

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

CAPÍTOL 3
CO-EVOLUCIÓ DELS ENZIMS DEL
METABOLISME DEL GLICOGEN

I això és el que ara faig jo. Arrenglero tot d'elements inconnexos i basteixo hipòtesis. Però n'haig de bastir una colla, i moltes són tan absurdes que em faria vergonya d'esmentar-les.

Quart dia, vespres.

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

CAPÍTOL 3. CO-EVOLUCIÓ DELS ENZIMS DEL METABOLISME DEL GLICOGEN

3.1 INTRODUCCIÓ

En els capítols anteriors d'aquesta memòria hem analitzat l'evolució de les isoformes de glicogen sintasa i com aquestes es relacionen amb distintes isoformes d'hexoquinasa. Al comparar aquests enzims observem que comparteixen trets característics com la similitud dels patrons d'expressió o l'origen de les isoformes de vertebrats a partir d'un ancestre comú.

La combinació d'isoenzims que expressa cada teixit coincideix amb l'ús que fa de les reserves de glicogen. El múscul i el cervell expressen MGS en combinació amb HK2 i HK1 respectivament, i són un exemple de teixits que acumulen glicogen com a reserva pròpia d'energia. En canvi el fetge expressa LGS juntament amb la GK i el glicogen hepàtic és una reserva de glucosa per als altres teixits, doncs el fetge pot degradar el glicogen i alliberar de nou glucosa a la sang gràcies a que expressa la G6P fosfatasa (G6Pasa). Tot això suggereix que el paper del glicogen en un teixit concret es correlaciona amb la combinació de diferents isoenzims que expressa en cada etapa del metabolisme.

L'evolució de les hexoquinases segueix patrons similars als de les glicogen sintases. Els eucariotes mantenen varies còpies de l'enzim, amb un ampli ventall de característiques bioquímiques (K_M , inhibidors,...) (Brown et al., 1967; Gancedo et al., 1977; Jang et al., 1997; Kaji et al., 1961; Vinuela et al., 1963). En invertebrats observem que les isoformes han sorgit independentment en cada organisme perquè estan més relacionats amb els seus paràlegs que amb els seus ortòlegs.

Tanmateix quan arribem als vertebrats ocorre un fenomen de duplicació que genera els quatre tipus d'hexoquinasa de vertebrats, (HK1, HK2, HK3 i HK4 o també anomenada GK), a partir d'un mateix ancestre comú. De la

posició de la GK en l'arbre es pot inferir que aquest isoenzim apareix immediatament després de que la duplicació tingués lloc, i mostra a les HK1, HK2, i HK3 com a versions més modernes de l'enzim (figura 3.1) (Cardenas et al., 1998; Fothergill-Gilmore & Michels, 1993; Veiga-da-Cunha et al., 1996). Aquestes isoformes de vertebrats mostren una major similitud amb els seus ortòlegs que amb els respectius isoenzims.

Un cop s'ha produït la duplicació de l'ancestre comú de les hexoquinases de vertebrats, també succeeix un fenomen de fusió del domini bàsic de 50 kDa, comú a les hexoquinases d'invertebrats, que dona lloc a la configuració estructural actual de les HK1, HK2 i HK3. Aquest és l'origen que explica que les hexoquinases d'alta afinitat de vertebrats siguin unes proteïnes d'aproximadament 100 kDa, amb uns dominis N- i C-terminal similars amb un origen comú (Cardenas et al., 1998; Kogure et al., 1993; Printz et al., 1993). La GK de vertebrats en canvi, és l'única isoforma de vertebrats que escapa a la fusió de dominis i que manté l'estructura d'un sol domini de 50 kDa.

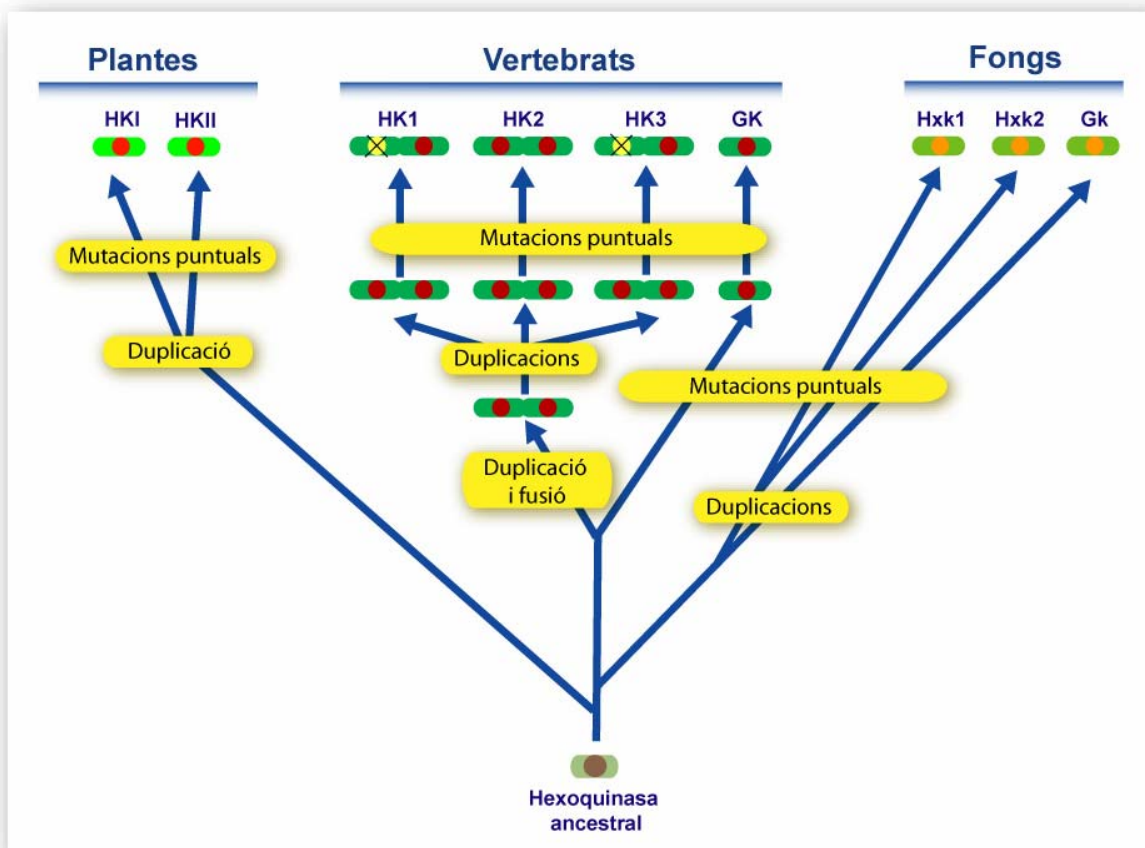


Figura 3.1 Filogenia de les hexoquinases. Representació que sumaritzava les relacions entre les hexoquinases eucariotes i mostra la duplicació i fusió de dominis. Per qüestions de claredat l'arbre no manté l'escala temporal. Adaptat de (Cardenas et al., 1998)

En aquest capítol analitzarem si les similituds en l'evolució de les glicogen sintases i les hexoquinases es poden extrapolar als altres enzims implicats en el metabolisme del glicogen, amb l'objectiu d'esbrinar els processos adaptatius que defineixen les funcions metabòliques dels teixits.

3.2 RESULTATS

3.2.1 Evolució de les Hexoquinases

3.2.1.1 Filogènia

Les relacions filogenètiques entre les hexoquinases eucariotes han estat l'objecte d'estudi de diversos autors (Bork et al., 1993; Cardenas et al., 1998). Nosaltres hem actualitzat aquests resultats aprofitant l'increment en el nombre de seqüències d'HK conegudes i combinant-les amb les noves dades estructurals, fent incís en tot allò que indiqués un fenomen de duplicació gènica a l'origen dels vertebrats.

Vam emprar el mateix procediment que vam seguir per establir la filogènia de la GS i vam recopilar una base de dades amb 91 seqüències de hexoquinases eucariotes. Aquestes seqüències pertanyien a organismes representatius de tots els grups eucariotes.

Aquest cop vam aprofitar la disponibilitat de les estructures resoltes d'hexoquinases (Aleshin et al., 1998; Kamata et al., 2004; Kuser et al., 2000; Mulichak et al., 1998) per a fer la filogènia a partir d'alineaments estructurals, molt més robusts perquè es basen en l'homologia dels elements de l'estructura. Per fer els alineaments estructurals només es tenen en compte aquells aminoàcids que es situen en posicions que formen part de regions de la proteïna amb una estructura conservada i definida entre les espècies comparades, i s'obvien els que estan en els girs o zones de la proteïna desestructurades.

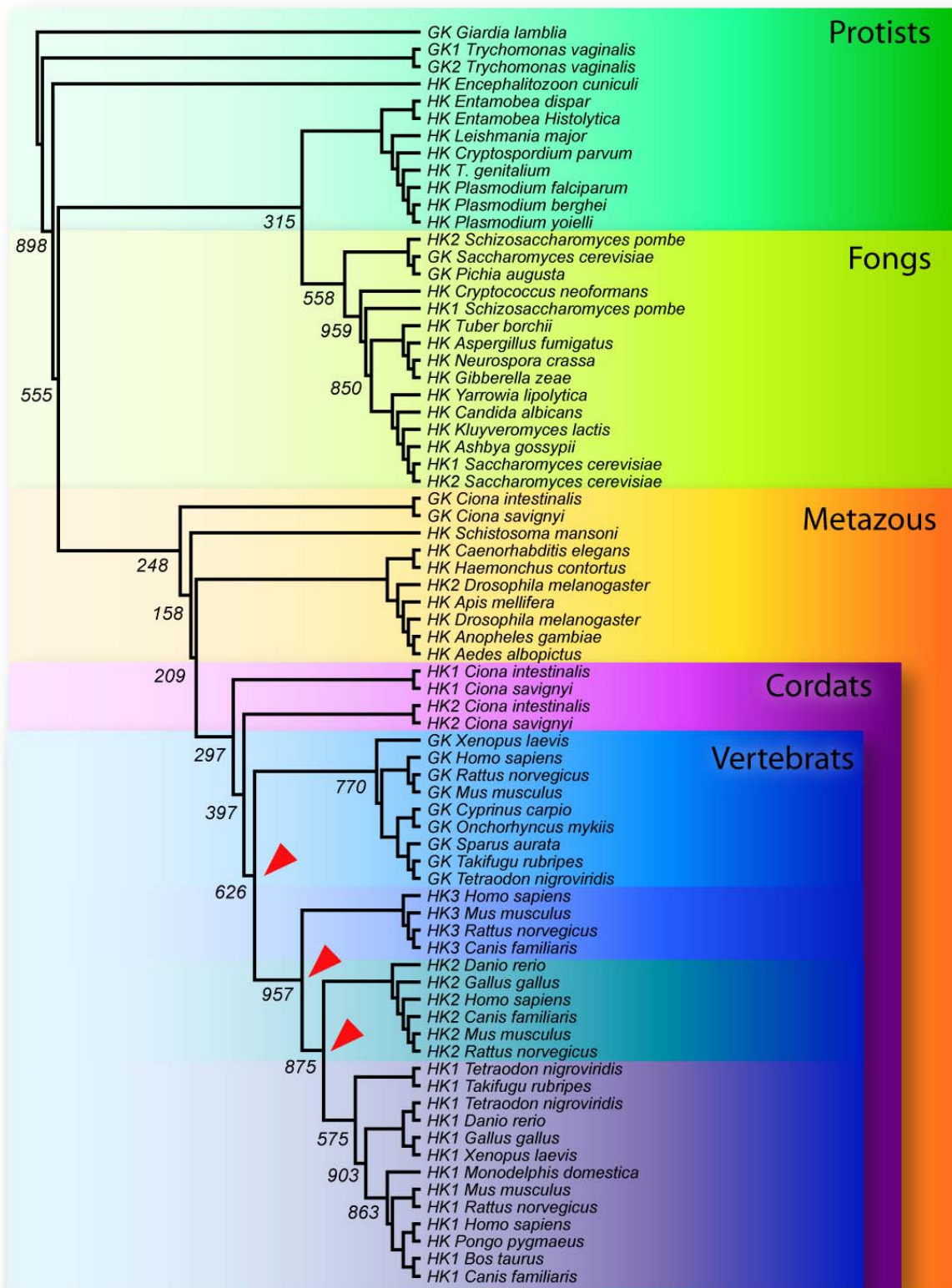


Figura 3.2 Filogènia de les hexoquinases eucariotes. Arbre filogenètic consens calculat aplicant el mètode de *Neighbor-joining*. En els nodes s'indiquen els valors de 1000 rèpliques de *bootstrap*. Les puntes de fletxa indiquen els tres fenòmens de duplicació que originen els quatre isoenzims de vertebrats.

Utilitzant la plataforma MSDFold (Krissinel & Henrick, 2004) vam obtenir l'alineament estructural de quatre de les estructures d'hexoquinases resoltes, (HxK2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Kuser et al., 2000), HK de *Schistosoma mansoni* (Mulichak et al., 1998), HK1 de rata (Mulichak et al., 1998) i la GK humana (Kamata et al., 2004). Després vam eliminar de l'alineament resultant tots aquells aminoàcids que no formen part d'elements d'estructura secundària. Aquest alineament va ser fixat com el perfil sobre el qual vam alinear la resta de les seqüències d'hexoquinases.

L'arbre filogenètic consens de les hexoquinases eucariotes basat en aquest alineament estructural (figura 3.2) i mostra amb més grau de detall la duplicació que ocorre en vertebrats. Així podem afirmar que a partir d'una sola isoforma específica d'un ancestre pre-vertebrat s'originen per successives rondes de duplicació els quatre isoenzims de vertebrats. Cal remarcar que la primera duplicació dona lloc a la GK de baixa afinitat per la glucosa i a l'ancestre comú de les hexoquinases d'alta afinitat.

3.2.1.2 Conservació estructural

Aquestes observacions filogenètiques es reforcen quan realitzem comparacions estructurals. El mateix solapament d'estructures (figura 3.3) que anteriorment hem utilitzat en els alineaments estructurals, ara ens mostra clarament com les hexoquinases de *S. cerevisiae*, *S. mansoni* i la GK humana encaixen sobre l'estructura del domini C-terminal de l'HK1 de rata.

També s'observa com aquest mateix domini adopta una estructura molt similar a la del seu propi domini N-terminal.

Això indica que les hexoquinases de vertebrats d'alt pes molecular evolucionen per duplicació i fusió gènica a partir d'un ancestre comú mentre que la GK reté característiques estructurals similars a les hexoquinases ancestrals. Aquest fet ja ha estat referit per altres autors a partir de l'alineament de seqüències d'ambdós dominis, N- i C-terminals, de les hexoquinases de vertebrats (Cardenas et al., 1998; Kogure et al., 1993; Printz et al., 1993).

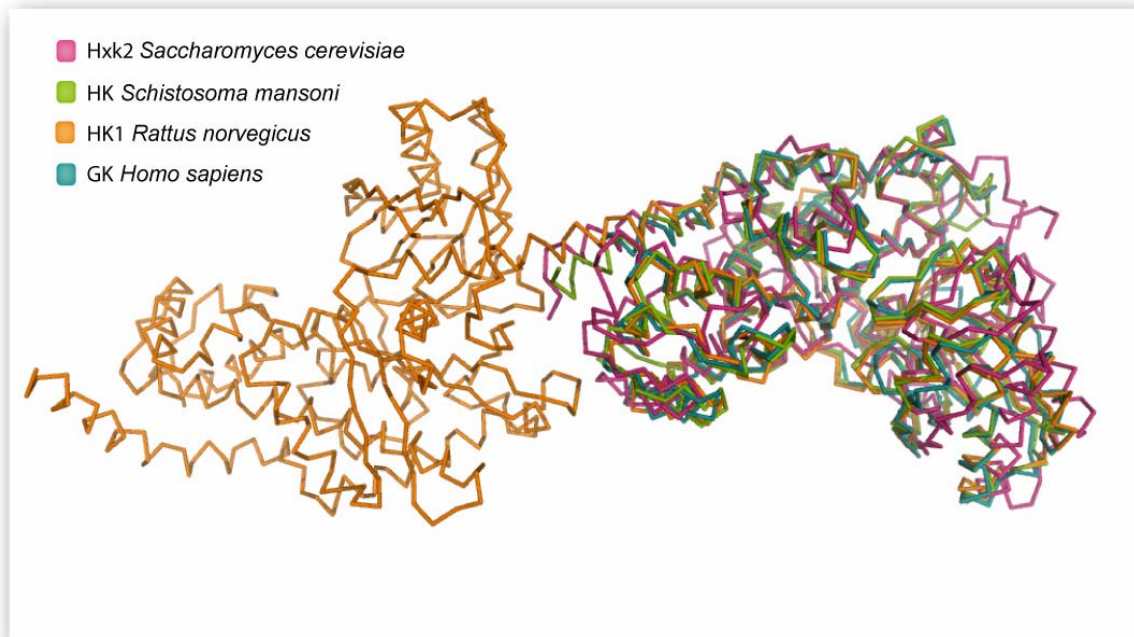


Figura 3.3 Solapament estructural de les hexoquinases. Les estructures cristal·logràfiques de quatre hexoquinases eucariotes representatives es sobreposen utilitzant el programa MSDFold. A l'esquerra de la imatge tenim el domini N-terminal de l'HK1 de rata.

3.2.1.3 Localització subcel·lular

L'increment en el tamany de les isoformes de vertebrats es correlaciona amb un canvi en la localització subcel·lular de les hexoquinases de tipus 1 i 2. Mentre que la GK és un enzim citosòlic com les hexoquinases de prevertebrats, HK1 i HK2 s'uneixen a la mitocòndria per mitjà d'un tram d'aminoàcids hidrofòbics que han adquirit a l'extrem més N-terminal de la proteïna i que s'inserta en la membrana externa d'aquesta organel·la. (Sui & Wilson, 1997). Per altra banda, estudis bioquímics previs (Aflalo & Azoulay, 1998) mostren que les hexoquinases de llevat no s'uneixen a la mitocòndria.

Per elucidar si aquesta localització subcel·lular és una novetat de les hexoquinases de vertebrats o ja la presenten algunes hexoquinases ancestrals, vàrem alinear l'extrem N-terminal de les hexoquinases eucariotes representatives, prenent les hexoquinases de llevat (ScHxk1, ScHxk2 i ScGik1) com a control d'enzims que no s'uneixen a l'organel·la.

En els primers deu residus, totes les hexoquinases de fongs i d'invertebrats analitzades, més la glucoquinasa de vertebrats, tenen un aminoàcid polar o amb càrrega, (figura 3.4) que són incompatibles amb un domini hidrofòbic transmembrana. Aquests resultats suggereixen que cap altre hexoquinasa, tret de les HK1 i HK2 de vertebrats, està unida a la membrana externa de la mitocòndria.

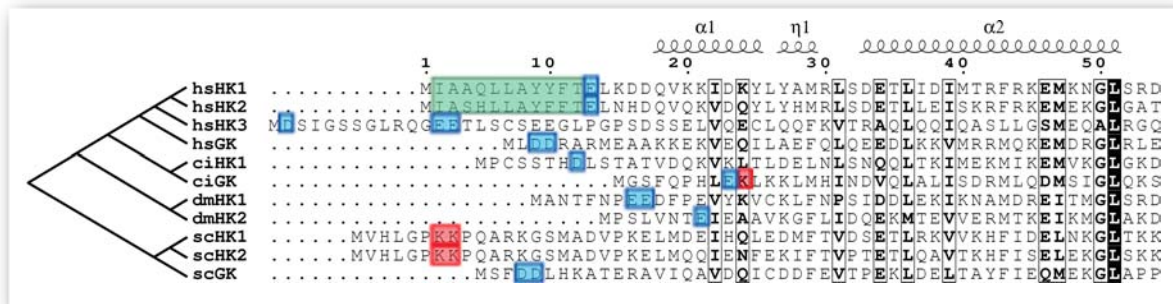


Figura 3.4 Extrem N-terminal de les hexoquinases. Alinament estructural de l'extrem N-terminal d'un conjunt representatiu d'hexoquinases d'*H. sapiens*, *C. intestinalis*, *D. melanogaster* i *S. cerevisiae*. En verd es ressalta el domini hidrofòbic d'unió a la mitocòndria, exclusiu de les hexoquinases de vertebrats HK1 i HK2. La resta d'hexoquinases tenen aminoàcids polars o carregats en aquesta posició, incompatibles amb un domini transmembrana. En blau es ressalten els aminoàcids carregats negativament i en vermell els positius. Els elements d'estructura secundària que es mostra corresponen a *HsHK1*.

Aquests fenòmens de duplicació, fusió i unió a la mitocòndria que hem descrit per a les hexoquinases de vertebrats concorden amb les dades bioquímiques obtingudes en el Capítol 2. Aquest resultat ens indiquen que una hexoquinasa ancestral, amb un sol domini d'uns 50 kDa, a l'arribar a vertebrats es duplica en quatre isoenzims. Les diferències més destacades d'aquestes isoformes són la seva afinitat per glucosa i la seva localització subcel·lular.

Des punt de vista de les dades bioquímiques i estructurals, les hexoquinases de vertebrats es segreguen en dos grups que coincideixen amb dues categories d'isoenzims. El primer grup inclou les HK1, HK2 i HK3 i es caracteritzen per la seva alta afinitat pel substrat però baix rendiment de producte degut a la inhibició per producte. Al segon grup pertany la GK, que té una baixa afinitat per la glucosa però té una gran capacitat de produir G6P perquè no es retroinhibeix.

3.2.2 Evolució dels transportadors de glucosa

Les cèl·lules utilitzen D-glucosa com a font de carboni i energia i per això necessiten proteïnes transportadores especialitzades per transportar la glucosa des de la sang a través de la membrana plasmàtica. En humans s'han descrit quatre transportadors de glucosa (taula 3.1) que internalitzen aquest glúcid per transport passiu a favor de gradient, amb una afinitat moderada en el rang de mM (Joost et al., 2002; Uldry & Thorens, 2004; Walmsley et al., 1998).

Taula 3.1 Isoformes dels transportadors de glucosa humans.

	GLUT1	GLUT2	GLUT3	GLUT4
Gen	<i>SLCA2A1</i>	<i>SLCA2A2</i>	<i>SLCA2A3</i>	<i>SLCA2A4</i>
Cromosoma	<i>1p35-31.3</i>	<i>3q26.2-27</i>	<i>12p13.3</i>	<i>17p13</i>
Nº d'exons	10	11	11	11
Nº d'aminoàcids	492	524	496	509
K_M 2-DeoxiGlc (mM)	20	42	10	2
Recanvi (min ⁻¹)	20.000	Alt	51.000	25.000
Teixits	<i>Eritròcits, barrera hemato-encefàlica</i>	<i>Fetge, intestí, pàncrees, ronyó</i>	<i>Cervell</i>	<i>Múscul esquelètic i cardíac, adipós</i>

Els transportadors de glucosa (GLUT) tenen un paper molt important en el metabolisme del glicogen i l'homeòstasi de la glucosa perquè un dels factors que controla l'acumulació de glicogen en els diferents teixits és la quantitat de glucosa que poden internalitzar i el moment en que ho fan.

La quantitat de glucosa que poden transportar els GLUT ve dictada per la seva afinitat relativa per la glucosa i per la seva velocitat de recanvi (és a dir, molècules de glucosa transportades per minut).

Així, segons les dades de la taula podem observar que el transportador amb major capacitat per transportar glucosa és el GLUT2, malgrat que els altres membres de la família tinguin afinitats més altes per la glucosa.

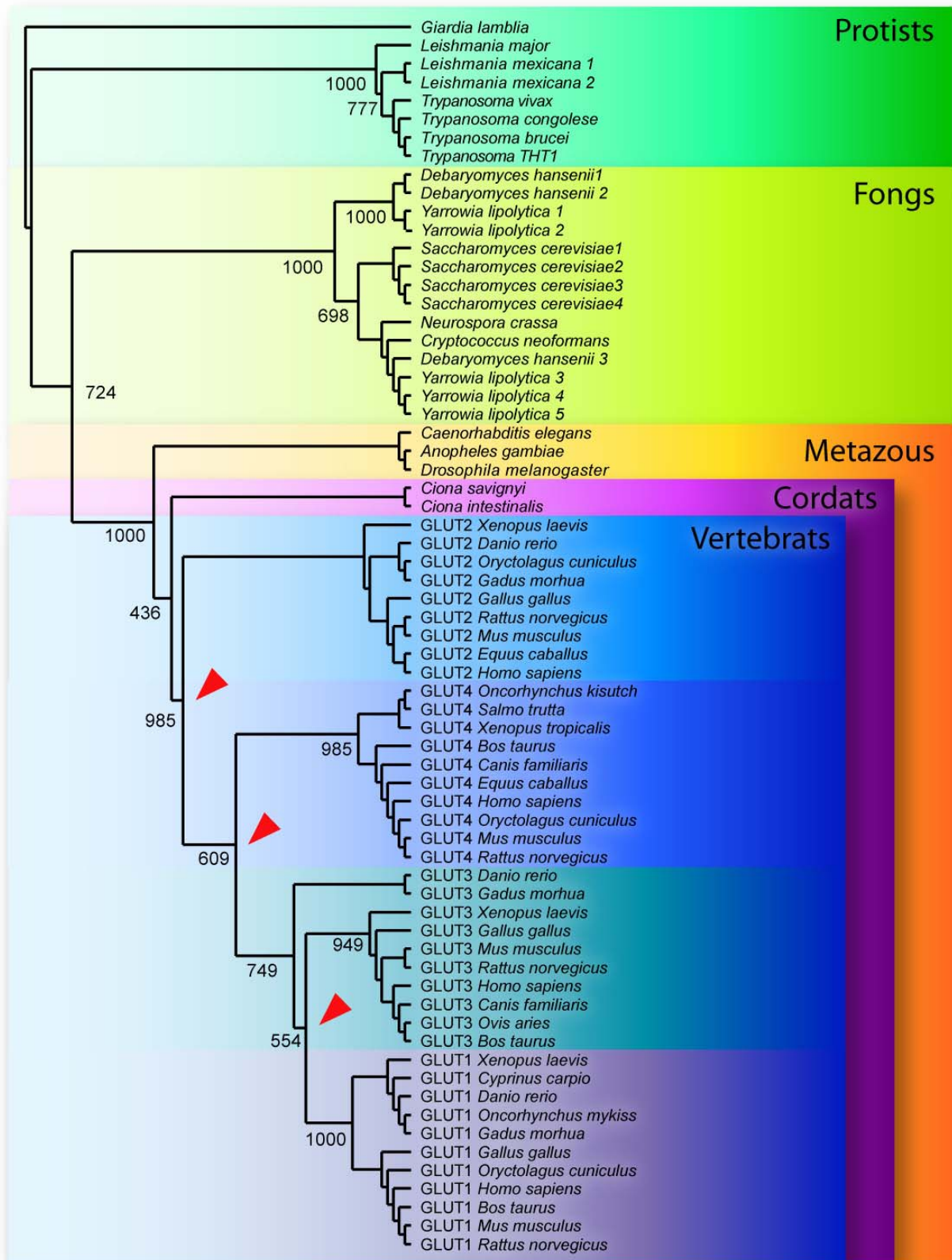


Figura 3.5 Filogènia dels transportadors de glucosa eucariotes.

La relativa baixa afinitat del GLUT2 per la glucosa, en comparació als altres membres de la família, i el fet de que sigui un transportador reversible, li permeten equilibrar les concentracions de glucosa dins i fora de la cèl·lula en el rang de concentracions fisiològiques de glucosa. Aquests trets distintius situen a aquest transportador en el primer pla de l'homeostasi glucídica. El GLUT2 en les cèl·lules β del pàncreas contribueix a desencadenar la secreció d'insulina induïda per glucosa (Thorens, 2001), i en els hepatòcits permet la sortida a la sang de la glucosa produïda per gluconeogènesi o l'entrada de grans quantitats de glucosa en situació postpandrial. La localització de GLUT2 a la membrana està regulada per N-acetilglucosilació. Si aquesta glicosilació no es produeix correctament es redueix significativament el temps de vida mitja del transportador a la membrana cel·lular i la secreció d'insulina estimulada per glucosa queda totalment desregulada. (Ohtsubo et al., 2005)

El GLUT4 és la isoforma de transportador que s'expressa majoritàriament en múscul. La seva funció està altament regulada per insulina. El GLUT4 es troba inactiu en unes vesícules intracel·lulars que en resposta a insulina transloquen a la membrana cel·lular i el GLUT4 comença el transport de glucosa amb alta afinitat. La desregulació de la translocació de GLUT4 és un dels primers mecanismes afectats per la resistència a insulina que condueix a la diabetis de tipus 2 (Saltiel, 2001).

La recopilació de seqüències de transportadors de glucosa ens ha permès construir l'arbre filogenètic representatiu dels transportadors de glucosa. Per a major claredat només hem inclòs en les filogenies les seqüències dels transportadors de classe I (els transportadors de glucosa) i hem obviat aquells transportadors específics d'altres glúcids, els de classe II i classe III (figura 3.5).

Els resultats filogenètics i la comparació amb les característiques bioquímiques dels GLUT ens presenten, un cop més, la dicotomia d'uns isoenzims hepàtics d'alta capacitat però de baixa afinitat i uns isoenzims específics de múscul i cervell amb una elevada afinitat pel substrat però baixa capacitat de transport, tots ells originats per duplicació gènica d'un ancestre comú pre-vertebrat.

3.2.3 Evolució de la glicogen fosforilasa.

La glicogen fosforilasa és l'enzim encarregat de la degradació del glicogen. Catalitza l'escissió fosforolítica de l'últim residu glucosil unit a la molècula de glicogen per un enllaç α -(1,4) i l'allibera en forma de glucosa-1-P (G1P). La GP presenta certes simetries amb la GS en la seva regulació.

En mamífers trobem tres isoformes de GP, cadascuna de les quals majoritàriament s'expressa a fetge (LGP), múscul (MGP) i cervell (BGP). Els tres isoenzims s'activen per fosforilació d'un únic residu, i a més les isoformes de múscul i cervell presenten activació al·lostèrica per AMP. La G6P, que en la GS actua com activador al·lostèric, en aquestes dues isoformes és un inhibidor. Això les diferencia de la GP hepàtica, que té com a principal inhibidor la glucosa.

La GP i la GS es regulen per fosforilació però en sentit invers, és a dir, la GP s'activa per fosforilació mentre que la GS s'inhibeix. Aquest fet és rellevant perquè ambdues isoformes comparteixen les mateixes subunitats reguladores de la PP1 i condiciona la seva regulació. En el cas del fetge hi han dues subunitat reguladores principals, la G_L i la PTG. S'ha descrit que fins que la GP no és inhibida per glucosa i es troba desfosforilada, la G_L roman unida a la GP, impedit l'activació de la GS per desfosforilació i aconseguint un balanç molt regulat entre la síntesi i degradació de glicogen (Green et al., 2004; Hampson & Agius, 2005).

A nivell de seqüència de la GP destacarem l'estudi de la GP hepàtica humana realitzat per (Newgard et al., 1986), per la importància que tindrà més endavant en aquest capítol per a l'estudi evolutiu dels enzims del metabolisme del glicogen. En aquest treball descriuen la clonació de la GP hepàtica humana i destaquen que tot i tenir una identitat d'aminoàcids del 80% amb el seu homòleg muscular, ambdues seqüències poseeixen una composició de bases nucleotídiques molt diferent, sobretot a nivell del contingut de G i C en la tercera posició del codó (GC3s).

En concret la isoforma muscular presenta en la tercera posició del codó una deoxicitosina o deoxiguanosina en el 86% dels casos, mentre que en la GP

hepàtica només representa el 60%. Per als autors això suposa un ús de codons marcadament diferent i esbiaixat entre el fetge i el múscul.

Moltes estructures de la GP han estat resoltes, i els detalls estructurals dels processos d'inhibició i activació s'han descrit amb precisió (Goldsmith et al., 1989; Sprang et al., 1988; Sprang et al., 1991). Això ens ajuda en el nostre propòsit d'establir la filogènia de la GP en els eucariotes perquè, una vegada més, podem alinear les seqüències disponibles en base a un alineament estructural.

Vam recopilar de les bases de dades 55 seqüències corresponents a glicogen fosforilases eucariotes, entre les que ja estaven descrites i les noves seqüències que vam trobar seguint la mateixa estratègia emprada per als altres enzims.

Vam aprofitar les estructures de la GP de múscul de conill, la GP hepàtica humana i la GP de llevat per realitzar el solapament estructural de la figura 3.6.

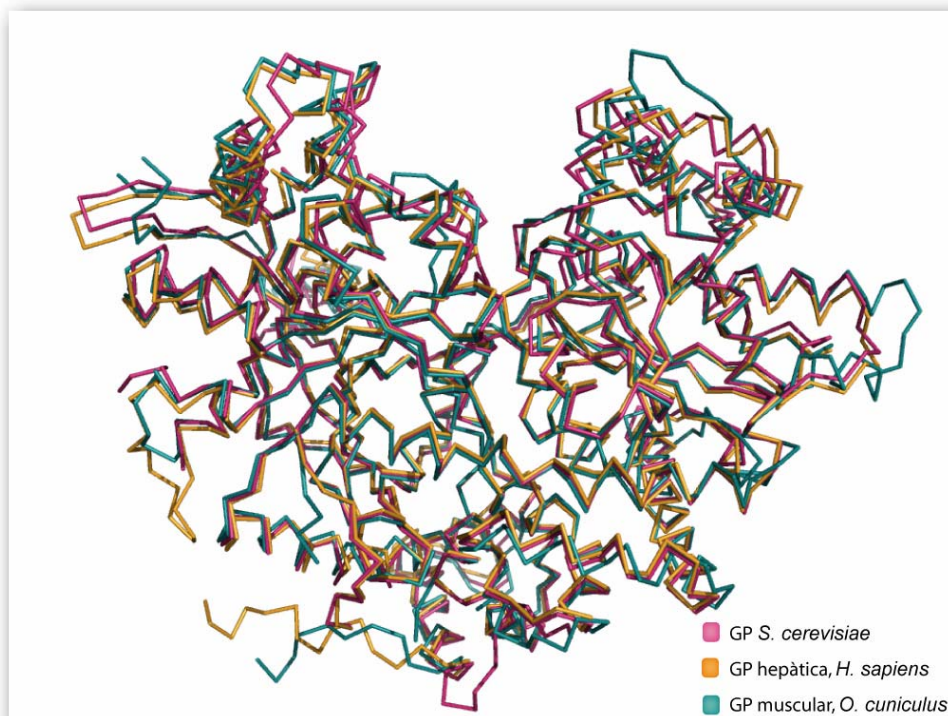


Figura 3.6 Solapament estructural de les glicogen fosforilases. Les estructures cristal·logràfiques de la GP de llevat (codi d'accés: 1ygp), GP hepàtica humana (1fa9), i GP muscular de conill (1p29) es sobreimposen utilitzant el programa MSDFold.

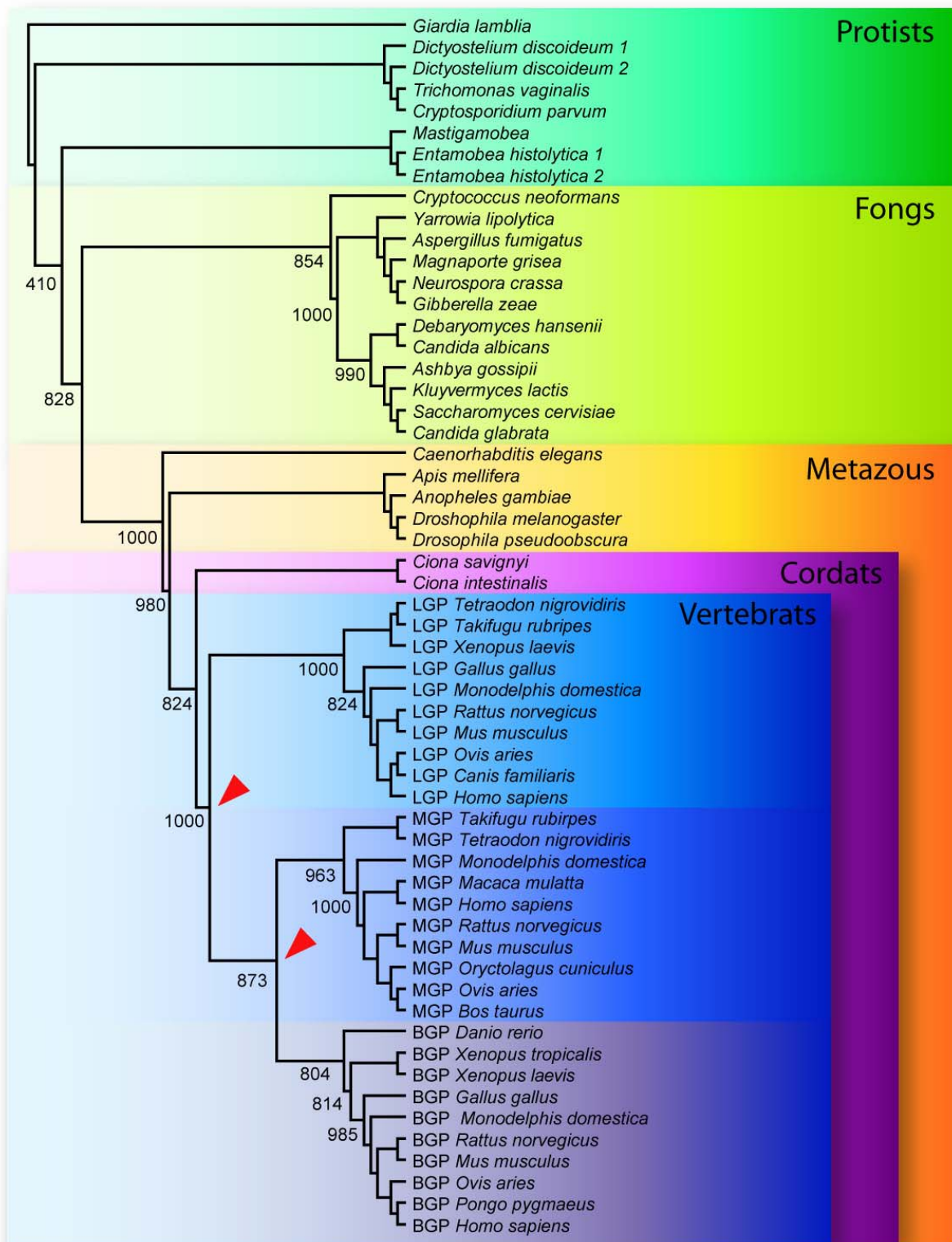


Figura 3.7 Filogènia de les glicogen fosforilases eucariotes. Arbre filogenètic consens calculat amb el mètode de *Neighbor-joining*. En els nodes s'indiquen els valors de *bootstrap* obtinguts en 1000 rèpliques. Les puntes de fletxa indiquen els fenòmens de duplicació que originen els tres enzims de vertebrats.

L'arbre consens per a les GP eucariotes que es mostra en la figura 3.7 es va obtenir pel mètode *Neighbor-joining* a partir dels alineaments de seqüència estructural. Pels valors de *bootstrap* al nodes on es separen el vertebrats dels invertebrats, i als nodes d'on surten les branques de les diferents isoformes de GP de vertebrats, podem afirmar que les isoformes de GP de fetge, múscul i cervell en vertebrats, s'originen per duplicacions gèniques a partir d'un ancestre comú.

En el invertebrats només trobem una sola còpia del gen, el mateix fenomen que observàvem per a la glicogen sintasa.

3.2.4 Co-evolució dels enzims implicats en el metabolisme del glicogen

Si observem amb atenció els arbres evolutius que hem presentat en aquesta memòria, veurem que tots tenen una característica comú: independentment de que en els eucariotes hi hagi més d'una còpia del gen en qüestió, els quatre enzims analitzats sofreixen un fenomen de duplicació gènica a l'origen dels vertebrats a partir d'un sol ancestre comú.

Invariablement, les isoformes que es generen compartimentalitzen la seva expressió en teixits diferenciats. Sempre trobem una isoforma majoritària de fetge i malgrat que la resta d'isoformes són més ubiqües, sovint són majoritàries en teixits amb una alta demanda energètica com el cervell i el múscul. Aquestes característiques de duplicació i compartimentalització es sumeritzen de forma esquemàtica en la figura 3.8. Es veu clarament com en els quatre casos estudiats, la isoforma hepàtica és la més pròxima a l'ancestre comú pre-vertebrat i es genera en el primer pas de duplicació.

Aquesta duplicació és suficient per crear les dues isoformes de la GS però en els altres enzims és necessari que la branca no hepàtica generada en la primera duplicació sofreixi duplicacions successives, una en el cas de la GP, o dues duplicacions més com en el cas de les HK i els GLUT, per crear la resta d'isoformes.

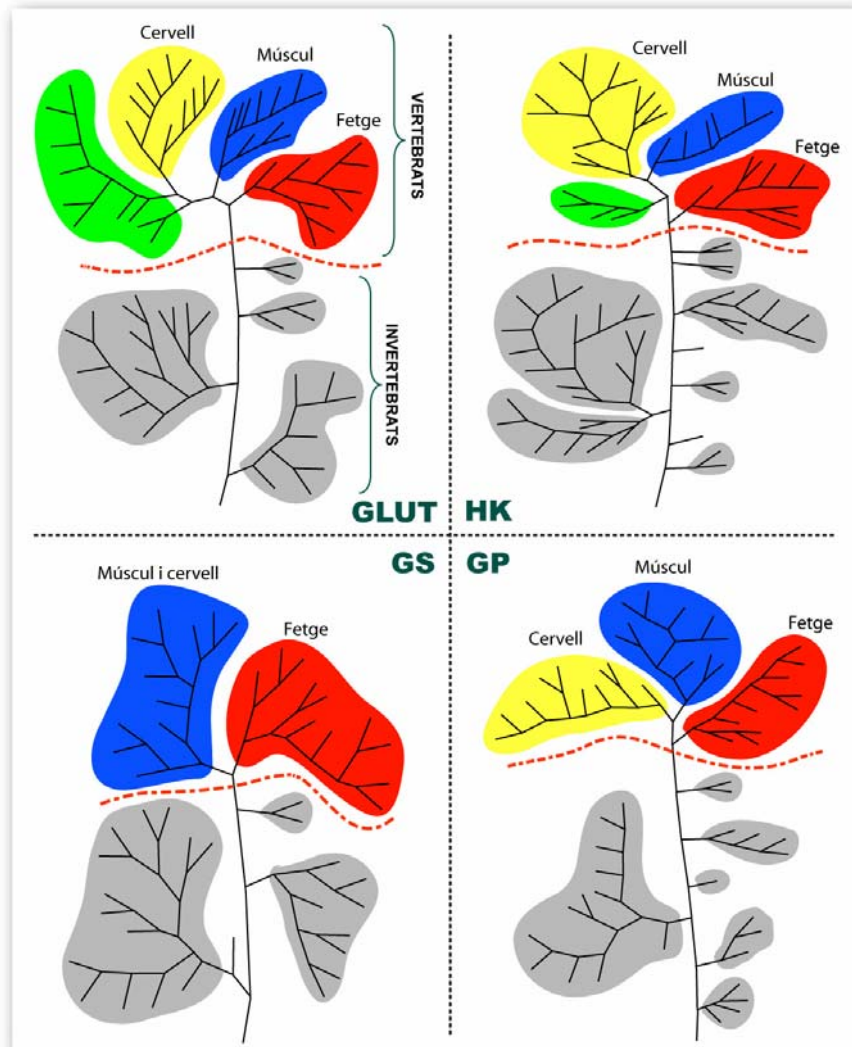


Figura 3.8 Evolució dels enzims del metabolisme del glicogen. Representació esquemàtica dels arbres *Neighbor-joining* consens per als transportadors de glucosa (GLUT), hexoquinases (HK), glicogen sintases (GS) i glicogen fosforilases (GP) eucariotes. La línia vermella discontinua indica la separació entre els vertebrats i la resta d'eucariotes. Els colors de les branques en vertebrats indiquen el patró d'expressió majoritari de cada isoforma: vermell= fetge, blau=múscul, groc=cervell, verd=altres.

Els arbres filogenètics consens ens permeten deduir els processos de duplicació que han patit els enzims en vertebrats, però ens manquen dades per establir quant han divergit aquestes isoformes des del seu origen. Aquesta informació s'extrau a partir dels arbres *Neighbor-joining* basats en matrius de distància.

La figura 3.9 mostra els arbres de *Neighbor-joining*, corresponents als GLUT, HK, GS i GP i que ens indiquen les distàncies evolutives entre les seqüències de vertebrats.

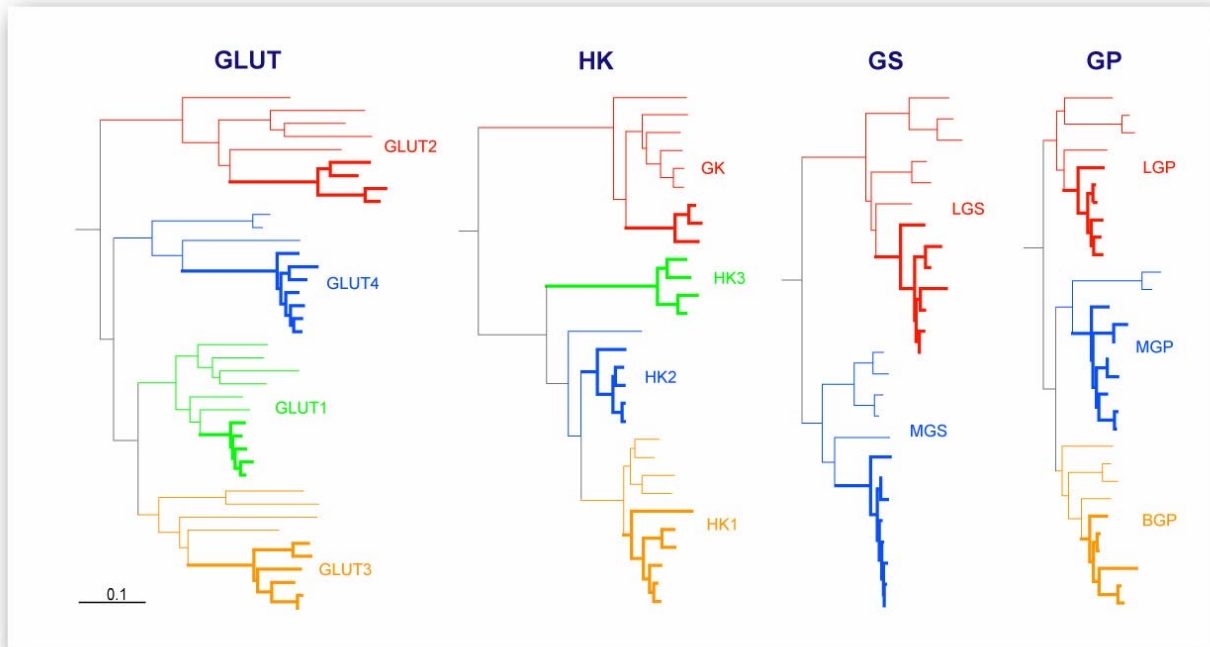


Figura 3.9 Arbres de distància dels enzims del metabolisme del glicogen. Arbres *Neighbor-joining* calculats a partir de les matrius de distància per als transportadors de glucosa (GLUT), hexoquinases (HK), glicogen sintases (GS) i glicogen fosforilases (GP) eucariotes. La topologia que presenten és molt similar a la dels arbres consens que s'obtenen per les mateixes seqüències i amb el mateix mètode després de fer 1000 rèpliques de remostreig. L'arrel dels arbres la situem en el grup dels ascidis, *Ciona intestinalis* i *Ciona savignyi*, que per motius de claredat no es mostren. Els colors de les branques indiquen el patró d'expressió majoritari de cada isoforma: vermell=fetge, blau=múscul, groc=cervell, verd=altres. Les branques corresponents a les seqüències de mamífer es detaquen amb un traç més gruixut.

En els quatre enzims analitzats destaca el fet que el global de les distàncies evolutives dels isoenzims musculars o de cervell, en mamífers, són més curtes que el de les isoformes de fetge en el mateix grup. Això indica que les isoformes de múscul i cervell han sofert menys canvis al llarg de l'evolució.

Cal no confondre el termes, el fet que les isoformes musculars de mamífer tinguin distàncies evolutives més curtes no vol dir pas que hagin evolucionat poc sinó que han divergit menys entre elles. Per exemple, els gens de l'LGS i MGS humana han estat evolucionant el mateix temps (han arribat fins als nostres dies), però en aquest temps la isoforma muscular ha variat

menys respecte, posem per cas, a la mateixa isoforma en ratolí, del que les isoformes hepàtiques d'home i ratolí ho han fet entre elles.

3.2.5 Avaluació de la pressió selectiva en els enzims implicats en el metabolisme del glicogen

Per aprofundir en la adaptació evolutiva que ralentitza les divergències evolutives en les isoformes musculars i de cervell, vàrem estudiar la pressió selectiva a la qual estaven sotmeses aquestes isoformes. Una manera de mesurar aquest paràmetre és la relació K_A/K_S , on K_S és la relació entre les substitucions sinònimes i les posicions sinònimes possibles en una seqüència i K_A és la relació entre el nombre de substitucions no-sinònimes i les posicions no-sinònimes.

Els canvis sinònims en una seqüència de DNA són les mutacions silencioses, aquelles que no produeixen canvis d'aminoàcid perquè el codi genètic és degenerat. Però si aquesta mutació es produeix en una de les bases que canvia l'aminoàcid que codifica el codó, aleshores parlem de mutacions no-sinònimes.

Una relació $K_A/K_S > 1$ ens indica que la selecció positiva està actuant sobre la seqüència nucleotídica perquè afavoreix les mutacions amb canvi d'aminoàcid. Si $K_A/K_S < 1$ significa que només es mantenen les mutacions sinònimes i que es depuren els canvis no-sinònims. En la situació on la pressió selectiva és neutre, aquesta relació serà igual a 1.

Vam calcular la pressió selectiva a la que estaven sotmeses les distintes isoformes de GLUT, HK, GS i GP en el vertebrats mitjançant el mètode PBLSB (Benner et al., 1998) i incorporant les millores proposades per D. A. Liberles (Liberles, 2001).

Aquest mètode ens permet calcular la relació K_A/K_S al llarg de les branques dels arbres filogenètics per reconstrucció de les seqüències

ancestrals obtingudes aplicant el mètode de parsimònia a partir de les seqüències de DNA i proteïna simultàniament. Després, aquesta reconstrucció es pondera segons la longitud de les branques i s'obté així l'història evolutiva de la família.

El valor de K_A/K_S el separem en les seves components de K_A i K_S i els representem gràficament i la visió de conjunt posava de relleu diferències significatives entre els grups. En el nostre cas, i basant-nos en les tendències que havíem observat en els arbres de distància, vam agrupar els valors de K_A/K_S en els quatre grups següents:

- isoformes musculars de mamífers.
- isoformes hepàtiques de mamífers.
- isoformes musculars de peixos, amfibis i aus (vertebrats no-mamífers).
- isoformes hepàtiques de peixos, amfibis i aus (vertebrats no-mamífers).

En la figura 3.10 s'observa com les isoformes musculars de mamífers es distribueixen al llarg de l'eix de K_S , amb poc component de variació no-sinònima (K_A), indicant que les isoformes musculars de mamífer acusen una forta pressió depuradora que evita l'acumulació de noves mutacions en la proteïna. En comparació, les isoformes hepàtiques de mamífer mostren una depuració de les mutacions més relaxada que les isoformes musculars de mamífer i molt similar a la de les isoformes tant musculars com hepàtiques dels peixos, amfibis i aus.

Per qüestions de claredat les gràfiques anteriors només ens mostren les distribucions de les isoformes hepàtiques i musculars, però el mateix procediment es va seguir per a la resta d'isoformes. Els resultats de totes les isoformes es sumarien en la taula 3.2, on el valor del pendent de les rectes de regressió expressen el valor de K_A/K_S promig de cada grup.

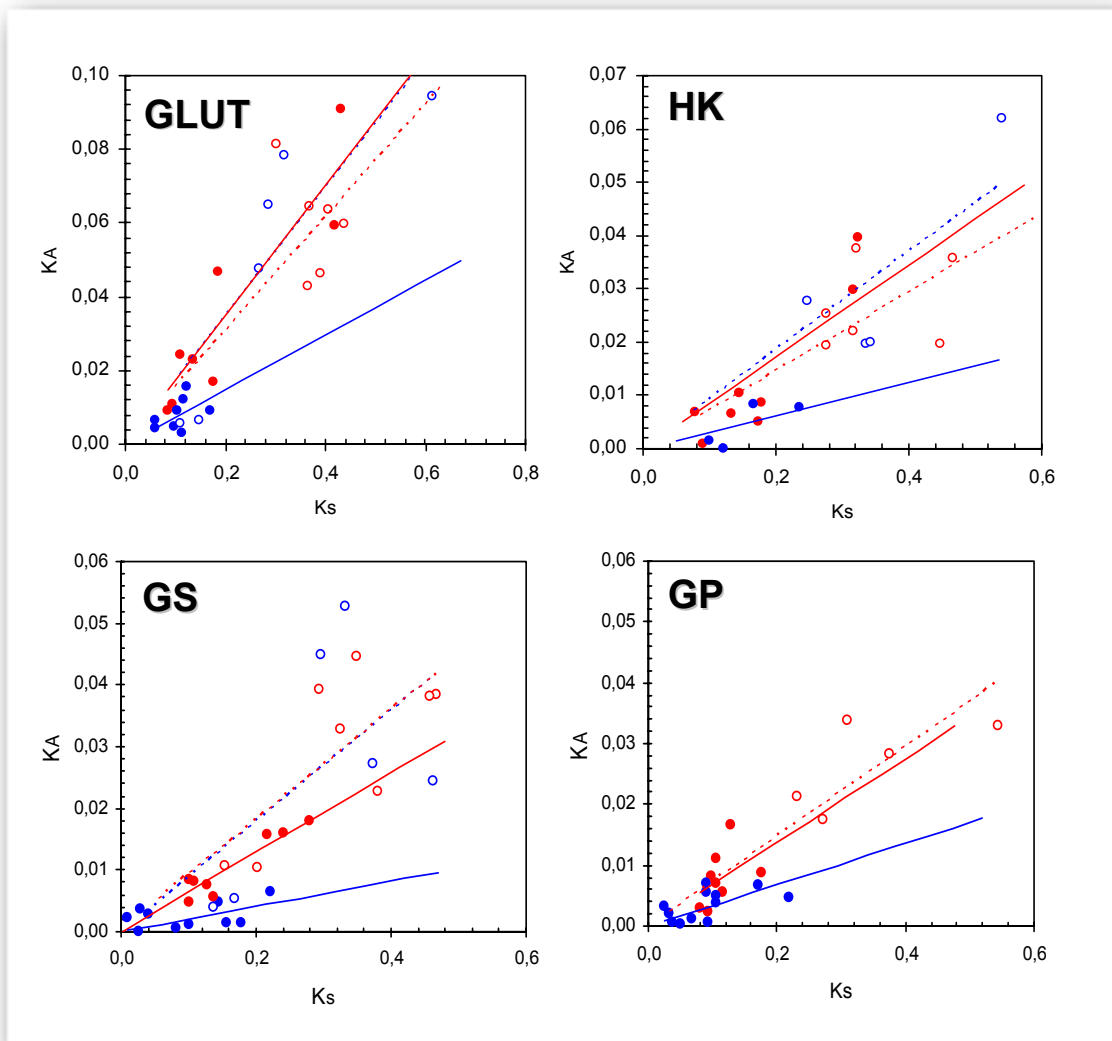


Figura 3.10 Relacions K_A/K_S dels enzims del metabolisme del glicogen en vertebrats. Cada seqüència es representa en els gràfics segons la llegenda:

- Isoformes hepàtiques de mamífer
- Isoformes hepàtiques de peixos, amfibis i aus (vertebrats no-mamífers)
- Isoformes musculars de mamífer
- Isoformes musculars de peixos, amfibis i aus (vertebrats no-mamífers)

Taula 3.2 Valors de K_A/K_S en vertebrats

	No-mamífers	Mamífers		No-mamífers	Mamífers
GLUT1	0,107	0,064	LGS	0,088	0,064
GLUT2	0,154	0,176	MGS	0,090	0,021
GLUT4	0,174	0,074	LGP	0,074	0,069
HK1	0,057	0,080	MGP		0,034
HK2	0,092	0,031	BGP	0,067	0,047
GK	0,086	0,073			

Per aconseguir una visió més clara de les diferències de velocitats d'evolució que envolten als diferents grups, la figura 3.11.a ens mostra la relació els valors de K_A/K_S entre les isoformes hepàtiques i musculars de cada enzim (o de cervell, segons s'indica) i segregades segons si es tracta de les isoformes de vertebrats no-mamífers o de mamífers. La mitjana d'aquestes relacions es representa en la figura 3.11.b i ens indica que les isoformes hepàtiques, en mamífer, de promig incorporen mutacions 2,5 vegades més ràpidament que les isoformes musculars i de cervell.

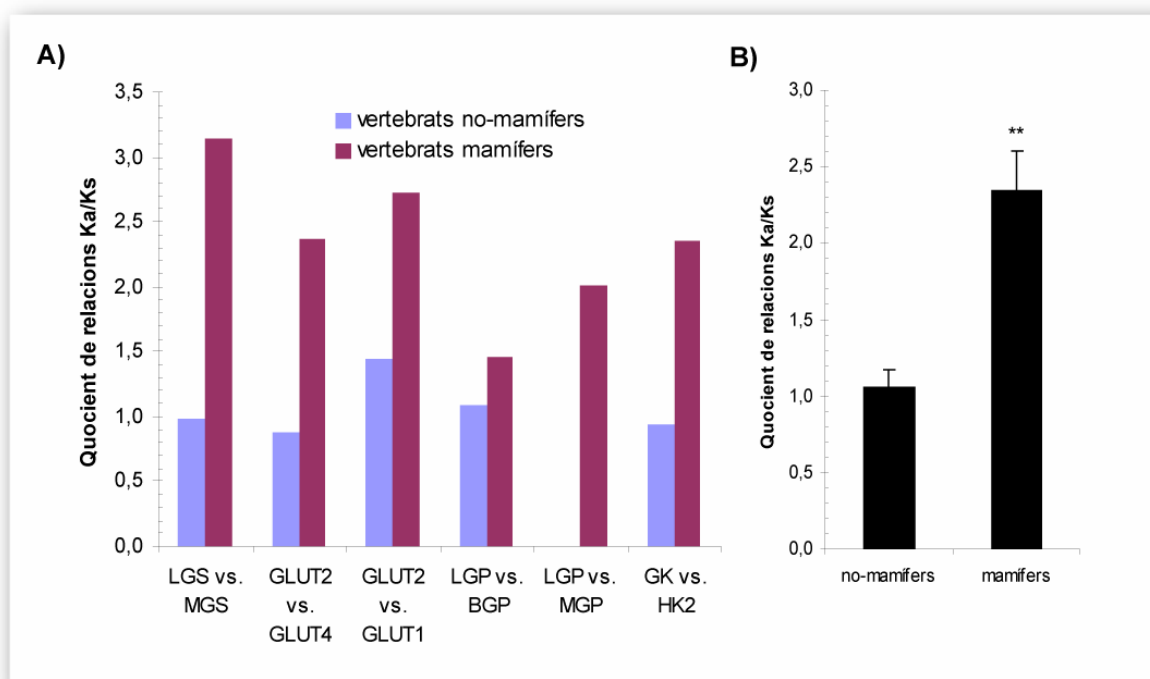


Figura 3.11 Comparació de les relacions K_A/K_S entre les isoformes hepàtiques i musculars. A) El quocient de relacions K_A/K_S es desglossa per a cada enzim, sempre comparant l'isoenzim hepàtic respecte a la isoforma muscular o de cervell. B) Representa el promig de tots els quocients de relacions K_A/K_S , distingint entre els valors obtinguts en vertebrats no-mamífers i mamífers. La barra d'error indica la SEM. ** $p < 0.01$.

Tant a partir de les gràfiques com de la taula de valors K_A/K_S podem deduir que les isoformes originades per duplicació gènica en els vertebrats, en cadascun dels enzims GLUT, HK, GS i GP, tenen una velocitat d'evolució semblant (entesa com la velocitat de fixació en la seqüència, de noves mutacions amb canvi d'aminoàcid), independentment del teixit on s'expressin.

Aquesta tendència es manté fins que arribem als mamífers, on es produeix un canvi molt acusat en d'adaptació evolutiva entre les isoformes segons s'expressin en fetge, múscul o cervell. Les isoformes hepàtiques mantenen una velocitat evolutiva semblant a la que segueixen els isoenzims de peixos, amfibis i aus. Però en mamífer, aquelles isoformes que s'expressen en teixits d'alta demanda energètica com múscul, cervell o fins i tot en eritròcits, mostren una ralentització significativa en el ritme d'incorporació de mutacions amb canvi d'aminoàcid, comparada amb els seus homòlegs hepàtics.

3.2.6 Contingut de G+C i ús preferent de codons en els gens dels els enzims implicats en el metabolisme del glicogen

Les seqüències recopilades en el apartats anteriors representen un conjunt significatiu de seqüències específiques de teixit i ens permeten explorar les hipòtesis presentades per (Newgard et al., 1986) sobre el biaix en l'ús de codons entre les isoformes de múscul i fetge degut a la composició en deoxiguanines i deoxicitosines de les seqüències.

Això té la seva rellevància perquè l'ús de codons que corresponen a tRNAs poc abundants pot reduir l'efectivitat d'expressió d'un gen. Els gens que més s'expressen acostumen a emprar els codons dels tRNAs més abundants per facilitar la transcripció (Duret, 2002).

En primer lloc vam determinar el contingut en G+C de les seqüències de vertebrats de GLUT, GS i GP en múscul i fetge utilitzant el programa CodonW desenvolupat per J. Peden (Peden, 1999). Amb la mateixa implementació vam obtenir el contingut de G+C en la tercera posició sinònima dels codons (GC3s).

Al representar el % de G+C en front del % de GC3s (figura 3.12) de seguida observem una segregació de les seqüències en els mateixos quatre grups que havíem definit quan calculàvem les velocitats evolutives. En aquest cas, les isoformes hepàtiques de GLUT i GS tenen una marcada tendència a tenir un baix contingut en G+C, en l'altre extrem hi trobem les isoformes musculars. Més centrades trobem les seqüències corresponents a les

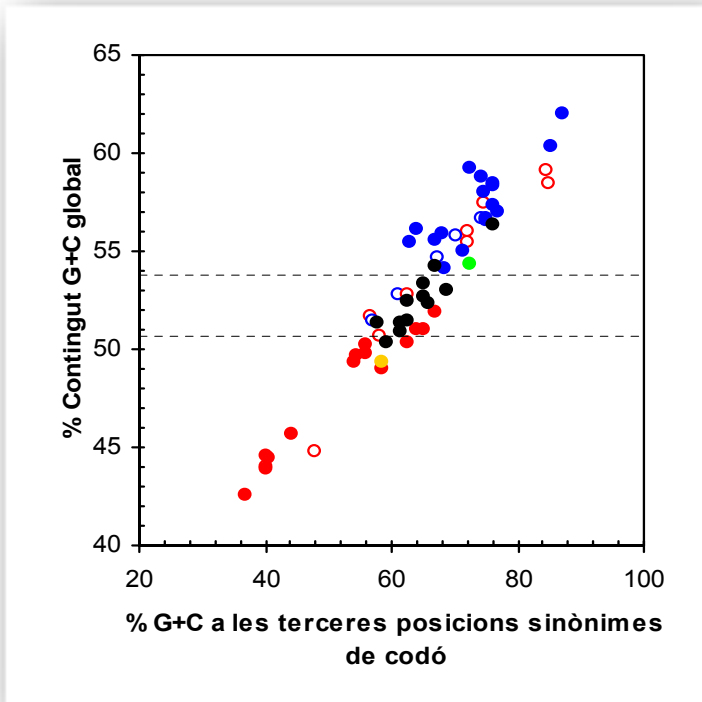


Figura 3.12 Nombre efectiu de codons. Es representen els valors de G+C per a les seqüències de GLUT, GS i GP, amb el mateix codi de colors que a la figura 4.9. En negre es representen els valors per a LipC i ApoB2. En verd es destaquen els valors per RPL19 i en groc el corresponent a Ciona.

isoformes de peixos, amfibis i aus, just en el rang de G+C promig que mostren les zones codificants dels gens de vertebrats (Xia et al., 2003), comprès entre les dues línies discontinües.

El fet significatiu d'aquesta distribució no és la tendència a agrupar-se en una recta, ja que el %GC3s en última instància es correlaciona i depèn del contingut de GC, sinó la distribució segregada segons el teixit on s'expressin.

També cal destacar que aquesta segregació es produeix a partir d'un origen comú, des d'on les isoformes de múscul i fetge divergiran cap a extrems oposats. Això estaria d'acord amb l'origen duplicatiu d'aquestes isoformes: en els vertebrats més primitius encara mantindrien la composició de G+C

originària de l'ancestre comú, per anar divergint poc a poc a mida que pugem en l'escala evolutiva.

Per comprovar aquest últim extrem, vam situar en la mateixa gràfica les seqüències de GS de *Ciona intestinalis* i *Saccharomyces cerevisiae*. Efectivament els valors de GC d'aquestes seqüències les situaven en el rang mitjà de contingut G+C i molt propers a les seqüències de vertebrats no-mamífers.

Per descartar possibles artefactes fruit de la casualitat i per verificar si aquesta segregació segons el contingut G+C depenia de l'especificitat de teixit o era una característica dels gens d'enzims del metabolisme del glicogen, vam establir una sèrie de controls.

En primer lloc vam buscar una proteïna d'expressió constitutiva i ubícua, en aquest cas la proteïna ribosomal RPL19 humana. Els valors de G+C tornaven a situar la proteïna en el centre de la gràfica, indicant que el rang de G+C que consideràvem com a promig dels gens vertebrats era vàlid.

Com a proteïnes de específiques de fetge però sense relació amb el metabolisme del glicogen vam seleccionar dues, la apolipoproteïna A2 (ApoA2) i la fosfolipasa C (LipC). Ambdues proteïnes són exclusives de fetge. En aquest cas vam representar totes les seqüències de mamífers que vam poder trobar per aquests gens, ja que la tendència a divergir cap a valors extrems de G+C en els gens del metabolisme del glicogen s'accentuava com més amunt de l'escala evolutiva ens trobàvem. Un cop representades, les seqüències de mamífer de LipC i ApoA2 s'agrupaven en el rang promig de G+C i no mostraven cap tendència a divergir cap a cotes baixes de G+C.

Així doncs, la tendència dels gens de GLUT, HK, GS i GP estudiats a acumular G o C si s'expressen en el múscul, o tot el contrari en el cas de les isoformes de fetge, no és fruit de l'especificitat de teixit i podria ser un tret diferencial dels gens implicats en el metabolisme del glicogen.

Com hem esmentat anteriorment, la correlació entre contingut G+C i les GC3s ens permet veure clarament les tendències que segueixen els gens però

com que són variables dependents, aquesta correlació no ens aporta cap més informació que destacar que el contingut de G+C de les isoformes de fetge i múscul divergeix al llarg de l'evolució.

Per reforçar el concepte de que el contingut G+C divergeix en aquestes isoformes, la figura 3.13 ens mostra la composició G+C de les seqüències d'organismes representatius, normalitzades pel valor promig de G+C de les seqüències codificants de cada animal (Xia et al., 2003) (Genome Indices, <http://gi.kuicr.kyoto-u.ac.jp>). Així es confirma la tendència dels locus on s'ubiquen els gens del metabolisme del glicogen a variar la seva composició de bases nucleotídiques en funció del teixit on s'expressen.

Un cop analitzat la composició en G+C dels gens de GLUT, HK, GS i GP, ens trobàvem en condicions per analitzar si aquesta desviació en el contingut GC implica un biaix en l'ús de codons per part de les isoformes.

Per a aquest anàlisi vam utilitzar el paràmetre del nombre efectiu de

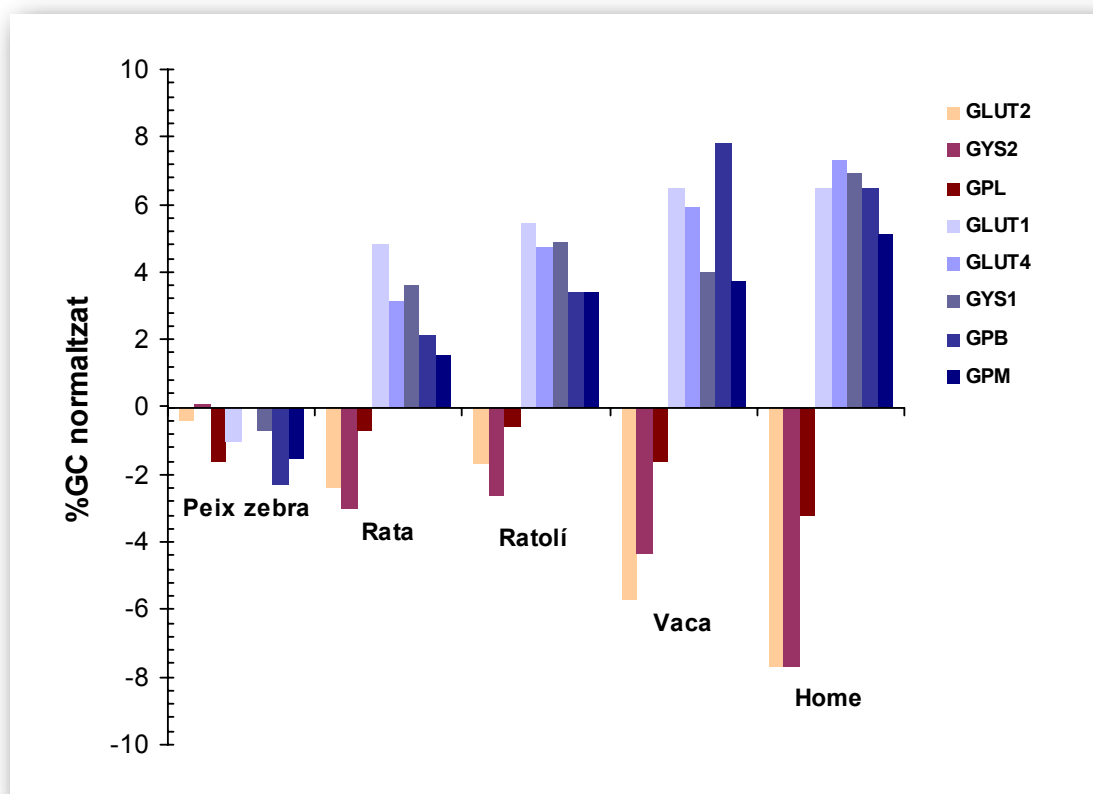


Figura 3.13 Divergències en la composició G+C. El % del contingut en G+C del gens analitzats es normalitza respecte el %GC promig de les seqüències codificants de cada espècie.

codons (EN_c) (Wright, 1990). El codi genètic és degenerat, un aminoàcid pot estar codificat per més d'un codó. El valor de l'índex EN_c per una seqüència donada varia entre 20, quan només un codó s'empra per cada aminoàcid, o 61 en el cas de que s'utilitzin tots els codons disponibles en el codi genètic.

Una seqüència pot tenir una pressió selectiva que forci a un patró concret en l'ús de codons per afavorir l'expressió, potenciant la presència dels codons dels tRNA més abundants. Això repercutirà en un EN_c més baix perquè hi haurà menys varietat de codons.

Però cal remarcar que en el fons el paràmetre EN_c també depèn del contingut G+C de la seqüència i que amb una composició de bases donada, no tots els codons es podran utilitzar.

L'equació 3.1 ens relaciona EN_c amb GC3s, assumint que no hi ha cap pressió selectiva externa, on S és la freqüència de GC3s en una seqüència:

$$EN_c = 2 + S + \left(\frac{29}{S^2 + (1 - S)^2} \right)$$

Quan l'ús de codons d'una seqüència només depengui de la seva composició intrínseca de G+C, aquesta es situarà en algun punt de la corba representada per aquesta equació. En canvi, una seqüència sotmesa a una pressió selectiva s'allunyaria de la corba ideal cap a valors més baixos de EN_c .

Altres cops vam fer ús del programa CodonW per calcular el paràmetre EN_c en tots els gens de vertebrats de GLUT, HK, GS i GP, i els vam representar en funció dels seus valors de GC3s.

La figura 3.14 ens mostra com els valors de EN_c de totes les seqüències dels enzims del metabolisme del glicogen analitzades es situen molt properes i seguint la tendència de la corba ideal en absència de selecció, amb independència del patró d'expressió. Com a control altre cop vam fer servir les seqüències de LipC i ApoA2, que tampoc mostraven símptomes de pressió mutacional.

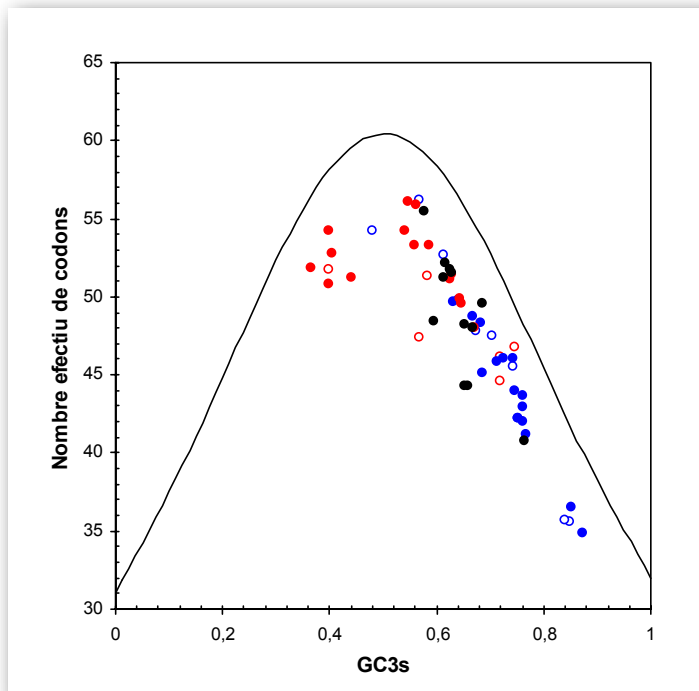


Figura 3.14 Nombre efectiu de codons. Es representen els valors de EN_c per a les seqüències de GLUT, GS i GP, amb el mateix codi de colors que a la figura 4.9. En negre es representen els valors per a LipC i ApoB2. La corba és la representació gràfica de l'equació 3.1.

La distribució dels gens analitzats en la gràfica ens indica que el biaix en l'ús de codons per part de les isoformes muscular i hepàtiques és un artefacte de la divergència en la composició G+C intrínseca d'aquests gens i que no són fruit d'una hipotètica pressió selectiva per potenciar l'ús preferent d'uns codons respecte a un altres. Una altra qüestió és la força evolutiva que a provocat la divergència en la composició G+C.

3.3 DISCUSSIÓ

En aquest capítol hem mostrat com els enzims GLUT, HK, GS i GP, implicats en el metabolisme del glicogen es dupliquen en vertebrats per originar les isoformes respectives, i com aquestes evolucionen a ritmes diferents en funció del seu patró d'expressió.

Degut a les característiques bioquímiques de l'HK1 i la GK, és més eficient produir la G6P necessària per activar l'LGS expressant la GK que no pas l'HK1. Aquest ús més racional dels recursos es tradueix, a nivell de teixit, que allà on s'expressa l'LGS l'hexoquinasa majoritària serà la GK. En canvi a la resta de teixits extrahepàtics que com el cervell i el múscul expressen l'MGS, al mateix temps expressen alguna de les hexoquinases d'alta afinitat (HK1, HK2 o HK3).

La segregació de les isoformes en els diferents teixits coincideix amb el rol de cada teixit en l'homeòstasi de la glucosa. Al llarg d'aquesta capítol han sorgit resultats que indiquen una subdivisió dels isoenzims estudiats en dues categories:

- ▶ Alta afinitat pel substrat però amb capacitat catalítica limitada.
- ▶ Baixa afinitat pel substrat, però en les condicions de treball adients tenen una velocitat màxima elevada.

L'HK1 és un exemple d'enzims del primer grup, amb molta afinitat per la glucosa però que s'inhibeix per producte. La GK pertany al segon grup perquè té una $S_{0,5}$ un ordre de magnitud més gran que la de l'HK1 i tanmateix produeix G6P en grans quantitats. La Schxk2 es troba a cavall entre els dos grups, amb una afinitat per la glucosa semblant a la de l'HK1 però sense inhibició per substrat.

Podem arribar a conclusions similars si apliquem aquest raonament a les isoformes de la glicogen fosforilasa i a l'estudi de les molècules que activen o inhibeixen l'activitat de les isoformes de GP.

El producte de la GP és la G1P, que es transforma a G6P i a partir d'aquí pot entrar en la glucòlisi per subministrar energia a la pròpia cèl·lula o alliberar-se en forma de glucosa per acció de la G6P fosfatasa. El fet que les isoformes musculars i de cervell de GP s'activin per AMP i nivells elevats de G6P les inhibeixin, implica que assoliran la seva màxima activitat quan la cèl·lula tingui les seves reserves energètiques molt baixes. En aquest cas, el destí de la G1P alliberada del glicogen serà la glucòlisi a fi de satisfer la demanda d'ATP.

En el fetge en canvi, no cal arribar a tenir l'estat energètic de la cèl·lula compromès per degradar glicogen, doncs la glucosa que s'allibera del glicogen hepàtic s'inverteix en el consum d'altres teixits. Això s'aconsegueix perquè la GP hepàtica és sensible als nivells de glucosa. Quan la concentració de glucosa baixa, la GP del fetge ho percep gràcies al paper equilibrador de glucosa del GLUT2 i s'activa. Així la G1P podrà alliberar-se del fetge en forma de glucosa gràcies a que aquest teixit expressa la G6P fosfatasa. Un com més veiem com les característiques bioquímiques de les distintes isoformes que catalitzen la mateixa etapa del metabolisme determinen la funció de la via metabòlica en el teixit on s'expressen.

Aquesta definició en dos grups d'alta i baixa capacitat també es pot extrapolar als teixits si els classifiquem segons els seu metabolisme del glicogen.

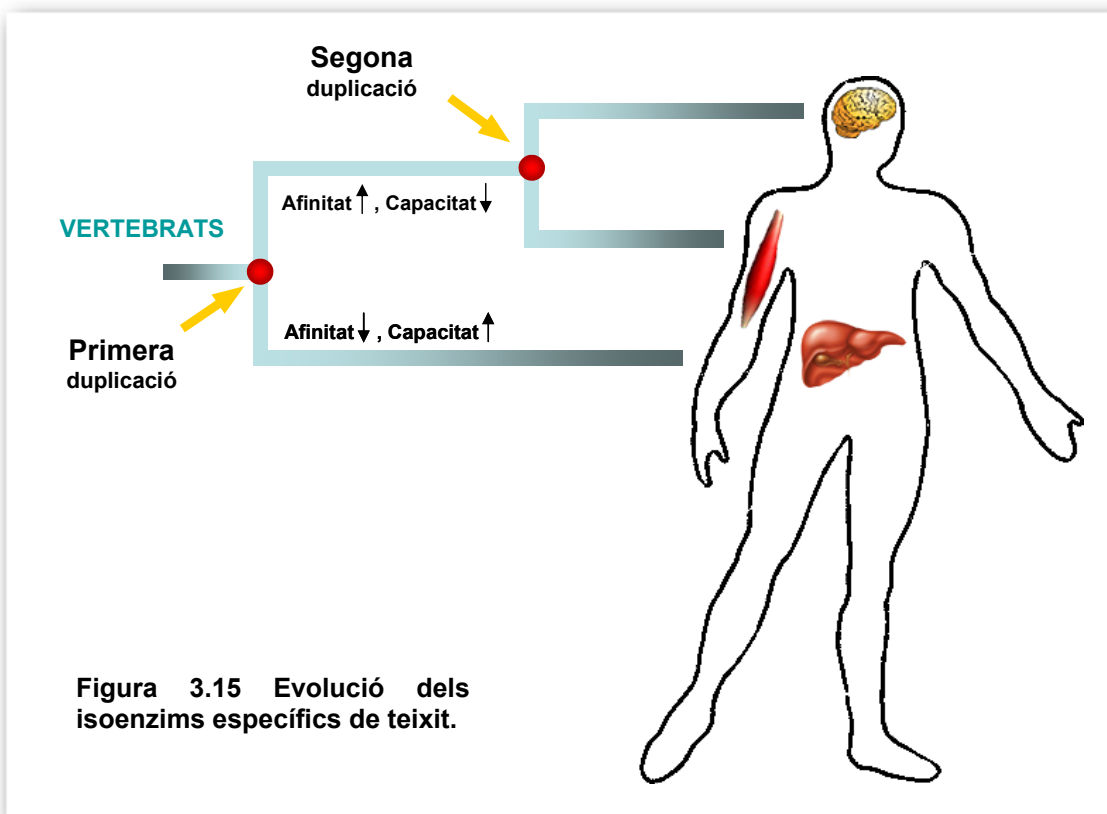
El múscul entraria dins del primer grup: pot acumular glicogen a baixes concentracions de glucosa gràcies a que internalitza la glucosa per GLUT4, aquesta glucosa és àvidament fosforilada per HK2 i la G6P que es produeix és suficient per activar l'MGS. Tot i així està molt lluny d'acumular tant glicogen per gram de teixit com el fetge.

En el fetge en canvi estaria en el rang del segon grup. La glucosa intracel·lular està en equilibri amb la glucosa en sang però la GK només fosforila glucosa eficientment quan la concentració de glucosa augmenta després de la ingesta i la digestió dels aliments perquè té una $S_{0,5}$ de 7,5 mM i l'acció de la GKRP encara fa que sigui més alta. En aquesta situació si que es produeix G6P sense inhibició i en quantitat suficient per activar l'LGS.

D'aquesta forma s'assegura que el fetge només acumula glicogen quan hi ha glucosa en excés i que de cap manera està privant dels substrats a d'altres teixits. Al cap i a la fi no tindria cap sentit prendre la glucosa al múscul per poder fer glicogen al fetge si a continuació cal degradar-lo per fer-lo arribar al múscul, necessitat d'energia, en forma de glucosa.

Vist d'aquesta manera, podem observar el detall significatiu de que hem posat en cada un dels grups una isoforma diferent per catalitzar la mateixa etapa metabòlica. Els enzims del metabolisme del glicogen estan duplicats, però les isoformes resultants sempre van a parar en grups diferents, de manera que el metabolisme del glicogen està dissenyat emprant enzims d'alta afinitat o de baixa afinitat.

Un dels trets comuns de les filogenies dels enzims implicats en el metabolisme del glicogen és que totes les espècies de vertebrats analitzats presenten totes les isoformes però aparentment els isoenzims de baixa afinitat que s'expressen majoritàriament en fetge apareixen en el primer fenomen de duplicació i els isoenzims d'alta afinitat sorgeixen més endavant (figura 3.15).



Aquest resultat suggereix que l'aparició de teixits diferenciats que té lloc en els primers estadis evolutius per arribar als vertebrats moderns coincideix amb l'especialització metabòlica d'alta i baixa capacitat. Així podem especular sobre l'existència i les característiques d'un organisme proto-vertebrat en el qual s'hagués produït la primera duplicació gènica. Aquest animal concentraria l'expressió de les isoformes de baixa afinitat en un teixit estalviant recursos per als teixits més àvids de glucosa que expressarien la combinació d'isoenzims d'alta afinitat. Més endavant, aquesta compartimentalització de l'expressió gènica en teixits independents afavoriria l'aparició i l'evolució de noves isoformes fins assolir la configuració que ha arribat fins als nostres dies.

Actualment encara existeix aquest proto-vertebrat? Els ascidis representen un estadi massa primitiu en l'evolució dels vertebrats i la seva dotació enzimàtica ho confirma. Segurament cal anar a buscar els indicis en el vertebrat més primitiu que es coneix, la lamprea. L'estudi del genoma i el metabolisme d'aquest organisme en poden aportar noves dades que contribueixin a comprendre l'evolució metabòlica dels vertebrats.

Les dades de les relacions K_A/K_S en mostren que l'evolució dels principals enzims del metabolisme del glicogen segueixen uns camins molt particulars. Tots els valors de K_A/K_S calculats són més petits que la unitat i per tant ens indiquen que els gens analitzats estan sotmesos a una pressió depuradora. Tanmateix és molt significatiu que aquesta pressió selectiva s'accentuï en les isoformes musculars de mamífer. Les isoformes majoritàriament hepàtiques incorporen mutacions a un ritme similar al llarg de tota l'evolució dels vertebrats, en canvi les isoformes musculars de mamífers acceleren la depuració de les mutacions que indueixen canvis d'aminoàcid respecte als isoenzims de vertebrats no-mamífers.

Aquests canvis en la velocitat d'evolució suggereixen que les isoformes musculars de mamífer han assolit un grau de complexitat i coordinació que respon correctament a les necessitats fisiològiques dels teixits on s'expressen, però que qualsevol mutació pot alterar dramàticament l'eficiència de tot el procés. Aparentment les isoformes hepàtiques no mostren aquest

comportament i això suggereix que la configuració del metabolisme del glicogen en el fetge té més llibertat per adaptar-se als canvis i té més marge per tamponar les alteracions produïdes per les mutacions.

Les característiques diferencials del metabolisme del glicogen en múscul i fetge reforcen aquest plantejament perquè indiquen que el procés de síntesi de glicogen en el múscul és més complex que en fetge tot i seguir les mateixes etapes. Així observem que per iniciar la síntesi de glicogen en múscul les vesícules de GLUT4 es fusionen amb la membrana cel·lular, l'HK1 transloca des del citosol vers el mitocondri i l'MGS surt del nucli cap al citosol, tot això amb la intenció de maximitzar l'aprofitament de la glucosa. En canvi en el fetge el transportador GLUT2 està constitutivament a la membrana, l'LGS es troba en el citosol i l'únic enzim que transloca és la GK.

Una prova addicional del delicat equilibri que s'estableix en el metabolisme de la glucosa en múscul és que el seu mal funcionament és un dels primers desajusts que es produeix en la diabetis tipus 2. La diabetis s'inicia amb una resistència a la insulina per part dels teixits perifèrics que condueix a una absorció de la glucosa deficient (Saltiel, 2001).

El canvi en el ritme evolutiu no és l'única diferència que observem entre els gens. La sorprenent desviació del contingut G+C en les seqüències és una prova més de l'evolució independent de les isoformes hepàtiques i musculars. És un fet conegut que altres gens duplicats tenen una composició G+C oposada, com el cas de la insulina respecte els IGF (Ellsworth et al., 1994) però es desconeixen els mecanismes que la produeixen i la mantenen.

Les menors diferències de G+C les observem entre les isoformes hepàtiques i musculars de peixos, essent els gens dels parells humans els que tenen el contingut més dispar (Rodin & Parkhomchuk, 2004). Aquesta creixent divergència en el contingut de G+C dels gens duplicats en el transcurs de l'evolució dels vertebrats ens confirma que les isoformes dels diferents enzims del metabolisme del glicogen sorgeixen per duplicació d'un ancestre pre-vertebrat, doncs en el moment de la duplicació els gens de la nova parella tenen idèntica composició G+C.

La desviació en el contingut G+C podria ser la conseqüència d'un biaix en l'ús de codons, però els estudis que hem fet revelen que els gens analitzats no s'allunyen del nombre efectiu de codons disponibles segons la seva composició de nucleòtids (Wright, 1990).

Cal destacar que aquesta divergència en el contingut G+C que observem en les isoformes analitzades va acompanyada d'una relocalització cromosòmica dels gens duplicats i un canvi en el patró d'expressió. El nexa comú de tots aquests fenòmens podria trobar-se en el fet conegut que els gens d'expressió constitutiva i ubiqua tendeixen a trobar-se en zones riques en G i C per afavorir la seva transcripció (Vinogradov, 2003; Yamashita et al., 2005). Això permet explicar perquè tot i que en el procés de divergència cap a composicions G+C oposades a priori qualsevol dels membres de la parella d'isoformes podria enriquir-se en A i T, en tots els gens que hem estudiat la isoforma que perd G+C és la que té el patró d'expressió més restringit a un teixit en concret. L'exemple més clar el trobem en les glicogen sintases humanes. L'MGS, malgrat que és més abundant en múscul esquelètic i cardíac, s'expressa virtualment en tots els teixits excepte en el fetge i té un 58% de G+C, aquest valor contrasta amb el 45% de G+C que posseeix la isoforma LGS, d'expressió restringida al fetge.

Tanmateix en l'anàlisi s'observa que també hi ha isoformes específiques de teixit amb una composició G+C elevada, com el cas de la GP de cervell o el GLUT4. L'explicació més plausible per aquests casos és que l'enriquiment o pèrdua de G+C probablement va quedar fixat en la primera duplicació que donava lloc a la isoforma específica de fetge i la isoforma ubiqua a partir de la qual després s'originaven la resta d'isoformes d'alta afinitat. Aquestes darreres isoformes més tard podrien restringir la seva expressió a un teixit determinat però la seva composició de bases ja estava enriquida en G+C.

El nombre de gens no es correspon amb la complexitat fenotípica dels organismes, com enuncia la paradoxa del valor G (Betran & Long, 2002; Hahn & Wray, 2002), i evidències recents indiquen que enlloc del nombre total de gens és la diversitat dels patrons d'expressió el que afavoreix el grau creixent de complexitat en els organismes. Aquesta diversitat d'expressió s'aconsegueix

enriquant la varietat de promotors, repressors, estimuladors, etc., que regulen la transcripció dels gens (Levine & Tjian, 2003). La duplicació gènica i la posterior relocalització cromosòmica que hem determinat en els gens del metabolisme del glicogen és un dels mecanismes que permeten incrementar el nombre dels elements reguladors transcripcionals.

Els resultats presentats en aquest capítol porten implícit el concepte de co-evolució, tant dels teixits amb els enzims que el conformen com dels propis enzims amb els altres enzims situats en la mateixa via metabòlica. Així es defineixen els mòduls funcionals que determinen les funcions metabòliques dels teixits, a través d'un procés adaptatiu recíproc que desemboca en els tàndem esquisidament regulats de GLUT2/GK/LGS/LGP i GLUT1-4/HK1-2/MGS/MGP-BGP.