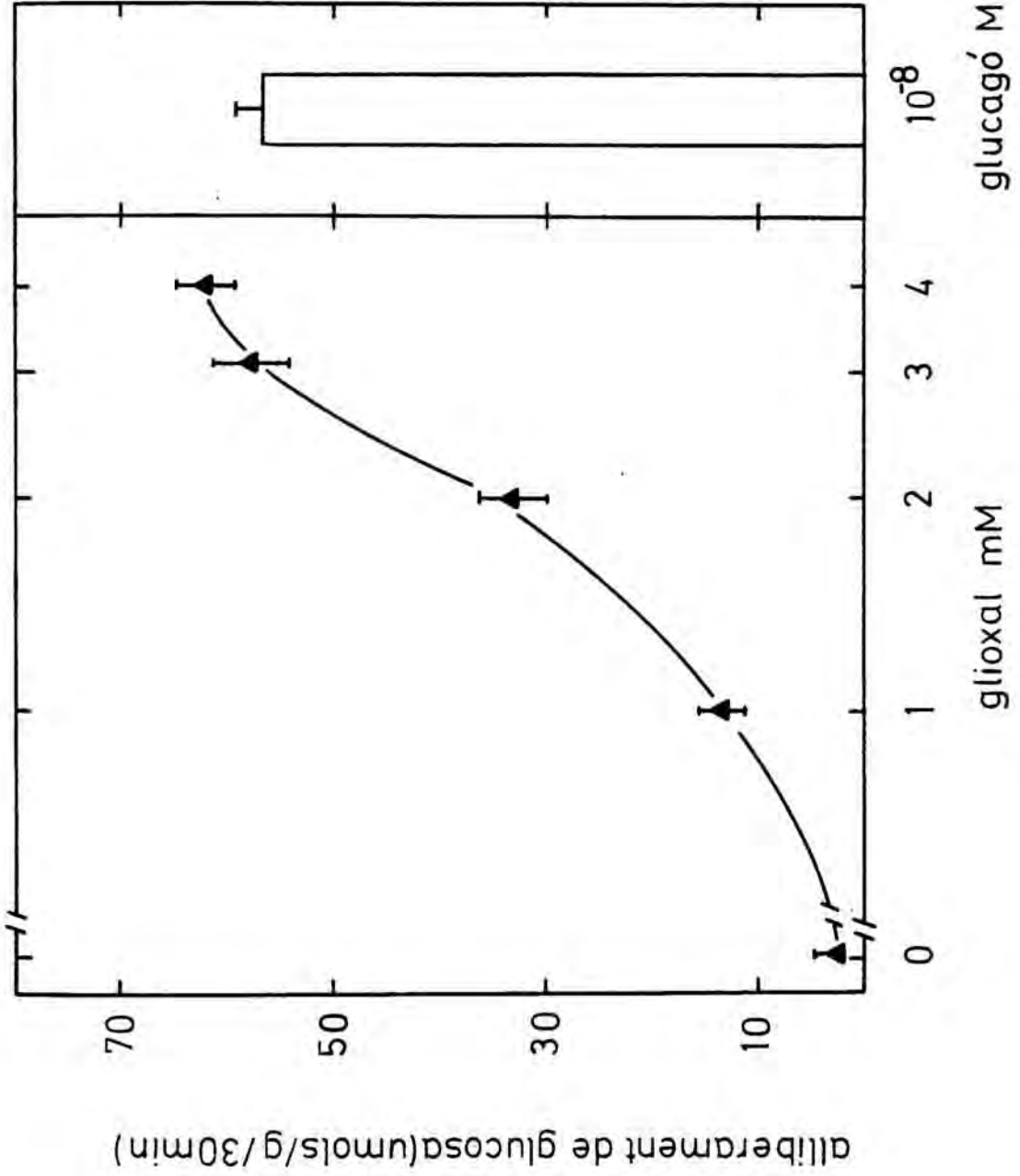
- b) Dependència del temps en l'efecte del glioxal sobre l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa d'hepatòcits de rates alimentades "ad libitum" (\bullet). Es va utilitzar la relació d'activitats $G\ 6-P$ baixa/ $G\ 6-P$ alta.

(a)



(b)





dosi-dependent (FIGURA 13). La dosi dependència de la glicogenòlisi després de la incubació amb glioxal 1-4 mM per 30 minuts a 37°C queda palesa a la FIGURA 13 on a efectes comparatius també es representa la glicogenòlisi produïda per una concentració de glucagó que provoca efectes similars sobre sintasa i fosforilasa que glioxal 4mM.

3.1.5.4. Increment en l'activitat de la glicogeno-sintasa per la G 6-P

Independentment de l'activació de la glicogeno-sintasa per la decreixença d'ATP, devia d'existir un altre factor per la seva activació, puix que efectors com la manosa, la glucosa, la galactosa no alteren d'una manera tan dràstica com el 2,4-dinitrofenol els nivells d'ATP i en canvi activen notablement la relació d'activitat de la glicogeno-sintasa. En altres paraules, el petit decreixement en els nivells d'ATP provocat per aquests efectors semblaven no poder explicar en la seva totalitat l'increment assolit en l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa (vegeu TAULA V i FIGURA 11). D'altra banda és conegut l'efecte activador de la glucosa 6-P sobre l'activitat de l'enzim "in vitro"; per exemple, es pot mesurar l'activitat total de l'enzim en presència d'una concentració elevada del sucre-fosfat.

3.1.5.4.1. Nivells de glucosa-6-fosfat

Tot seguit es feren una sèrie d'experiments a fi de calcular els nivells de glucosa 6-fosfat existents tant en les cèl.lules control com després de la incubació amb cadascun dels efectors emprats. Es van assajar efectors capaços d'activar la glicogeno-sintasa, principalment la glucosa i la fructosa

TAULA V CONTINGUT INTRACEL·LULAR D'ATP I DE G6-P DES-
PRÉS DE LA INCUBACIÓ DELS HEPATÒCITS AMB SU-
CRES DIVERSOS O AMB 2,4-DINITROFENOL.

Els hepatòcits foren incubats durant 10
minuts amb els efectors a les concentracions
que s'indiquen.

Addició	ATP (μ mols/g fetge pes humit)		Glucosa 6--fosfat (nmols/g fetge pes humit)	
	$\bar{x} \pm$ S.E.	P	$\bar{x} \pm$ S.E.	P
Control (salina)	2.39 ± 0.05		76 ± 7	
Fructosa 3 mM	1.52 ± 0.05	< 0.0005	140 ± 6	< 0.0005
Glucosa 23 mM	2.03 ± 0.05	< 0.0005	182 ± 8	< 0.0005
Glucosa 20 mM + Fructosa 3 mM	1.36 ± 0.06	< 0.0005	267 ± 10	< 0.0005
Manosa 20 mM	1.92 ± 0.06	< 0.0005	175 ± 9	< 0.0005
2,4 dinitrofenol 100 μ M	0.42 ± 0.08	< 0.0005	80 ± 6	> 0.4 n.s.

a diferents concentracions així com barreges d'aquests dos sucres. També es va determinar la concentració d'èster fostat que es pogués produir com a conseqüència de la incubació amb 2,4-dinitrofenol. A la TAULA V es mostren els valors de glucosa 6-fosfat en cèl.lules incubades 10 min amb cadascun dels efectors.

Cal destacar que tots els sucres assajats produïren increments altament significatius ($p < 0,005$) en els nivells de glucosa 6-fosfat. D'altra banda el 2,4-dinitrofenol, com era d'esperar, no els modificà significativament ($p > 0,4$). D'aquesta manera, el 2,4-dinitrofenol en activar la glicogeno-sintasa ho faria gairebé exclusivament com a conseqüència del decreixement en els nivells d'ATP.

3.1.5.4.2. Activació "in vivo" de la glicogeno-sintasa per la glucosa 6-fosfat.

L'activació "in vitro" de la glicogeno-sintasa per glucosa 6-P estava demostrada. Així mateix, s'havia observat que els nivells de glucosa 6-fosfat s'incrementaven com a conseqüència de la incubació amb sucres que d'altra banda activaven la glicogeno-sintasa d'hepatòcits. Calia, doncs, demostrar que un increment de la glucosa 6-fosfat realment podia activar "in vivo" la glicogenò-sintasa.

El principal problema per tal demostració consistia fonamentalment en fer arribar la glucosa 6-fosfat dins la cèl.lula en condicions de viabilitat. És conegut que la membrana normal i intacta no permet l'entrada dels èsters fosfòrics a l'interior de la cèl.lula. A fi de resoldre aquest problema es va fer servir l'antibiòtic poliènic filipina que té la capacitat de provocar porus a la membrana cel.lular i en conseqüència converteix les cèl.lules en permeables als èsters fosfòrics.

5 ml d'una suspensió d'hepatòcits aïllats de rates de-
 junes 24 hores eren incubades durant 10 minuts a 37°C en
 un medi compost d'HEPES 220 mM; KOH 110 mM; ClK 4,8 mM; Cl-
 Na 4,8 mM; SO₄Mg 1,2 mM ; pH 7,4; en absència de bicarbonat
 i fosfats per ésser inhibidors de les fosfatases. A continua-
 ció les cèl.lules eren preincubades amb filipina 100 µM dis-
 solta en DMSO 1% v/v (concentració final en el medi d'in-
 cubació) durant 10 minuts al final dels quals se'ls afegien
 concentracions creixents de glucosa 6-fosfat. Després de 15
 minuts d'incubació amb l'èster fosfòric les cèl.lules eren
 centrifugades, el sobrenedant (medi d'incubació) precipitat
 amb àcid perclòric 0,3 N (concentració final) i el paquet cèl-
 lular homogeneïtzat en fred amb 100 µl de fluorur potàsic
 600 mM; EDTA 60 mM i pH 7,0. Els homogeneïtzats eren imme-
 diatament centrifugats a 10.000 x g durant 10 minuts. Tot se-
 guit, els extractes eren traspassats per columnes (1 x 10 cm)
 d'Ultragel AcA202 equilibrades amb KF 75 mM; EDTA 7,5 mM; pH
 7,0 i es recollia només la banda proteica. 100 µl dels ex-
 tractes filtrats eren incubats durant 30 minuts a 4°C amb 5
 µl d'una dissolució de NADP⁺ (20 mg/ml) i 5 µl d'una suspen-
 sió de deshidrogenasa de la glucosa 6-P per tal d'eliminar
 traces de glucosa 6-fosfat que haguessin pogut restar en els
 extractes filtrats. Aquesta alíquota era destinada a la de-
 terminació de la "forma I" de la glicogeno-sintasa. A conti-
 nuació es determinava l'estat d'activació de la sintasa mit-
 jançant dues relacions d'activitat: a) -G 6-P/+G 6-P
 i b) G6-Pbaixa/G6-Palta a concentracions de glucosa 6-
 fosfat de 250 µM i 10 mM, respectivament. Pel que fa a la úl-
 tima relació i prèviament a la determinació de l'activitat,
 els extractes eren diluïts 1:2 amb el tampó d'equilibració de
 les columnes. La incubació en la determinació es feia a 30°C
 durant 20 i 15 minuts per les dues relacions d'activitat, res-
 pectivament. Una concentració de G 6-P de 1mM ja exercí un
 efecte d'activació potent i significant sobre l'estat d'ac-
 tivació de l'enzim mesurat pels dos tipus de relació d'ac-
 tivitats (TAULA VI).

TAULA VI EFECTE DE LA GLUCOSA 6-P SOBRE L'ESTAT D'ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA D'HEPATÒCITS PERMEABILITZATS PER L'ACCIÓ DE LA FILIPINA.

Les cèl.lules hepàtiques foren tractades durant 10 minuts amb l'antibiòtic filipina per tal de permeabilitzar-les. Tot seguit s'incubaven amb les concentracions de G6-P que s'indiquen.

L'estat d'activació de la glicogeno-sintasa fou determinat per mitjà de dues relacions d'activitat:

- a) la relació $-G6-P/+G6-P$
- b) i la $G6-P$ baixa/ $G6-P$ alta

A més s'expressa la concentració de glucosa al medi al final de les incubacions.

	relació d'activitats		Glucosa al medi mM
	(-G6P/+G6P)	(G6P _{0.25} mM/G6P ₁₀ mM)	
salina + filipina 100 µM	0.20	0.44	0.80
Filipina + G6P 1 mM	0.28	0.55	0.82
Filipina + G6P 5 mM	0.29	0.57	0.90
Filipina + G6P 10 mM	0.31	0.60	0.92
Filipina + glucosa 1 mM	0.21	0.45	
Filipina + glucosa 5 mM	0.22	0.47	

A la concentració de glucosa 6-P de 10 mM l'efecte sobre la relació $-G\ 6-P/+G\ 6-P$ de la glicogeno-sintasa era de 10 punts percentuals d'increment en el percentatge de la forma I sobre el valor basal, i de 15 punts percentuals pel que fa a la relació $G\ 6-P$ baixa/ $G\ 6-P$ alta.

A la TAULA VI també es presenta les dades obtingudes sobre la concentració de glucosa al medi extracel.lular al final dels 15 minuts d'incubació amb els èsters fosfòrics. Cabia pensar que les fosfatases de cèl.lules trancades poguessin lliurar suficient glucosa al medi, a partir de la glucosa 6-fosfat, capaç d'activar per si sola, la glicogeno-sintasa. Hom pot observar que la concentració de glucosa al medi de les cèl.lules incubades amb glucosa 6-P no era gaire superior a la de les cèl.lules control. En cap cas no s'observà un increment superior a 0,2 mM per sobre del valor del control, valor que correspondria aproximadament a un efecte d'hidròlisi de la glucosa 6-P de 0,16 $\mu\text{M}/\text{min} \times \text{g}$ de fetge. Per tant, la concentració de glucosa al medi introduïda per efecte de la incubació de $G\ 6-P$ es pot considerar nul.la respecte a la concentració de glucosa que la glicogeno-sintasa necessita per activar-se.

Cal assenyalar que era realment important determinar les concentracions presents de glucosa com a hexosa lliure en aquestes experiències per tal d'adreçar convenientment l'efecte d'activació de la sintasa al metabolit corresponent. També, a mena de control addicional es va estudiar la resposta a la glucosa, per part de la glicogeno sintasa, en les cèl.lules tractades amb la filipina. Així, concentracions de glucosa de 1 a 5 mM afegides a cèl.lules preincubades amb l'antibiòtic filipina incrementaren només 1 i 2 punts percentuals, respectivament, el percentatge de la forma I de la glicogeno-sintasa. Tot i que aquestes concentracions eren notablement superiors a les trobades en el medi d'incubació després de 15 min d'actuació de la $G\ 6-P$, produïen, àdhuc, un increment inferior a l'observat com a conseqüència de la incubació amb glu-

cosa 6-P.

Quedava així demostrat que, efectivament, la glucosa - 6-fosfat que penetrava la membrana d'aquests hepatòcits permeables era capaç d'activar la glicogeno-sintasa, cosa que establia la relació entre l'èster fosfòric en sis de la glucosa i l'activació "in vivo" de la glicogeno-sintasa hepàtica.

3.1.5.5. Activitat de la glicogeno-sintasa davant la relació G 6-P/ATP.

Hom ha descrit en les darreres seccions que la glicogeno-sintasa podia activar-se tant per increment en els nivells de glucosa 6-fosfat com per decreixement en el contingut intracel.lular d'ATP.

Específicament, hi havia dos tipus pràcticament purs d'activació de la glicogeno-sintasa. Un representat per la glucosa, que introduïa una decreixença mínima, encara que significativa, en els nivells d'ATP, i un gran augment (a prop de dues vegades i mitja sobre el valor basal) de la concentració intracel.lular de glucosa 6-P. El segon tipus estava representat pel 2,4-dinitrofenol, que sense produir cap increment en els nivells de glucosa 6-P, provocava una disminució notable del nucleòtid. En ambdós patrons d'actuació la relació d'activitats (-G 6-P/+G 6-P) de la glicogeno-sintasa augmentava significativament.

Aquests fets feren pensar en una possible relació entre l'estat d'activació de l'enzim representat per la seva relació d'activitats i les concentracions relatives de cadascun dels metabolits G 6-P i ATP representades per la relació G 6-P/ATP.

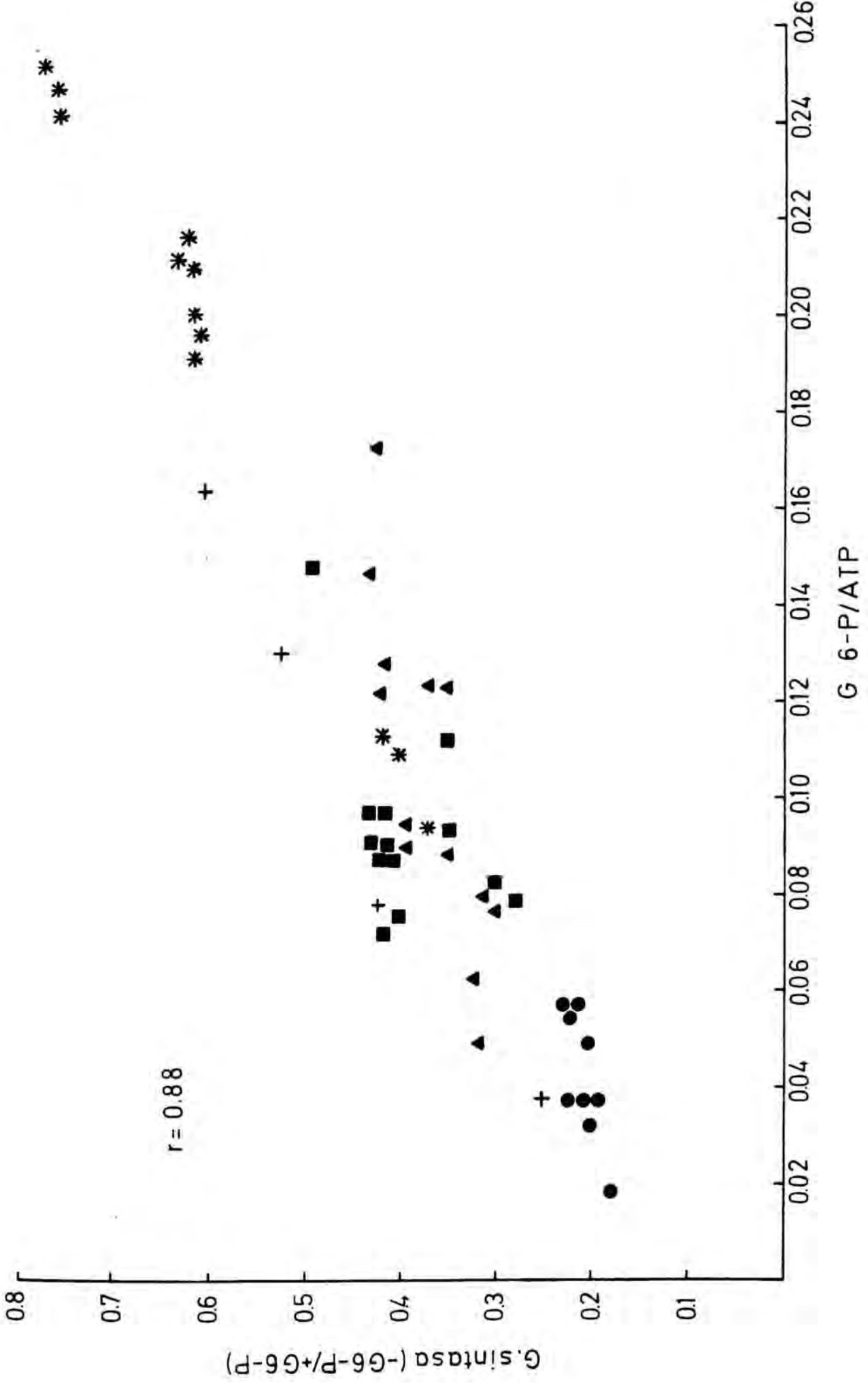
Aquesta relació augmentaria tant per un increment en

FIGURA 14 CORRELACIÓ ENTRE EL QUOCIENT DE LES CONCENTRACIONS RELATIVES INTRACEL·LULARS DE G 6-P i D'ATP, I L'ESTAT D'ACTIVACIÓ DE LA GLICOGENO-SINTASA.

Els hepatòcits s'incubaren, durant temps diferents, amb concentracions diverses de glucosa (■), de fructosa (▲), de combinacions de tots dos sucres (*), i de 2,4-dinitrofenol (+). A les cèl·lules control s'hi afegia un volum equivalent de solució salina (●).

A continuació es mesuraven els nivells intracel·lulars de G 6-P i d'ATP. D'altre banda es determinava l'estat d'activació de la glicogeno-sintasa per cadascuna de les condicions experimentals abans esmentades per mitja de la relació d'activitats $-G\ 6-P/+G\ 6-P$.

La correlació entre els valors de G 6-P/ATP i els corresponents a l'estat d'activació de l'enzim fou de $r: 0,88$.



la concentració de G 6-P com per un decreixement en la d'ATP, i molt més si es produís un efecte combinat sobre tots dos metabolits com el que s'observa clarament en el cas de la fructosa.

Es va representar la relació G 6-P/ATP davant la relació d'activitats de l'enzim ($-G\ 6-P/+G\ 6-P$) per cadascuna de les incubacions amb els efectors a diferents concentracions i barreges. A la FIGURA 14 es plasma les relacions esmentades després de la incubació dels hepatòcits amb solució salina fructosa, glucosa, combinacions dels dos sucres i 2,4-dinitrofenol, a diferents concentracions.

Com hom pot observar el núvol de punts corresponents a les relacions definides es disposaren en una banda estreta que mostrava una correlació de $r=0,88$. Existia, doncs, una notable connexió entre la relació G 6-P/ATP i la corresponent a l'estat d'activació de l'enzim.

3.1.6. INCREMENT EN L'ACTIVITAT DE LA FOSFATASA DE LA GLICOGENO-SINTASA PER FRUCTOSA.

El problema subseqüent que es va plantejar era a través de quin enzim es portava a terme l'activació de la glicogeno-sintasa per efecte de la incubació dels sucres amb els hepatòcits.

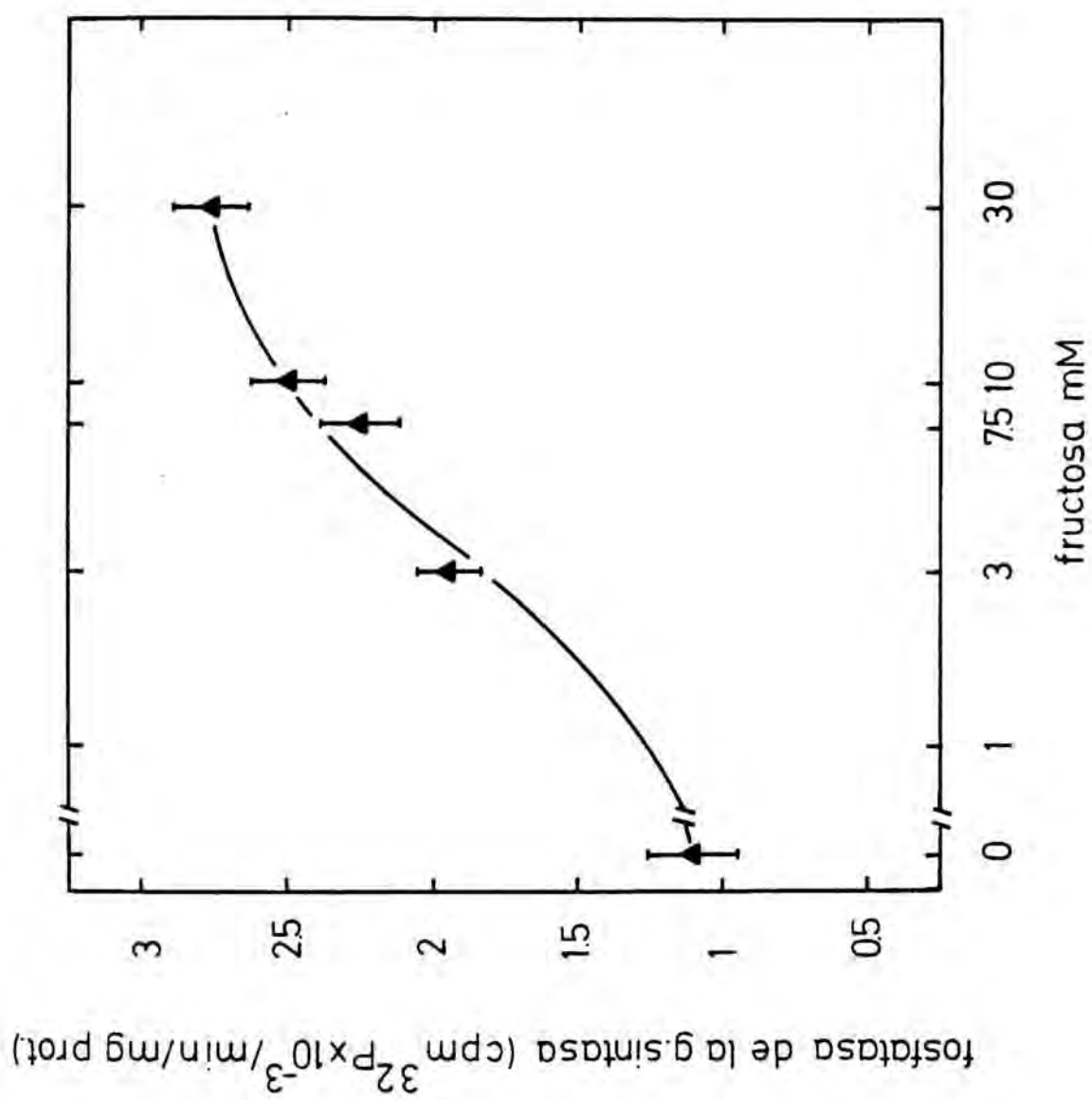
Hom havia descrit "in vitro" l'activació de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa muscular per la glucosa 6-fosfat i també que l'ATP era un inhibidor potent de l'enzim.

Aquests fets, juntament amb la correlació que acabàvem d'establir entre el quocient de G 6-P/ATP i l'estat d'activació de la glicogeno sintasa ens conduïren a pensar en la fosfatasa de la glicogeno-sintasa com a bon candidat que me-

FIGURA 15 EFECTE DE LA FRUCTOSA SOBRE L'ACTIVITAT FOSFATASA DE LA GLICOGENO-SINTASA.

Les cèl.lules hepàtiques foren incubades amb concentracions creixents de fructosa que anaven des de 3 a 30 mM, durant cinc minuts.

L'activitat fosfatasa de la glicogeno-sintasa era mesurada per determinació de l'hidrolisi de (^{32}P) a partir de (^{32}P) -glicogeno-sintasa utilitzada com a substrat.



diatitzés l'activació de la sintasa.

Es plantejaren i duren a terme uns experiments a fi d'esbrinar si l'activitat de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa modificava la seva activitat com a conseqüència de la incubació dels hepatòcits amb fructosa.

Hepatòcits de rates dejunes foren incubats per cinc minuts amb solució salina (control) i amb concentracions creixents de fructosa que anaven des de 3 a 30 mM. Al final de cada incubació i després de centrifugar les cèl.lules, el paquet cel.lular era homogeneïtzat amb 240 ul d'una solució amortidora composta per Tris 50 mM, pH 7,8, EDTA 10 mM, PMSF 0,1 mM, mercaptoetanol 50 mM i glicogen al 1%. L'homogeneïtzat era fet servir com a tal sense posterior centrifugació. L'activitat de la fosfatasa de la sintasa era mesurada per determinació de la hidròlisi de fosfat a partir de $\{^{32}\text{P}\}$ glicogeno-sintasa utilitzada com a substrat.

La reacció de la fosfatasa de la glicogeno-sintasa era duta a terme en una barreja composta per 90 ul de la $\{^{32}\text{P}\}$ -glicogeno-sintasa, convenientment preparada tal com es descriu a Mètodes, i 30 ul del homogeneïtzat procedent dels hepatòcits. La quantitat remanent de $\{^{32}\text{P}\}$ -glicogeno-sintasa es determinava en la barreja a 2°C (temps zero) i als 5 i 10 minuts de la incubació a 30°C.

A la FIGURA 15 hom pot observar la dosi-dependència de l'increment en l'activitat de la fosfatasa de la sintasa per efecte de la incubació dels hepatòcits amb fructosa. L'activació era ja significativa a concentracions de fructosa tan baixes com 3 mM.

3.1.7. MODIFICACIONS CINÈTIQUES DE LA GLICOGENO-SINTASA PROVOCADES PER LA GLUCOSA, LA GALACTOSA I LA FRUCTOSA.

En resultats previs al nostre laboratori i d'altres s'havia descrit que les constants cinètiques de la glicogeno-sintasa variaven segons l'estat de fosforilació de l'enzim i que el contingut en fosfat covalentment lligat a la molècula determinava la relació d'activitats $-G\ 6-P/+G\ 6-P$.

Ja que els sucres variaven aquesta relació d'activitat, vam voler saber si realment l'efecte produït pels efectors estudiats es reflectia sobre les constants cinètiques de l'enzim, $M_{0,5}$ per la glucosa 6-P i $S_{0,5}$ per la UDPglucosa, i en quin grau afectaria a cadascuna.

L'estudi va ésser realitzat amb glucosa, galactosa i fructosa, que són respectivament representants de cadascun dels tres grups de sucres establerts a la secció 3.1. Tots tres sucres van ésser incubats durant 10 minuts a una concentració de 30 mM, condicions suficients per a produir l'activació de la glicogeno-sintasa. Els extractes dels hepatòcits així tractats eren sotmesos a filtració per gel. El eluït era dividit en dues fraccions a una de les quals se li afegia quantitat suficient de NADP⁺ i G 6-P DH com per a oxidar petites traces de G 6-P que haurien pogut restar en els extractes filtrats. Aquesta fracció es destinava només per a la determinació de la $S_{0,5}$.

A la TAULA VII s'assenyala els resultats obtinguts. Tots tres sucres estudiat van rebaixar les dues constants cinètiques, $M_{0,5}$ i $S_{0,5}$, molt significativament ($p < 0,0005$). És ben palès l'efecte de la fructosa que es manifestà com el sucre capaç de produir la disminució més forta en els valors d'ambdues constants cinètiques. Així, els valors del control, 20,3 mM per la $S_{0,5}$ i 563 uM per la $M_{0,5}$ eren minvats per efecte de la fructosa (30 mM, 10 min) a 7,2 mM i 245 uM, respectivament.

Els darrers resultats revelaren, doncs, que els sucres

TAULA VII EFECTES DE LA GLUCOSA, LA GALACTOSA I DE LA FRUCTOSA SOBRE LES CONSTANTS CINÈTIQUES DE LA GLICOGENO-SINTASA D'HEPATÒCITS.

Els hepatòcits foren incubats durant 10 minuts amb una concentració final de cadascun dels sucres de 30 mM. Subsegüentment en els extractes sotmesos a filtració per gel es determinaven les constants cinètiques de la glicogeno-sintasa, la $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa i la $M_{0,5}$ per la glucosa 6-P.

	S _{0.5} per 1'UDPG (mm) ± S.E.	P	M _{0.5} per 1a G 6-P ± S.E.	P
Control (salina)	20.3 ± 0.8		563 ± 11	
Glucosa	10.9 ± 1.3	a	311 ± 15	a
Galactosa	14.5 ± 0.2	a	411 ± 10	a
Fructosa	7.2 ± 0.8	a	245 ± 23	a

n = 4

a = p < 0.0005

podien activar la glicogeno-sintasa mitjançant un procés que involucrava un augment en la relació G 6-P/ATP, que podia activar l'activitat fosfatasa de la glicogeno-sintasa i que les modificacions produïdes en la glicogeno-sintasa es reflectien en les seves constants cinètiques.