

**ESTUDI DEL COMPORTAMENT I REGULACIÓ DE L'ENZIM
RESPONSABLE DE LA SÍNTESI DEL GLUCOGEN
EN TROMBÒCITS HUMANS ***

Comunicació presentada el dia 22 d'abril de 1971 pels doctors

J. AGUILAR i M. ROSELL i PÉREZ

Departament de Bioquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

* Treball fet amb l'ajuda d'una beca de «Formación de personal investigador» i d'una ajuda a la investigació del Ministeri d'Educació i Ciència.

Aquest treball és part de la tesi presentada per J. Aguilar per a l'obtenció del grau de Doctor.

INTRODUCCIÓ

El glucogen ha estat descrit com a component majoritari dels trombòcits. La seva funció com a reserva energètica dins la cèl·lula sembla ésser operativa en el metabolisme del trombòcit i en la seva funció fisiològica. Han estat descrites certes alteracions en els nivells del glucogen i en l'activitat dels enzims que prenen part en el seu metabolisme quan té lloc la coagulació, així com la retracció del coàgul. D'altra banda, les alteracions de l'hemòstasi en les glucogenosis (defectes metabòlics de la síntesi o degradació del glucogen) donen suport a aquests fets.

Nosaltres estudiem el comportament de la glucogeno-sintetasa i intentem d'arribar a conèixer la seva regulació en els trombòcits. Cal remarcar aquí el fet que, essent les plaquetes cèl·lules anucleades, no posseeixen els mecanismes per a induir una nova síntesi d'enzims, i constitueixen per aquesta raó un sistema relativament simplificat on poden ésser estudiats alguns aspectes del control del metabolisme del glucogen.⁸

MÈTODES

Les preparacions han estat obtingudes a partir d'un plasma ric en plaquetes provinent de residus de plasmafèresi. Hem trobat que el procés més convenient per a obtenir les cèl·lules d'aquests residus és el següent:

— Dilució dels residus fins a $1/5$ de la concentració sanguínia amb solució fisiològica que té 1 mM EDTA.

— Centrifugació a $670 \times g$. durant 10 minuts per a eliminar els leucòcits i hematies; resta un sobrenedant que constitueix el PRP.

— Sedimentació de les plaquetes del plasma per centrifugació a $2500 \times g$. durant 20 minuts.

Aquestes cèl·lules són resuspeses amb un amortidor 50 mM Tris-1 mM EDTA, en proporció de 10^{11} cèl·lules en 2 ml. d'amortidor, la qual cosa representa una mitjana d'1,37 expressada en pes de teixit humit per volum d'amortidor.

La font enzimàtica, dita «cru», ha estat correntment el sobrenedant de la centrifugació de l'homogeneïtzat a $10\,000 \times g$. Naturalment, totes les operacions descrites es fan a $4^\circ C$.

Aquestes cèl·lules semblen ésser equiparables a les obtingudes per mètodes més directes a partir del donant, per tal com les determinacions de glucogen efectuades es corresponen amb les d'altres autors, són dels voltants d'1 mg. per 10^{11} cèl·lules, i han estat dutes a terme per digestió alcalina del teixit amb KOH al 30 % i determinació del glucogen pel mètode de l'antrona.⁹

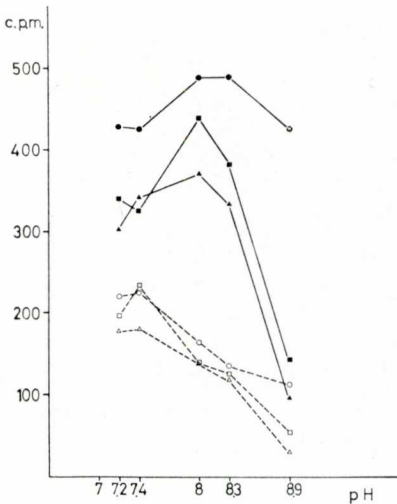


FIG. 1. — VARIACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA AMB EL pH.

L'activitat és representada en c.p.m. enfront dels diferents pH assajats. La font enzimàtica fou un cru (sobrenedant de $10.000 \times g$). La ratlla contínua representa l'activitat en presència de glucosa-6-P, i la discontinua en defecte de l'activador. Els cercles, quadrats i triangles representen el resultat a 0, 30 i 60 minuts de preincubació.

També ha estat analitzada l'activitat glucogeno-sintetasa d'aquestes preparacions per tenir una orientació sobre la viabilitat de les cèl·lules i la validesa del nostre estudi. L'activitat ha estat determinada incorporant ^{14}C -glucosa a glucogen a partir d'UDP-glucosa marcada,¹¹ i ha resultat ésser de 5 nM/min./mg., equivalent a la detectada per altres investigadors.

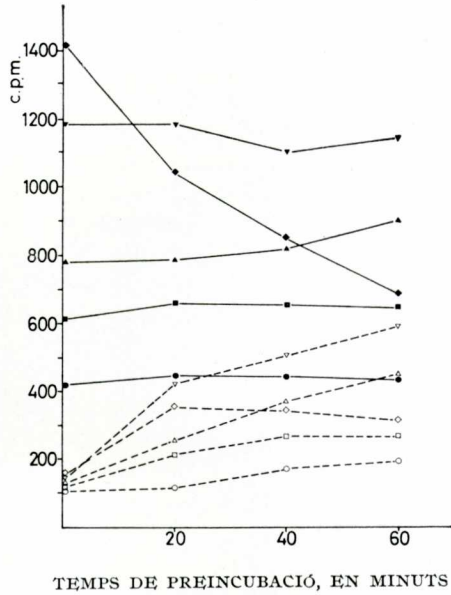
RESULTATS

Hem vist que aquesta activitat es perd absolutament per incubació de les cèl·lules tant a $4^\circ C$ com a $30^\circ C$ durant 24 h.

La incorporació de glucosa a glucogen ha resultat lineal amb el temps i amb la concentració de proteïna (dilució de l'homogeneïtzat) dins uns límits en els quals entren les condicions utilitzades per a l'assaig de l'activitat enzimàtica del nostre estudi.

FIG. 2. — EFECTE DE LA TEMPERATURA I LA PREINCUBACIÓ EN L'ACTIVITAT DE L'ENZIM.

L'activitat de l'enzim és representada amb el temps de preincubació a : ● 18° C, ■ 25° C, ▲ 30° C, ▼ 37° C i ◆ 40° C. La font enzimàtica fou l'enzim cru (sobrenadant de 10.000 x g.). La ratlla contínua representa l'activitat en presència de glucosa-6-P, i la discontinua en defecte de l'activador.



TEMPS DE PREINCUBACIÓ, EN MINUTS

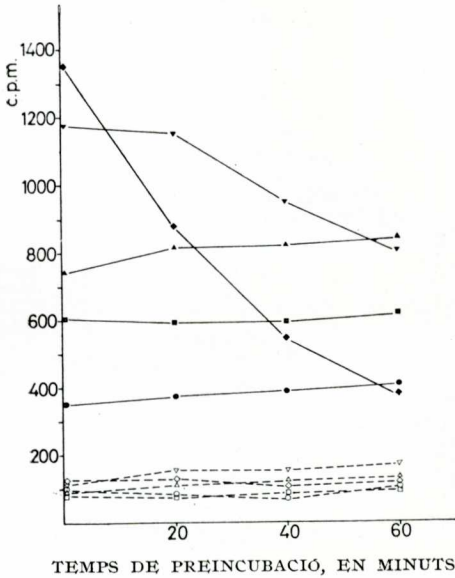


FIG. 3. — EFECTE DE LA TEMPERATURA I LA PREINCUBACIÓ EN L'ACTIVITAT DE L'ENZIM.

L'activitat de l'enzim és representada amb el temps de preincubació a : ● 18° C, ■ 25° C, ▲ 30° C, ▼ 37° C i ◆ 40° C. La font enzimàtica fou la fracció particulada de 100.000 x g. La ratlla contínua representa l'activitat en presència de glucosa-6-P, i la discontinua en defecte de l'activador.

TEMPS DE PREINCUBACIÓ, EN MINUTS

Hem estudiat l'efecte del pH i de la temperatura sobre l'activitat (fig. 1); així hem trobat que els pH òptims difereixen lleugerament en l'activitat mesurada amb glucosa-6-P i sense,^{2, 12} i resulten, amb un amor-

tidor de Tris-ClH, de 8,15 i 7,4 respectivament. Podem veure així mateix que la influència del pH es fa més notable amb la preincubació, la qual cosa indica un canvi en l'estabilitat de l'enzim.¹

L'efecte de la temperatura ha estat estudiat incubant i preincubant, a cinc temperatures diferents: 18, 25, 30, 37 i 40° C, l'enzim cru i l'enzim de la fracció particulada de 100 000 × g. (figs. 2 i 3).

Veiem, doncs, que la temperatura òptima d'assaig que adoptarem, o sigui la de 30° C, ens dóna una uniformitat de les condicions en què hem mesurat l'activitat, sigui la que sigui la font enzimàtica.

Si representem el log. de la velocitat inicial enfront de l'invers de les temperatures (fig. 4), obtenim una recta com la de la figura, on el pendent

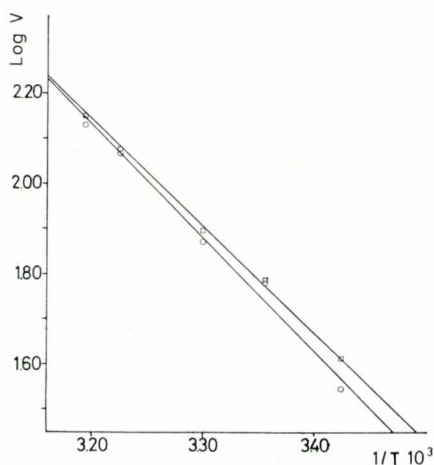


FIG. 4. — REPRESENTACIÓ D'ARRHENIUS.

El logaritme de la velocitat és representat enfront de l'invers de la temperatura d'assaig. El resultat per a l'enzim cru és representat pels cercles, i per a l'enzim de la fracció particulada, pels quadrats. Les rectes representades són les de regressió lineal per la sèrie de punts corresponents.

d'acord amb l'equació d'Arrhenius multiplicada per un factor dóna l'energia d'activació³ per la reacció catalitzada per la glucogeno-sintetasa. En aquest cas resulta d'11 300 cal./Mol per al cru, i de 10 600 per a l'enzim de la fracció particulada. Aquestes determinacions són de caràcter orientatiu, podríem dir que hom calcula una energia d'activació aparent, per tal com cal tenir en compte la influència de la temperatura en cadascuna de les etapes de formació i descomposició del complex enzim-substrat.

Un estudi de l'estabilitat de l'enzim amb el temps, fou fet col·locant les fonts enzimàtiques amb mercaptoetanol i sense a -20° C i a 4° C. També comprovarem que l'enzim a 18° C perdía el 75 % de la seva activitat a les 12 hores i el total de l'activitat a les 24 hores (fig. 5). L'enzim congelat a -20° C amb mercaptoetanol perd tota la seva activitat pel sol fet de la congelació i descongelació, i hi ha una coagulació o floculació de la pro-

teïna. D'altra banda és interessant de remarcar el gran increment d'activitat mesurada en defecte de glucosa-6-P quan la preparació és conservada a 4°C amb mercaptoetanol durant 24 hores,⁴ fet que ha estat motiu d'una llarga sèrie d'experiències, per tal com amb les bases de les interconversions enzimàtiques reguladores de la glucogeno-sintetasa, via fosforilització i desfosforilització, és difícil d'explicar el control de l'activitat pel funcionament d'aquests mecanismes a 4°C .

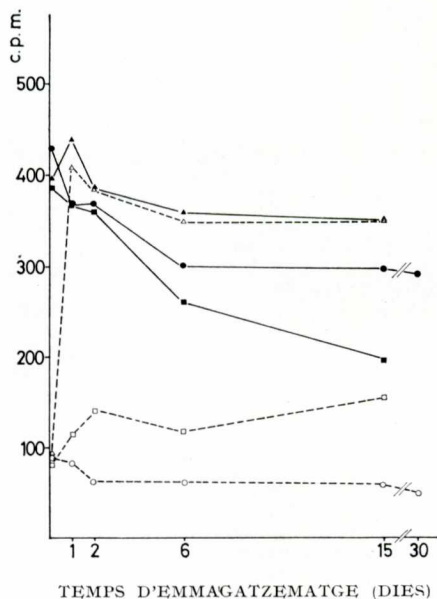


FIG. 5. — CONSERVACIÓ DE L'ACTIVITAT AMB EL TEMPS D'EMMAGATZEMATGE.

L'activitat de l'enzim és representada en c.p.m. amb els dies de permanència en les condicions següents: ● congelat a -20°C , ■ mantingut a 4°C sense mercaptoetanol, ▲ mantingut a 4°C en presència de 50 mM mercaptoetanol. La ratlla contínua representa l'activitat en presència de glucosa-6-P, i la discontínua en defecte de l'activador.

El fet que aquest augment d'activitat mesurada en defecte de glucosa-6-P es perdés quasi absolutament en ultracentrifugar la preparació preincubada a 4°C i la recuperació d'aquesta activitat en afegir el sobrenedant de l'ultracentrifuga,⁵ tant si era conservat a 4°C com si era posat al bany maria 5 minuts, ens va fer pensar en l'existència d'un factor activant de natura no proteica que no sedimentava a $100\,000 \times g$.

Després observàrem que aquest factor era eliminat també per filtració de l'homogenat amb Sephadex G-25, que reté les partícules de baix pes molecular, identificant, així, una mica més la classe de la molècula factor activant.

D'altra banda, l'addició d'EDTA al sobrenedant fa desaparèixer una part de l'activació que aquest produïa, la qual cosa concorda amb el fet que l'EDTA fa reversible l'efecte activant del Mg afegit a qualsevol classe

de font enzimàtica glucogeno-sintetasa (fig. 6). Tot això indicaria el Mg com a probable factor activant del sobrenedant, bé que sense possibilitat reguladora per variació dels seus nivells.

Preparació	Relació
	$\frac{- \text{G-6-P}}{+ \text{G-6-P}}$
Cru	0.05
Cru preincubat a 4° C	0.70
Cru preincubat a 30° C	0.70
100.000 × g F.P. en amortidor	0.12
100.000 × g F.P. en sobrenedant	
Cru preincubat filtrat per Sephadex G-25	0.15
100.000 × g F.P. en sobrenedant +G-6-PDH	0.18

FIG. 6. — RELACIÓ D'ACTIVITATS PER A DIFERENTS PREPARACIONS. La relació d'activitat en defecte de glucosa-6-P respecte a l'activitat total ha estat calculada per a cadascuna de les preparacions que hi són indicades; els valors que hi figuren han estat calculats sobre el blanc.

Per això pensarem en la possibilitat de la formació de glucosa-6-P en l'homogenat amb la preincubació a 4° C, la qual cosa produiria un augment de l'activitat mesurada en defecte de glucosa-6-P que no seria sinó un artefacte, que introduiríem en posar l'homogenat amb glucosa-6-P a la barreja d'assaig.

Les determinacions de glucosa-6-P que han estat obtingudes al llarg de la preincubació a 4° C i també a 30° C, ens indiquen un augment de nivell de glucosa-6-P paral·lel a l'augment d'activitat mesurada en defecte de glucosa-6-P (fig. 7).

A més, hem pogut observar que el sobrenedant de 100 000 × g. perd la capacitat activadora si és preincubat a 30° C durant 15 minuts amb glucosa-6-P deshidrogenasa i NADP abans d'ésser utilitzat com a medi de resuspensió del sediment de 100 000 × g.

Sembla, doncs, que en el sobrenedant de $100\,000 \times g$. hi ha lògicament el Mg i, si l'enzim ha estat prèviament preincubat, un nivell de glucosa-6-P superior al nivell basal en trombòcits. Com ja hem dit, tots dos metabòlits són activadors per la glucogeno-sintetasa. De tota manera,

FIG. 7. — FORMACIÓ DE GLUCOSA-6-P AMB LA PRE-INCUBACIÓ

L'activitat de l'enzim en c.p.m. és representada enfront del temps de preincubació, així com els nivells de glucosa-6-P, a cadascun dels temps indicats. La preparació era un enzim cru (sobrenedant de $10.000 \times g$). La ratlla contínua representa l'activitat de glucosa-6-P, i la discontínua, en defecte de l'activador; els cercles, l'activitat enzimàtica, i els quadrats, el nivell de glucosa-6-P.

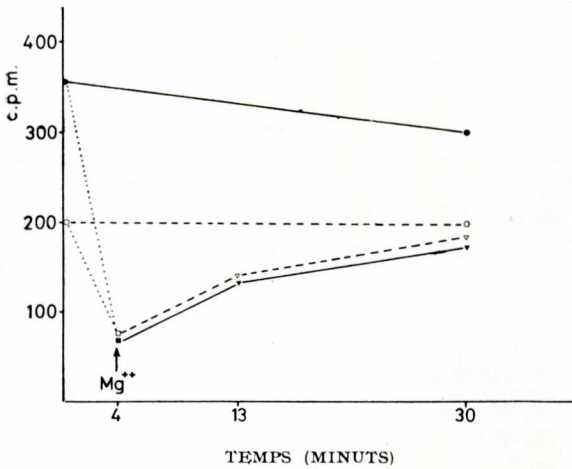
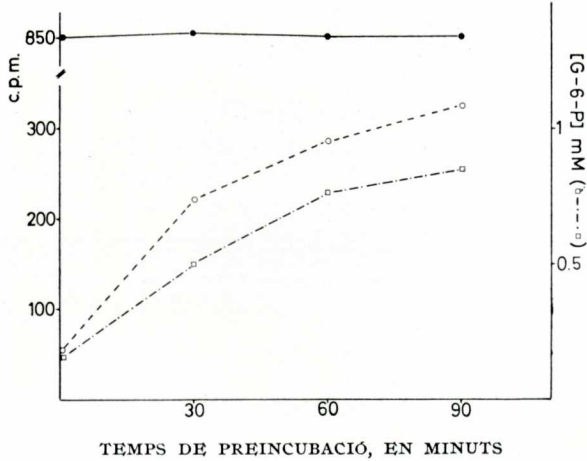


FIG. 8. — REACTIVACIÓ DE L'ENZIM PER MAGNESI.

L'activitat de l'enzim és representada durant l'experiment. El puntejat representa la caiguda de l'activitat per l'acció de l'UREA en un enzim cru (sobrenedant de $10.000 \times g$). Els triangles representen la recuperació de l'activitat després d'afegir-hi Mg^{++} fins a una concentració de 20 mM. Els cercles representen el control durant l'experiment de l'activitat de l'enzim sense ésser desactivat.

hem assajat altres agents per tal d'identificar-los com a factors activants; entre ells podem citar el Ca, el Mn, el PO_4 i el SO_4 , però cap d'ells no sembla el del sobrenedant, puix que els nivells d'activació que donen no són comparables als assolits per aquest.

Així, en les nostres condicions experimentals, semblaria possible l'existència d'una regulació per als nivells de glucosa-6-P, on l'activació seria modificada pel canvi que el Mg produiria en l'estructura enzimàtica i les seves constants cinètiques, fet constatat en altres teixits i que serà motiu de pròximes experiències en el nostre laboratori per a analitzar-ho en trombòcits.

Per a finalitzar podem dir que alguns experiments previs han estat fets per evidenciar l'acció directa del Mg sobre l'estructura proteica de l'enzim. Així, hem vist com l'ió divalent és capaç de fer recuperar l'activitat àdhuc a 4° C en una preparació que l'havia perduda totalment per tractament amb urea 6M a pH 8,2¹⁰ (fig. 8).

Tenim interès a fer una sèrie d'experiments sobre aquesta base per tal de comprovar si l'enzim respon realment al model de diverses subunitats proteiques amb un requeriment de Mg per a mantenir una estructura amb activitat glucogeno-sintetasa.

DISCUSSIÓ

El nostre treball corrobora algunes indicacions ja fetes per altres autors,¹³ en el sentit que la síntesi de glucogen en plaquetes es fa via UDP-glucosa mitjançant l'enzim glucogeno-sintetasa.

D'altra banda, hem determinat per a aquest enzim una sèrie de paràmetres que no difereixen dels de l'enzim d'altres òrgans d'humans i d'altres espècies animals,⁶ si no és en el nivell d'activitat específica de l'enzim.

Cal remarcar que hem constatat la presència de dues formes enzimàtiques tal com havia estat descrit per a l'enzim de múscul o de fetge⁴ en un principi, malgrat que altres cèl·lules sanguínies, com és ara els leucòcits polimorfonuclears, presenten una sola forma enzimàtica de glucogeno-sintetasa.⁷

La presència de factors activants en l'homogenat pot donar lloc a algunes idees sobre la regulació de l'enzim, sobretot quan entre aquests factors és determinada majoritàriament la glucosa-6-P, la qual pensem que pot col·laborar, juntament amb les interconversions entre les dues formes, a la regulació del glucogen en aquestes cèl·lules.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBERT, J. L., i ROSELL I PÉREZ, M. — «Rev. Esp. Fisiología», 26, 139 (1970).
2. ALGRANATI, I. D., i CABIB, E. — «J. Biol. Chem.», 237, 1007 (1962).
3. DIXON, M., i WEBB, E. C. — «Enzymes», 2nd. ed. Ac. Press, New York (1964).
4. ROSELL I PÉREZ, M., VILLAR I PALASÍ, C., i LARNER, J. — «Biochem.», 1, 763 (1962).
5. ROSELL I PÉREZ, M., i VILLAR I PALASÍ, V. — «Rev. Esp. Fisiología», 20, 4 (1964).
6. ROSELL I PÉREZ, M., i LARNER, J. — «Biochem.», 1, 769 (1962).
7. ROSELL I PÉREZ, M., i ESMANN, V. — «Acta Chem. Scand.», 19, 679 (1965).
8. SCOTT, R. B. — «Blood», 30, 3 (1967).
9. SEIFTER, S., i altres. — «Arch. Biochem.», 25, 191 (1950).
10. STADTMAN, E. R. — «Advances in Enzyme Regulation», 8, 99 (1970).
11. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K., i LARNER, J. — «Anal. Biochem.», 25 (1968).
12. TRAUT, R. R., i LIPMAN, F. — «J. Biol. Chem.», 238, 1213 (1963).
13. VAINER, H., i WATTIAUX, R. — «Nature», 217 (1968).