

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT DE BARCELONA

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

DANIEL CIFUENTES BUIRA

Barcelona, maig de 2006

Programa de Doctorat de Biotecnologia
Bienni 2000-2002

B. INTRODUCCIÓ GENERAL

INTRODUCCIÓ GENERAL

En l'entramat metabòlic cel·lular, milers de substrats estan interconnectats mitjançant reaccions bioquímiques. Tot i que aquest alt grau de connexió podria dur cap a la difusió dels substrats en múltiples direccions, a la pràctica els fluxos metabòlics es canalitzen a través de vies metabòliques concretes. El coneixement profund dels mecanismes que permeten definir i aïllar els mòduls funcionals i asseguren el seu correcte funcionament sota les diverses condicions fisiològiques, és una peça clau per entendre l'organització cel·lular i l'homeòstasi metabòlica dels organismes.

L'estructura global de les vies metabòliques està altament ramificada (figura 1) però el flux metabòlic tendeix a la linealitat gràcies a la modulació de l'activitat dels enzims implicats. Els mecanismes de control de l'activitat enzimàtica han estat extensament descrits i estudiats des dels inicis de la Bioquímica com a disciplina de recerca científica. Els més destacats són la modificació postraduccional, la interacció amb efectors, el canvi de localització cel·lular i el control dels nivells de l'enzim mitjançant l'expressió i la proteòlisi.

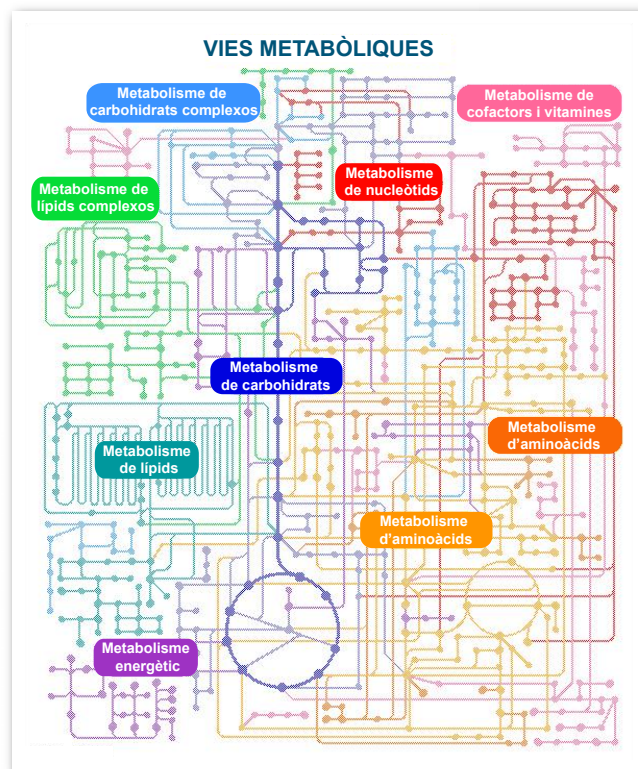


Figura 1. Representació esquemàtica de la xarxa de vies metabòliques cel·lulars.

Les modificacions postraduccional consisteixen en la unió covalent de grups funcionals que alteren les propietats físico-químiques i estructurals de l'enzim. La diversitat en els grups funcionals (acetat, fosfat, metil, diversos lípids i carbohidrats, o polipèptids com al ubiquitina) genera una varietat de funcions. D'entre totes les modificacions covalents, la més comuna en els

eucariotes com a mecanisme de regulació és la fosforilació i s'estén no només a enzims sinó també a proteïnes estructurals i de senyalització. Consisteix en la unió covalent d'un grup fosfat (PO_3^{2-}) a la cadena lateral d'un residu de serina, treonina o tirosina. Malgrat que l'efecte d'un grup tan petit sobre l'estructura global de la proteïna pot semblar mínim, en realitat altera el perfil d'hidrofobicitat i el balanç de càrregues de la proteïna. Aquestes modificacions generen canvis conformacionals en l'estructura de la proteïna que poden tenir un efecte directe sobre l'afinitat amb els substrats o ser responsables de l'aparició o l'emascament de dominis d'interacció amb d'altres proteïnes.

La regulació per interacció amb efectors no provoca cap alteració permanent en la proteïna però sí indueix una modulació reversible de l'activitat de la proteïna. Quan la molècula efectora interacciona amb un lloc d'unió diferent del centre actiu, aleshores parlem de regulació al·lostèrica. El terme al·lostèric prové del grec *allos*, "altre" i *stereos*, "forma" i fa incís en que el domini regulador i el domini catalític estan en regions separades de la proteïna. La natura dels efectors és molt diversa i poden ser des de ions com el Ca^{2+} que regula la proteïna calmodulina fins a proteïnes que modulen l'activitat d'altres proteïnes com el cas de la interacció entre els factors de transcripció i l'RNA polimerasa.

En les vies metabòliques principals la regulació de l'activitat de certs enzims que catalitzen etapes irreversibles exerceix un control sobre el flux més fort que la disponibilitat de substrat. Mitjançant les interaccions al·lostèriques, aquests enzims integren la informació d'altres vies metabòliques i la seva activitat s'adapta a les necessitats metabòliques de la cèl·lula.

Quan abandonem la visió reduccionista i abordem el metabolisme des d'un punt de vista integratiu, es pot observar un altre mecanisme de regulació que consisteix en la compartimentalització dels processos cel·lulars. Tradicionalment aquest terme s'aplica quan dues etapes o vies metabòliques es duen a terme en compartiments subcel·lulars diferents, com per exemple el metabolisme dels àcids grassos: la seva síntesi té lloc en el citosol i la seva oxidació es produeix al mitocondri. Així aquesta estratègia permet utilitzar el mateix metabòlit en processos diferents.

Però la compartimentalització no té perquè només fer referència a la separació física en orgànuls subcel·lulars. Darrerament ha augmentat l'interès per l'estudi del control del metabolisme mitjançant la modulació de l'expressió gènica. L'aparició de noves tècniques de transcriptòmica com els xips de DNA han permès analitzar a escala genòmica l'impacte dels perfils d'expressió gènica sobre el metabolisme. De seguida es va veure que hi ha un nou mecanisme de compartimentalització, aquest cop no en l'espai sinó en el temps. La regulació temporal de l'expressió de determinats enzims dirigeix el flux cap a una via metabòlica o una d'alternativa en funció de la disponibilitat de nutrients.

El cas paradigmàtic és el creixement dels llevats en la diauxia, que consisteix en l'adaptació del creixement en condicions anaeròbiques vers la respiració aeròbica. Els llevats obtenen l'energia preferentment de la fermentació de la glucosa a etanol. Quan el sucre fermentable s'esgota, l'etanol que s'ha produït durant la fermentació es converteix en la nova font de carboni i això exigeix una profunda reprogramació de les vies del metabolisme de carbohidrats.

La reorganització del metabolisme es produeix gràcies a la inducció i la repressió de l'expressió d'enzims de les vies afectades. Així doncs, s'observa com durant la diauxia els llevats inhibeixen l'expressió de gens glucolítics i expressen els enzims necessaris per dirigir i metabolitzar l'etanol en el cicle de Krebs i acumular la glucosa sintetitzada per gluconeogènesi en dipòsits de glicogen i trehalosa. (figura 2a)

Però que ocorre en les etapes comunes als processos de fermentació i respiració aeròbica? Les dades de genòmica i transcriptòmica suggereixen que aquestes etapes estan catalitzades per més d'un isoenzim però que cada isoforma està dedicada a un procés en concret.

L'existència d'isoenzims que catalitzen la mateixa reacció podria ser un mecanisme de resposta per evitar l'efecte de mutacions deletèries o per amplificar el flux metabòlic en un moment de necessitat, però també la regulació diferencial dels isoenzims permetria decidir el destí d'intermediaris metabòlics comuns a diferents processos cel·lulars (figura 2b). És el cas dels isoenzims hexoquinasa. Durant el creixement fermentatiu amb glucosa els

llevats expressen l'Hxk2 i la glucosa que fosforila es destina a la glucòlisi. Però quan la cèl·lula entra en diauxia, es reprimeix l'Hxk2 i es comença a expressar Hxk1 i Glk1 (Rodríguez et al., 2001) i altres enzims necessaris per metabolitzar l'etanol i acumular reserves energètiques (figura 2c). Hxk2 i Glk1 sintetitzen G6P com l'Hxk2 però ara aquesta G6P es destinarà a la síntesi de glicogen i trehalosa. Així l'Hxk1 s'expressa de manera inversa a l'Hxk2 però es coexpressa amb la glicogen sintasa (GSY2) (Farkas et al., 1991).

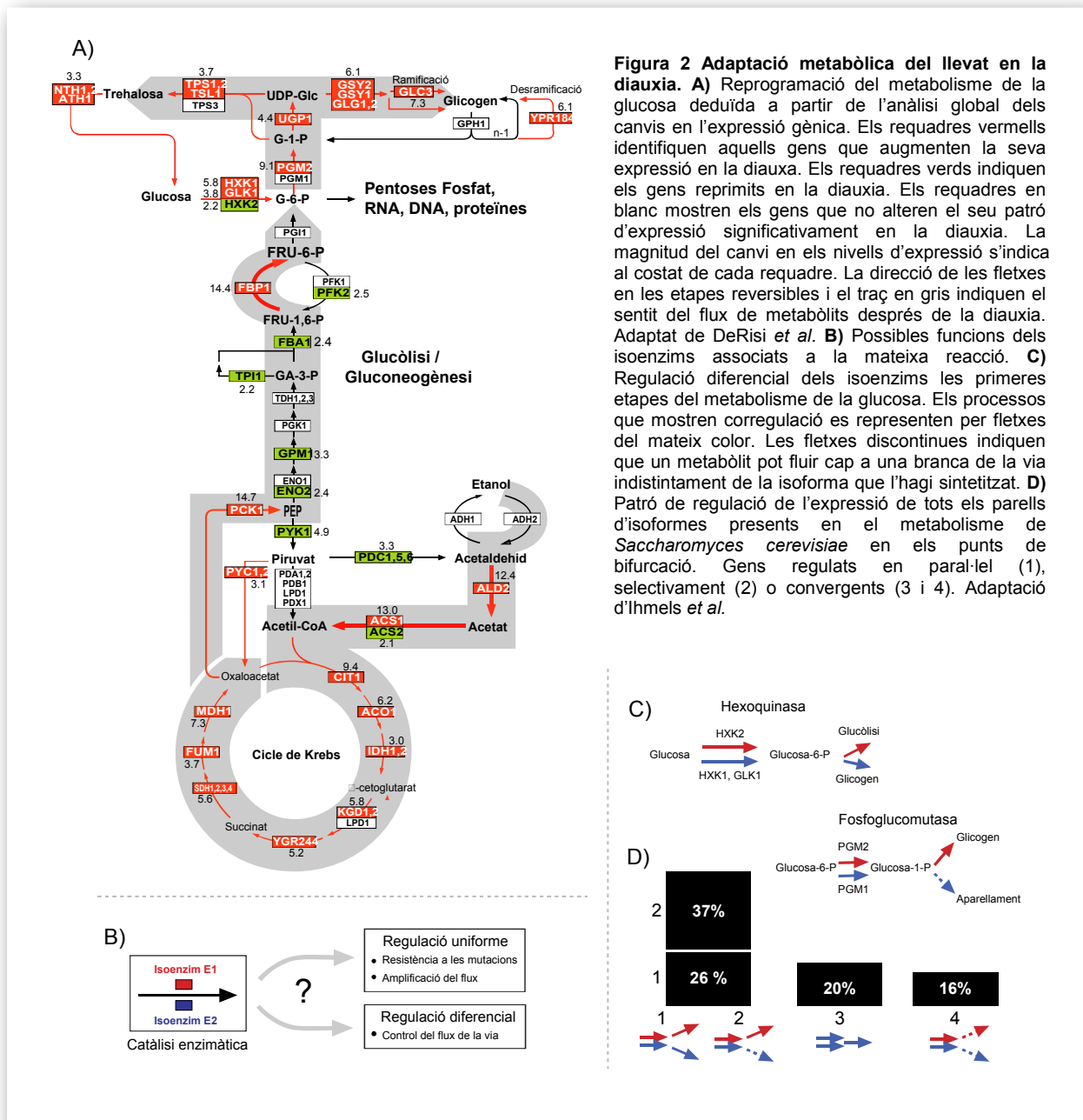


Figura 2 Adaptació metabòlica del llevat en la diauxia. A) Reprogramació del metabolisme de la glucosa deduïda a partir de l'anàlisi global dels canvis en l'expressió gènica. Els requadres vermells identifiquen aquells gens que augmenten la seva expressió en la diauxia. Els requadres verds indiquen els gens reprimits en la diauxia. Els requadres blancs mostren els gens que no alteren el seu patró d'expressió significativament en la diauxia. La magnitud del canvi en els nivells d'expressió s'indica al costat de cada requadre. La direcció de les fletxes en les etapes reversibles i el traç en gris indiquen el sentit del flux de metabòlits després de la diauxia. Adaptat de DeRisi *et al.* B) Possibles funcions dels isoenzims associats a la mateixa reacció. C) Regulació diferencial dels isoenzims les primeres etapes del metabolisme de la glucosa. Els processos que mostren corregulació es representen per fletxes del mateix color. Les fletxes discontinues indiquen que un metabòlit pot fluir cap a una branca de la via indistintament de la isoforma que l'hagi sintetitzat. D) Patró de regulació de l'expressió de tots els parells d'isoformes presents en el metabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* en els punts de bifurcació. Gens regulats en paral·lel (1), selectivament (2) o convergents (3 i 4). Adaptació d'Ihmels *et al.*

Les isoformes associades a la mateixa reacció es poden classificar en quatre categories (figura 2d) en funció del patró de regulació transcripcional i el destí del flux metabòlic:

- ▶ **Paral·lel:** cada isoforma està connectada amb una etapa posterior diferent que utilitza com a substrat el producte del respectiu isoenzim.
- ▶ **Selectiva:** només un dels isoenzims mostra una correlació significativa amb l'etapa següent
- ▶ **Convergent:** ambdues isoformes es correlacionen amb el mateix procés cel·lular.

L'associació de l'expressió d'almenys una de les isoformes a un procés cel·lular concret permet linearitzar el flux en punts on la via metabòlica es bifurca. En realitat el metabolisme perd ramificacions perquè els isoenzims no s'expressen tots al mateix temps ni els processos cel·lulars als quals estan associats ocorren simultàniament. L'esquema del metabolisme de la figura 1 representa totes les vies metabòliques possibles en una cèl·lula, però gràcies a la inducció i repressió d'isoformes, el flux metabòlic en un moment donat es canalitza només per unes vies en concret. La compartimentalització temporal del metabolisme evita la dispersió i dissipació de substrats per tota la xarxa metabòlica.

En eucariotes superiors el fet de catalitzar una mateixa etapa amb més d'un isoenzim permet un altre tipus de compartimentalització. En aquests organismes la regulació metabòlica es veu extraordinàriament afavorida per l'existència d'òrgans amb funcions metabòliques específiques. Així l'expressió de cada isoforma queda restringida a un teixit en concret i cada etapa es pot regular en funció de les necessitats fisiològiques de cada teixit.

Tots aquests mecanismes ens mostren com la coordinació de la intricada xarxa de reaccions metabòliques s'aconsegueix gràcies a la regulació de l'activitat enzimàtica a diferents nivells de complexitat: a nivell d'enzim mitjançant modificacions postraduccionals i al·lostèriques, a nivell cel·lular per

la compartimentalització de substrats i enzims i finalment a nivell d'organisme degut al patró d'expressió de les isoformes específiques de teixit.

Però malgrat que entenem les delicades interaccions que permeten la integració del metabolisme, desconeixem per quin camí han evolucionat fins a assolir la seva configuració actual. L'estudi de les vies metabòliques a la llum de l'evolució ens afegeix una nova dimensió des d'on podem esbrinar els patrons que configuren els mòduls metabòlics i entendre així l'arrel de la seva organització. De la comprensió de l'organització subjacent en les vies metabòliques pot sorgir el coneixement per corregir les seves alteracions.

El metabolisme del glicogen és un bon model per estudiar els diferents nivells de regulació que hem exposat perquè tots ells es donen en els principals enzims de la via. Aquest control tan estricte és necessari per coordinar la síntesi de glicogen amb el metabolisme energètic, doncs comparteix un dels precursors, la G6P, amb altres vies metabòliques com la glucòlisi o la via de les pentoses fosfat i l'acumulació de glucosa en forma de glicogen no pot anar en detriment de l'obtenció immediata d'energia.

La majoria d'éssers vius utilitzen els carbohidrats com a base del seu metabolisme energètic i emmagatzemen els excedents en forma de glicogen excepte les plantes, que acumulen midó. El glicogen és un polisacàrid de reserva de carbohidrats i per tant és una font d'energia. És un polímer de glucosa d'estructura ramificada format per monòmers de glucosa units per enllaços O-glicosídics α -1,4 i per enllaços α -1,6 en els punts de bifurcació. Aquesta estructura macromolecular és una solució per acumular glucosa sense augmentar significativament la pressió osmòtica intracel·lular

Els àcids grassos contenen més energia que el glicogen perquè estan més reduïts i els dipòsits de greixos pesen menys perquè no es solvaten amb molècules d'aigua. Aleshores, perquè els organismes acumulen l'excés de combustible i energia en forma de glicogen enlloc de convertir-ho tot a àcids grassos? Doncs perquè la ruptura controlada del glicogen proporciona energia més ràpidament que els lípids gràcies a que la seva estructura fractal (Melendez et al., 1999; Melendez et al., 1997) ofereix múltiples llocs d'atac als

enzims que el degraden. Un altre avantatge en front dels lípids és que la glucosa alliberada pot subministrar energia fins i tot en condicions anaeròbies per la via fermentativa.

A part d'energia el glicogen també és una font de glucosa que en els eucariotes superiors serveix per tamponar la concentració de glucosa en sang, que s'ha de mantenir dins d'uns marges molt estrets perquè és el principal combustible de teixits com el cervell.

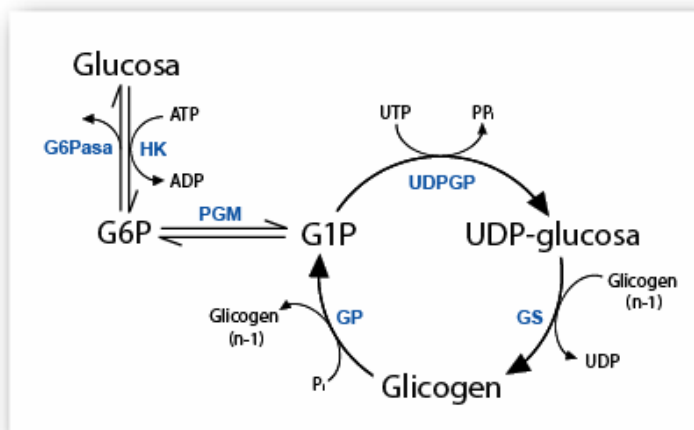


Figura 3. Metabolisme del glicogen. Via de síntesi de glicogen a partir de glucosa. En blau s'indiquen els enzims que catalitzen cada etapa. La reacció de conversió de G6P a glucosa es específica de fetge i ronyó.

Tots els organismes sintetitzen glicogen seguint les etapes bàsiques descrites en la figura 3. El punt clau on divergeix el metabolisme del glicogen de procarïotes i eucariotes és en l'ús ADP-glucosa o UDP-glucosa com a donador de grups glucosil i en els mecanismes de regulació. Per la rellevància que té en aquest projecte i per haver assolit el major grau de complexitat en la seva regulació a continuació es descriu la regulació de la via en fetge i múscul de vertebrats.

L'esquema descriptiu de la via del metabolisme del glicogen ens dona poca més informació que la connectivitat entre els substrats en les diferents etapes. Només quan situem la via metabòlica en el seu context, a nivell cel·lular i d'organisme, es posa de relleu el seu paper en l'homeòstasi de la glucosa.

La síntesi de glicogen requereix l'acció concertada de diversos enzims. La primera etapa del metabolisme del glicogen és la conversió de la G6P en G1P. Ambdós intermediaris es troben en equilibri per l'acció catalítica de la fosfoglucomutasa (PGM). Tot seguit la G1P es transforma a UDP-glucosa per

mitjà de la UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGP). La hidròlisi del pirofosfat generat en aquesta etapa proporciona l'energia necessària per a la síntesi de glicogen. La UDP-glucosa és un dels substrats de la glicogen sintasa (GS). L'altre substrat és el glicogen mateix, doncs la GS no fa res més que allargar una molècula de glicogen preexistent addicionant monòmers de glucosa per enllaços α -1,4.

L'enzim encarregat de crear l'encebador de glicogen a partir de monòmers de glucosa és la glicogenina. El dímer d'aquest enzim és capaç d'autoglicosilar-se en un residu de tirosina i sintetitzar a partir d'UDP-Glc una cadena curta d'uns vuit residus de glucosa (Lomako et al., 2004; Mu & Roach, 1998; Mu et al., 1997).

La GS allarga aquesta cadena però és l'enzim ramificant (BE) qui converteix un polímer lineal de glucosa en una estructura ramificada de característiques fractals. El BE trenca un enllaç glicosídic α -1,4, seccionant un fragment de la cadena d'oligosacàrid i el torna a unir a la cadena principal per un enllaç α -1,6, creant així un punt de ramificació.

La glicogen fosforilasa (GP) s'encarrega de la degradació del glicogen mitjançant la ruptura fosforolítica del polisacàrid i alliberant G1P. Tanmateix només pot degradar trams de cadena lineal amb enllaços α -1,4 i quan s'acosta a un lloc de ramificació requereix l'acció de l'enzim desramificant (DBE) per prosseguir. Aquest enzim transfereix primer transfereix la branca a la molècula de glicogen per un enllaç α -1,4 i després allibera en forma de glucosa el residu unit per un enllaç α -1,6.

L'etapa limitant en la via de glicogen és la reacció catalitzada per la GS, per això aquest enzim està regulat per fosforilació de múltiples llocs que redueixen l'activitat de l'enzim, i efectors al·lostèrics com la G6P que l'activen o com l'ATP, l'UDP i fosfat que l'inhibeixen.

La fosforilació redueix l'activitat de la GS perquè implica una disminució de la V_{\max} i una menor afinitat per l'activador G6P i els substrat UDP-Glc (Roach et al., 1976; Salavert et al., 1979).

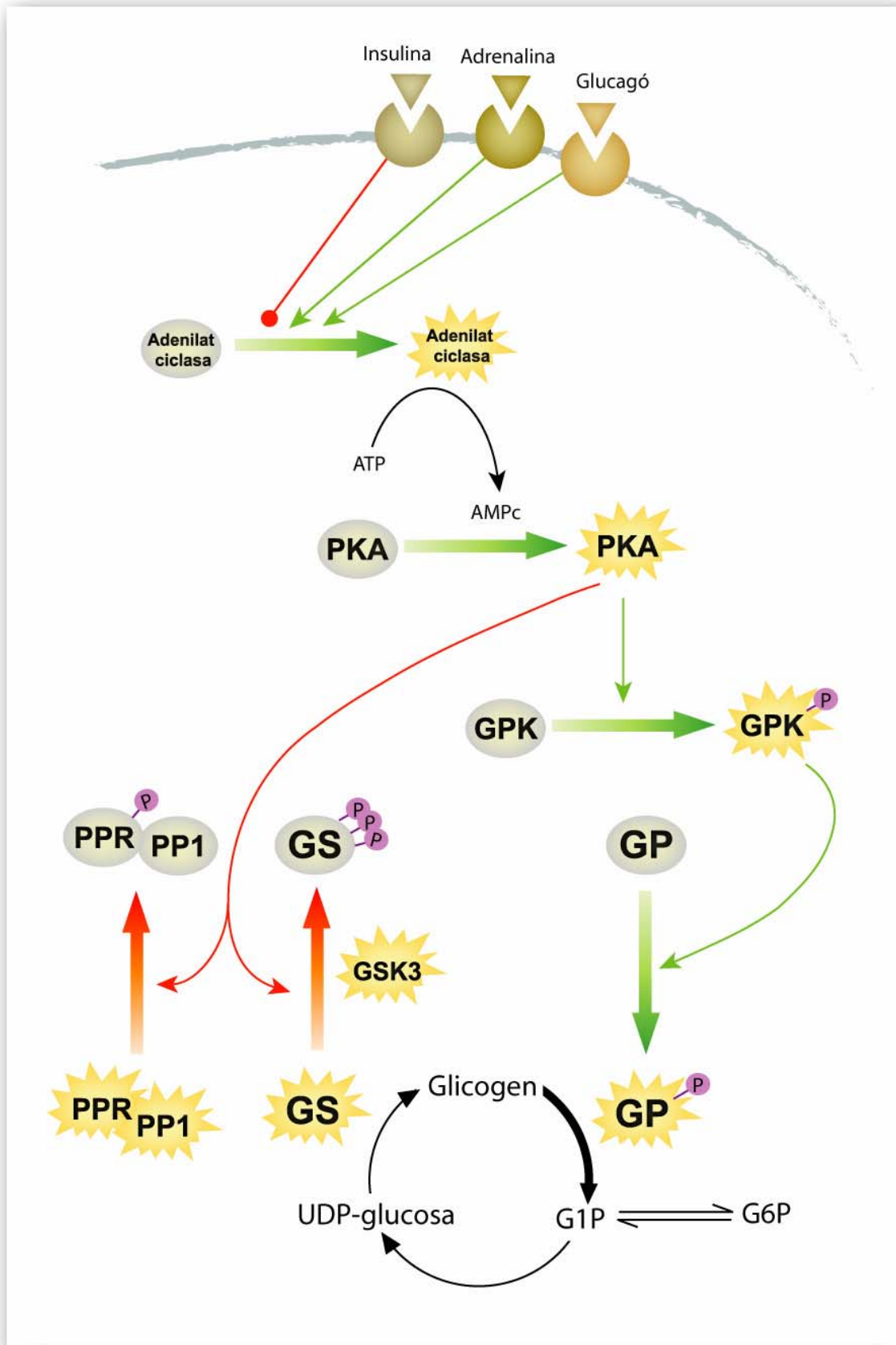


Figura 4 Activació hormonal de la degradació de glicogen. L'adrenalina i el glucagó activen la cascada de senyalització que culmina en la fosforilació de GP i GS, activant i inhibint els enzims respectivament. L'acció de la insulina bloqueja aquest efecte.

Múltiples serina/treonina proteïna quinases fosforilen la GS *in vitro*, com la PKA (Cohen&Hardie, 1991), fosforilasa quinasa (Roach et al., 1978), GSK-3, Calmodulina quinasa II (Woodgett et al., 1982), PKC, Caseïna quinasa (Ahmad et al., 1984; Itarte & Huang, 1979), AMPK (Roach, 1990) DIRK (Skurat & Dietrich, 2004) i PAS quinasa (Wilson et al., 2005) entre d'altres.

Tanmateix només algunes d'aquestes proteïna quinases és versemblant que tingui un efecte fisiològic sobre el control de l'activitat de la GS. Fins al moment s'han identificat nou centres fosforilables *in vivo* en la GS muscular i set en la GS hepàtica, distribuïts als extrems N- i C-terminals (Roach, 1990; Skurat et al., 1994).

La GP també es regula per l'acció de les quinases però només té un sol lloc de fosforilació i a diferència de la GS, la forma fosforilada fixa l'enzim en l'estat activat (Sprang et al., 1988). Aquestes fosforilacions del enzims del metabolisme del glicogen són el resultat final de la ruta de senyalització estimulada per hormones, com l'adrenalina i el glucagó (figura 4).

La desfosforilació de la GS contribueix a la seva activació. Aquest procés el catalitzen la proteïna fosfatasa 1 (PP1) en múscul i la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) en fetge (Farkas et al., 1988; Ingebritsen & Cohen, 1983; Ingebritsen et al., 1983). Tant la GS com la GP són substrats de les fosfatases però amb efectes contraris. Mentre que la GS s'activa per desfosforilació, la GP s'inactiva quan perd el seu únic fosfat.

La PP1 i la PP2A són les subunitats catalítiques, el control i la especificitat de la seva acció recau sobre les proteïnes reguladores (Newgard et al., 2000). Les que tenen més importància en el metabolisme del glicogen son la G_M , majoritària en múscul, G_L , majoritària en fetge i la PTG que és ubiqüa (Printen et al., 1997). D'aquestes tres subunitats, la G_L és qui té la major capacitat d'activar la glicogen sintasa hepàtica i d'induir la síntesi de glicogen en el fetge (Gasa et al., 2000; Yang et al., 2002). La funció de les subunitats reguladores és posar en contacte a la proteïna fosfatasa amb el seu substrat. Per això s'ancoren al glicogen amb un domini central d'unió a glicogen (Wu et al., 1998) i per l'extrem N-terminal interaccionen amb la PP1 a través de la

seqüència consens (K/R)VxF i per l'extrem C-terminal uneixen el seu substrat, ja sigui GS, GP o GPK (Armstrong et al., 1998; Fong et al., 2000). El fet de que tots els substrats interaccionen amb el mateix domini de la proteïna reguladora imprimeix un caràcter seqüencial al procés d'inducció de la síntesi de glicogen (figura 5), doncs primer ha d'inactivar la GP per desfosforilació abans de poder unir-se a la GS per activar-la (Green et al., 2004; Hampson & Agius, 2005)

El mecanisme d'activació no covalent de la GS és l'activació al·lostèrica mediada per G6P. S'ha descrit la regió de la proteïna responsable de l'efecte al·lostèric induït per G6P (Hanashiro & Roach, 2002). Aquest domini és molt ric en arginines i la comparació amb l'estructura de la GS de *Pyrococcus abyssi* indica que es localitza en una zona en la regió frontissa entre els dominis N- i C-terminal i molt propera al centre catalític (Horcajada et al., 2006).

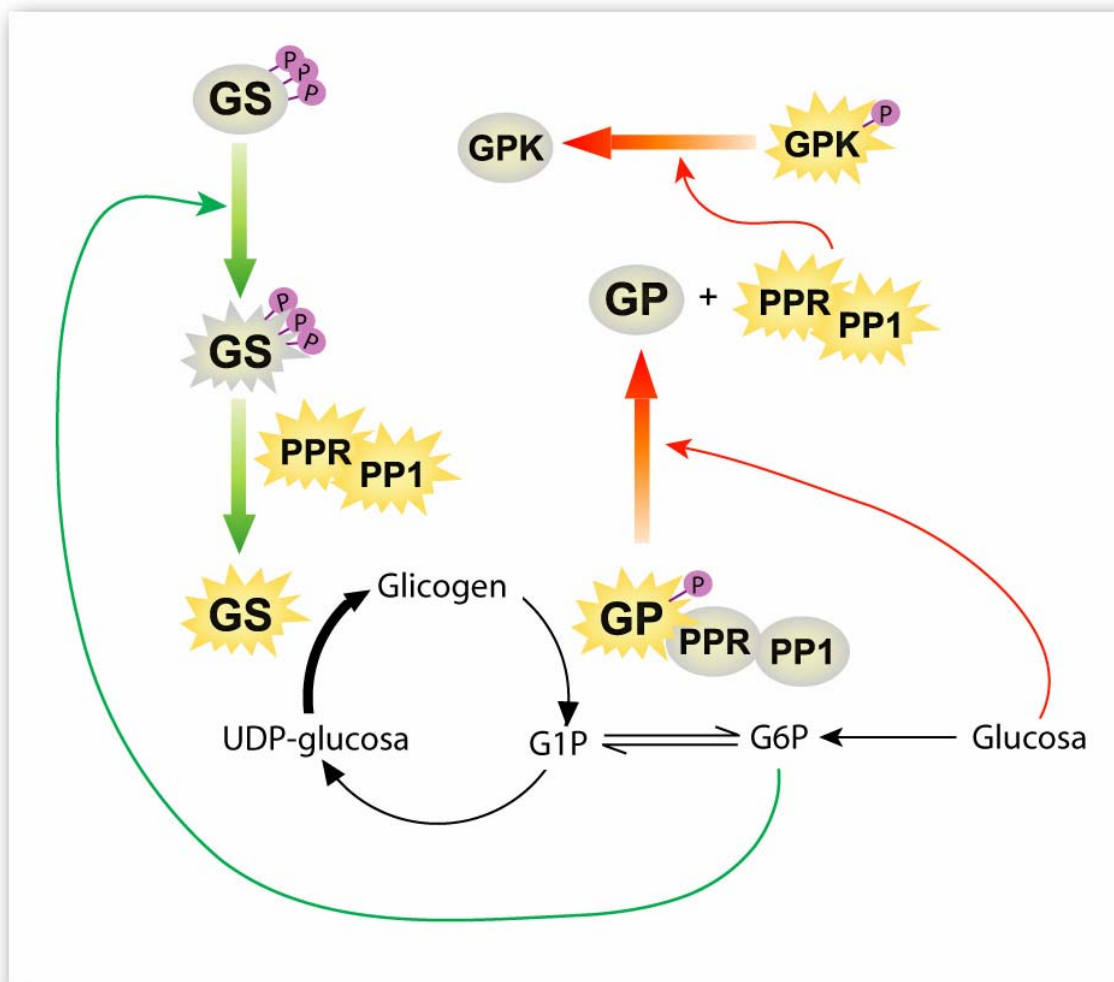


Figura 5 Activació de la síntesi de glicogen. L'increment de la metabolització de glucosa induïx la inactivació de la GP i l'activació al·lostèrica de la GS, que es complementa amb la seva activació covalent per desfosforilació

Aquesta situació suggereix que la G6P indueix uns canvis conformacionals en l'estructura de la proteïna que conduirien a l'activació al·lostèrica de l'enzim. Paral·lelament, també s'ha observat que la GS present en extractes cel·lulars és més susceptible a la desfosforilació després d'una incubació *in vitro* amb G6P (Villar-Palasi, 1991). Probablement el mateix canvi conformacional induït per la G6P converteix a la GS en millor substrat per als complexos de PP1 i la corresponent subunitat reguladora (Villar-Palasi & Guinovart, 1997).

La fosforilació de la glucosa permet retenir el metabòlit dins de la cèl·lula, perquè es converteix en una molècula amb càrrega negativa i no pot travessar la membrana citoplasmàtica. Una vegada la glucosa es fosforila a G6P, aquest metabòlit és substrat directe de quatre enzims diferents que pertanyen a vies metabòliques distintes i per tant representa el primer punt de bifurcació del metabolisme de la glucosa (figura 6).

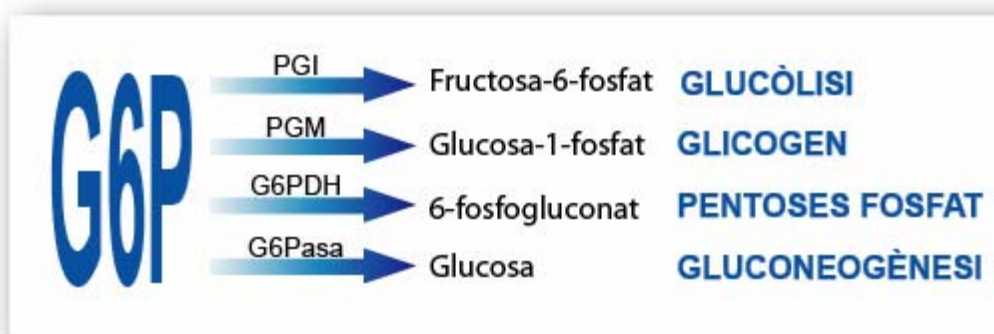


Figura 6 Metabolisme de la G6P. La G6P és substrat de quatre enzims que es troben a la capçalera de quatre vies metabòliques diferents.

A partir d'aquesta etapa, el flux de glucosa es pot destinar a funcions tan diferents com la síntesi de nucleòtids per la via de les pentoses fosfat, l'obtenció d'energia via glucòlisi o l'acumulació dels seus excedent en forma de glicogen. Fins i tot es pot reconvertir un altre cop en glucosa i tornar al sistema circulatori, una funció que està reservada a teixits com el fetge i el ronyó.

El flux simultani de G6P a través de les quatre vies metabòliques possibles suposa una pèrdua d'eficiència en l'aprofitament de la glucosa. És per això que han evolucionat mecanismes de regulació enzimàtica que van

més enllà del control de disponibilitat de substrat, com per exemple la regulació al·lostèrica de la GS per G6P, on aquest metabòlit és alhora un precursor i una molècula senyalitzadora.

Quan pugem un esglaió més en el nivell de complexitat en els mecanismes de control observarem com la compartimentalització també afecta la regulació del metabolisme del glicogen. En aquesta via trobem dos tipus de compartimentalització molt ben descrits. El primer consisteix en el redireccionament del flux metabòlic en funció de l'isoenzim que catalitzi la reacció i el segon es fonamenta en l'especialització metabòlica dels teixits.

Múltiples etapes en el procés de síntesi de glicogen estan catalitzades per enzims amb més d'una isoforma, començant des del principi amb l'entrada de glucosa. La glucosa entra a través de transportadors passius que en funció de la seva afinitat per la glucosa i la seva regulació hormonal controlaran la disponibilitat de glucosa en les etapes següents (Uldry & Thorens, 2004). El GLUT4 és el transportador d'alta afinitat per glucosa específic de múscul però només és actiu quan la insulina estimula la seva translocació des de les vesícules intracel·lulars cap a la membrana plasmàtica. En canvi la baixa afinitat però alta capacitat del GLUT2 per la glucosa permet que la internalització del glúcid en els teixits on s'expressa (fetge, intestí i cèl·lules β del pàncreas) sigui pràcticament dependent de la glucèmia i que la concentració de glucosa intracel·lular s'equilibri amb la de la sang.

La primera etapa obligada de la glucòlisi està catalitzada per l'hexoquinasa, de la qual existeixen quatre isoformes diferents que fosforilen la glucosa a G6P. L'activitat de les HK1 i HK2 es veu molt influenciada per la retroinhibició per G6P, la HK3 s'inhibeix per excés de glucosa (Wilson, 1997; Wilson, 2003) i la darrera isoforma, la HK4 o glucoquinasa (GK), té baixa afinitat per la glucosa (Cardenas, 1997) i la seva activitat està a més a més inhibida per la proteïna reguladora (GKRP) (van Schaftingen et al., 1997). Totes aquestes característiques impliquen que la capacitat de síntesi de G6P en condicions fisiològiques varia molt segons l'isoenzim present. Això per si sol ja determina de forma directa la concentració de G6P disponible per activar

al·lostèricament la GS o per entrar a la via de la glucòlisi. Però resultats recents suggereixen que hi ha una relació directe entre l'isoforma d'hexoquinasa que fosforila la glucosa i el destí de la G6P. Aparentment l'acció catalítica de la GK en el fetge es correlaciona amb la síntesi de glicogen, mentre que la resta d'isoformes dirigiria el flux cap a la glucòlisi i les pentoses fosfat (Gomis et al., 2002; Seoane et al., 1999; Seoane et al., 1996). Tanmateix calen més estudis per esbrinar si aquests resultats indiquen una compartimentalització de la G6P en localitzacions independents i aïllades o són fruit de la canalització d'un reservori únic de G6P cap a les diferents vies a través de complexos enzimàtics (Agius et al., 2002; Ureta & Radojkovic, 1987).

Les característiques del reservori de G6P tenen un efecte directe sobre l'activitat de les dues isoformes de glicogen sintasa. La isoforma muscular (MGS) s'expressa virtualment en tots els teixits excepte en el fetge, on s'expressa exclusivament la isoforma hepàtica (LGS). Els darrers estudis del nostre laboratori indiquen que la GK és més eficient que l'HK1 a l'hora de sintetitzar G6P capaç d'activar al·lostèricament l'LGS, però en canvi no s'observen diferències en la capacitat d'activar a l'MGS (Gomis et al., 2002).

La regulació de la degradació de glicogen per part de la glicogen fosforilasa també pot variar segons l'isoenzim de GP que catalitzi aquesta etapa. Existeixen tres isoformes de la GP, totes s'inhibeixen per glucosa però els isoenzims de múscul i cervell a més s'activen al·lostèricament per AMP. Aquest control addicional fa que l'activitat de la GP en aquests teixits sigui més sensible a l'estat energètic de la cèl·lula.

Les subtils diferències en les característiques bioquímiques de les isoformes dels principals enzims del metabolisme del glicogen per si soles ja condicionen el flux metabòlic però a més s'ha d'afegir la regulació per la localització subcel·lular en funció de la concentració de glucosa (figura 8). Un cop més, des de l'inici de la via observem com el comportament varia entre les isoformes.

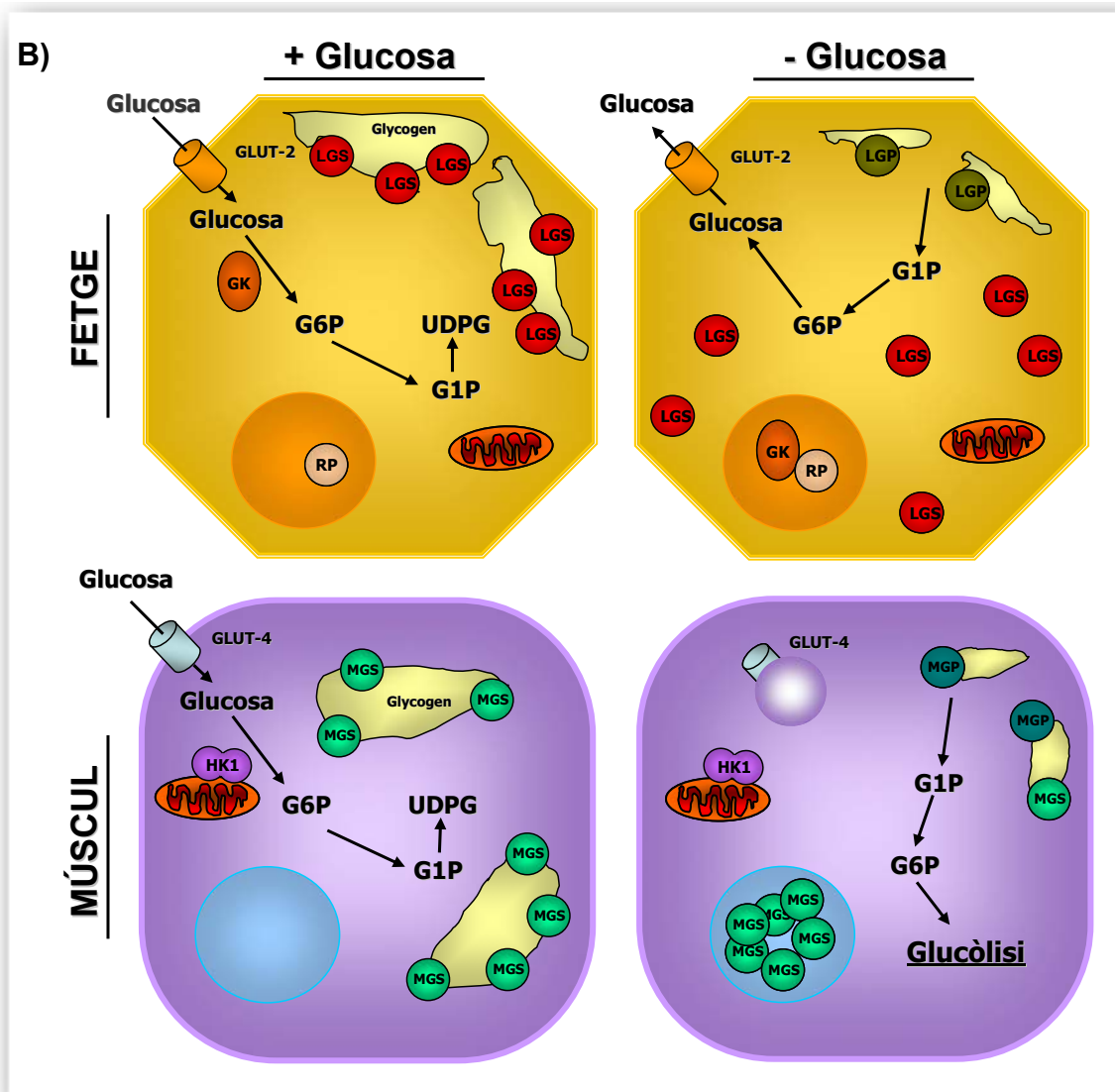
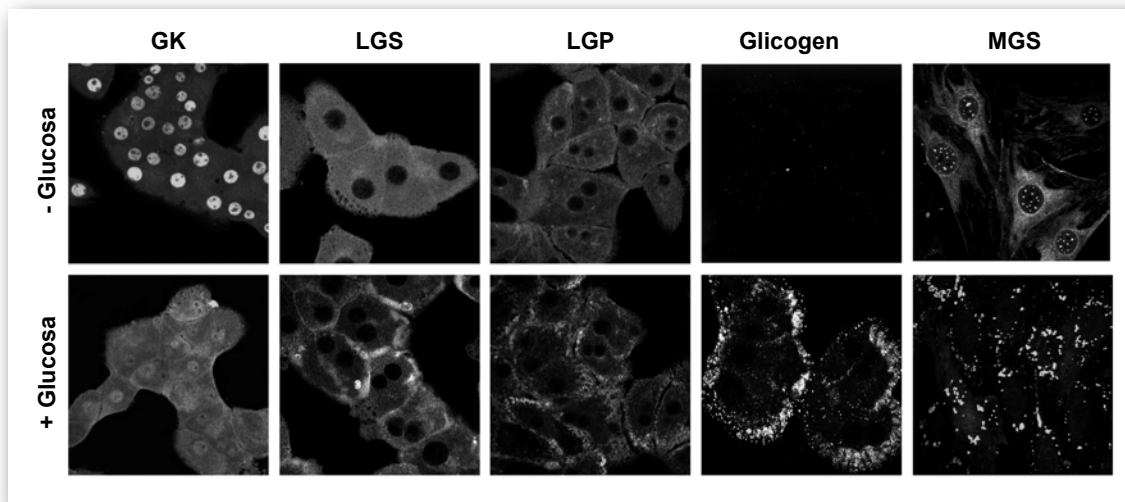


Figura 8. A) Translocació dels enzims del metabolisme del glicogen. Les imatges corresponen a la localització de l'enzim corresponent en hepatòcits aïllats de rata, excepte per a l'MGS, que són cèl·lules COS-1 **B) Diferències en la síntesi de glicogen en fetge i múscul.** Comparteixen les reaccions bioquímiques però varien en la localització dels isoenzims i l'aprofitament de la glucosa.

El primer exemple de canvis en la distribució subcel·lular és el GLUT4, que s'emmagatzema de forma inactiva en vesícules intracel·lulars i en resposta a insulina transloca cap a la membrana plasmàtica (Kanzaki & Pessin, 2003; Watson & Pessin, 2006). Els altres transportadors de glucosa romanen units a la membrana cel·lular, tot i que modificacions postraduccionals de glicosilació poden alterar el recanvi de l'enzim (Ohtsubo et al., 2005).

En la següent etapa de la via la l'HK1 i GK també mantenen localitzacions disperses. En absència de glucosa la GK es troba a retinguda a l'interior del nucli per la seva proteïna reguladora GKR (de la Iglesia et al., 1999). Quan augmenta de nou la concentració de glucosa es desfà el complex proteic i la GK transloca i es dispersa pel citosol. En canvi l'HK1 i l'HK2 s'uneixen a la membrana externa del mitocondri per un domini hidrofòbic de l'extrem N-terminal (Sui & Wilson, 1997; Wilson, 2003). Estudis recents aporten indicis de que possiblement una fracció de la GK i la GKR es localitzi en el mitocondri (Arden et al., 2006; Danial et al., 2003), però en cap cas ho faria pel mateix mecanisme que les hexoquinases de tipus 1 i 2 perquè li manca el domini hidrofòbic.

La GS també té canvis en la localització subcel·lular. La isoforma hepàtica en resposta a glucosa transloca des d'una posició difusa pel citosol vers la perifèria cel·lular (Garcia-Rocha et al., 2001) (Fernandez-Novell et al., 1992a; Fernandez-Novell et al., 1992b). Aquestes dades concorden amb els indicis de que la síntesi de glicogen s'inicia en la zona propera a la membrana cel·lular (Fernandez-Novell et al., 2002).

La isoforma muscular mostra un patró de translocació diferent. En cèl·lules deplecionades de glicogen l'MGS s'agrega en el nucli (Ferrer et al., 1997) en uns corpuscles que són positius per marcadors de maduració de l'RNA com la proteïna p80/coïlina (Cid et al., 2005). Aquestes agregacions nuclears es desfan quan augmenta la concentració de glucosa i l'MGS transloca cap al citosol on té lloc la síntesi i el creixement dels grànuls de glicogen.

Calen estudis en profunditat per esbrinar si la localització nuclear de la GK o l'MGS en absència de glucosa és un mecanisme d'emmagatzemar l'enzim quan la seva activitat no és necessària o si responen a una necessitat per sensar l'estat metabòlic de la cèl·lula i reorganitzar l'expressió gènica en conseqüència.

El darrer grau de complexitat és la compartimentalització del metabolisme en òrgans especialitats. El perfil metabòlic dels teixits i la seva interrelació contribueixen a mantenir l'homeòstasi en l'organisme.

El substrat preferent del cervell és la glucosa, i només en casos de dejuni prolongat consumeix cossos cetònics i per això necessita un subministre continu de glucosa, que pot arribar a representar fins al 60% del consum total de glucosa de l'organisme. Gran part d'aquesta energia es destina a mantenir el potencial de membrana necessari per als impulsos nerviosos.

El múscul acumula la tercera part de les reserves de glicogen de l'organisme però les mobilitza només per al consum propi en els moments d'alta demanda energètica durant la contracció muscular. En aquesta situació el cicle de Krebs no pot assimilar l'increment del flux glucolític en múscul i en conseqüència augmenta la producció de lactat i el deriva cap al fetge. En el fetge el lactat es converteix a G6P per gluconeogènesi i gràcies a l'acció de la G6Pasa s'allibera al torrent sanguini en forma de glucosa i torna a estar disponible per al múscul i altres teixits (figura 9). Aquest intercanvi metabòlic entre teixits es coneix amb el nom de cicle de Cori. Quan el múscul està en repòs i treballa en condicions aeròbiques, obté la seva energia a partir dels àcids grassos.

El fetge és el pivot metabòlic de l'organisme perquè s'encarrega d'aportar nutrients al cervell i al múscul, controla els nivells de glucosa en sang mitjançant el metabolisme del glicogen i la gluconeogènesi, en situacions d'abundància deriva l'excés de nutrients cap a la síntesi i esterificació d'àcids grassos que posteriorment distribuirà a tot l'organisme o en les etapes de dejuni els degrada a cossos cetònics, i a més centralitza la producció d'urea.

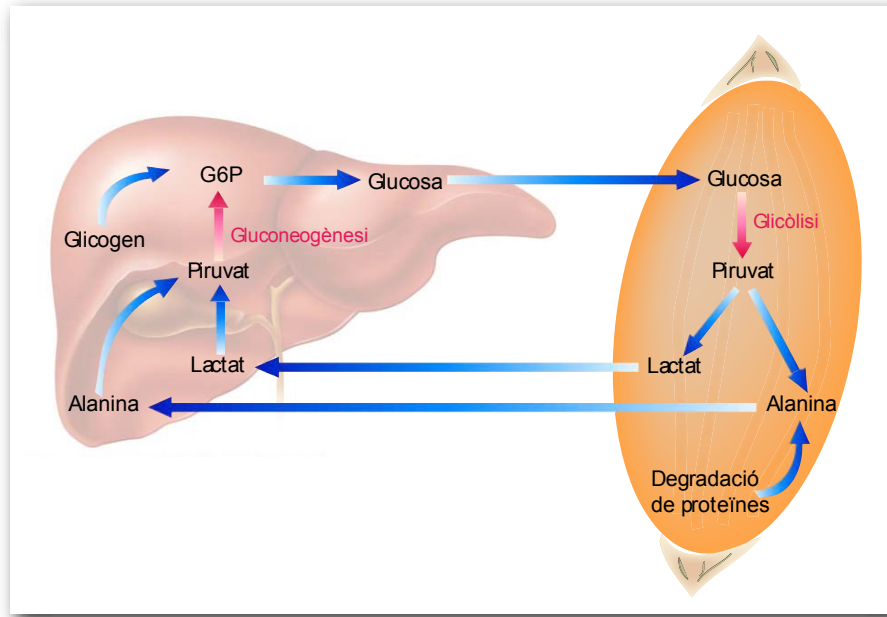


Figura 9. Cicle de Cori. L'excés de lactat produït en el múscul durant l'exercici es deriva cap al fetsge on es transforma a glucosa en la gluconeogènesi

Des del punt de vista global de l'organisme el fetsge no acumula tant glicogen com el múscul, però tanmateix és l'òrgan que sintetitza més glicogen per gram de teixit. La majoria de nutrients que s'absorbeixen en l'intestí passen primer a través del fetsge, que capta les dues terceres parts de la glucosa. La glucosa es metabolitza a G6P i la major part s'inverteix en la síntesi de glicogen. La G6P restant es destina cap a la glucòlisi i cap a la via de les pentoses fosfat per a produir NADPH necessari en el processos biosintètics. El fetsge també té un paper important en la eliminació de nitrogen perquè és capaç de degradar alguns aminoàcids i el grup amino transformar-lo en la urea que es secreta per l'orina. Els cetoàcids resultants són juntament amb els lípids, la font d'energia del fetsge, que reserva la glucosa per al cervell.

En períodes de dejuni el fetsge continua coordinant l'homeòstasi dels nutrients. El glucagó secretat en resposta a una baixada dels nivells de glucèmia actua sobre el teixit adipós induint la hidròlisi de triacilglicerols i en el fetsge estimula la gluconeogènesi i la degradació del glicogen que s'ha sintetitzat durant la fase absortiva (figura 10).

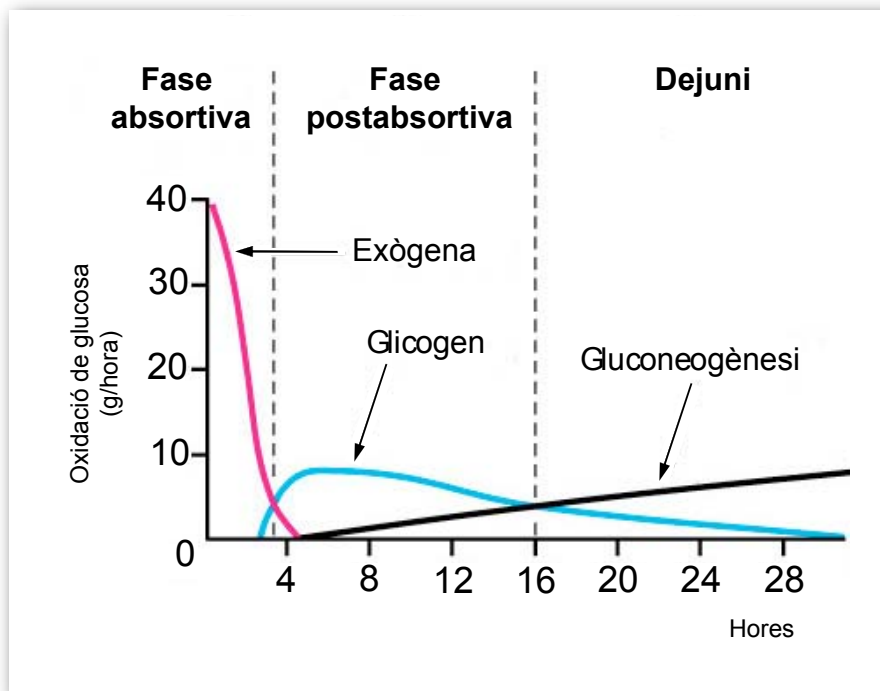


Figura 10. Metabolització de la glucosa i el seu origen. Durant la fase absorbiva la glucosa procedent dels aliments s'oxida i els excedents s'emmagatzemen en forma de glicogen. Precisament de la glicogenolisi i de la gluconeogènesi sorgeix la glucosa que es consumeix en les etapes de dejuni.

En dejunis més prolongats el fetge i el múscul consumeixen àcids grassos per satisfer les seves necessitats energètiques i reserven la glucosa per nodrir el cervell. Aquestes adaptacions estan dirigides a no excedir la demanda de glucosa per no abusar de la síntesi de glucosa per gluconeogènesi a partir de substrats derivats de la degradació de proteïnes que poden comprometre la viabilitat de l'organisme.

Al llarg d'aquesta introducció hem vist com el metabolisme estableix mecanismes de regulació a través de l'acció directe sobre els enzims i per mitjà de la distribució de funcions metabòliques en diferents dominis subcel·lulars i teixits especialitzats. Restava però, aprofundir en els estudis sobre la regulació metabòlica per entendre el seu fonament molecular i esbrinar les adaptacions evolutives que han configurat el metabolisme del glicogen en mamífers.