

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Facultat de Química



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**CONTROL DE LA SÍNTESI DE GLICOGEN EN
HEPATÒCITS**

ROGER GOMIS I CABRÉ

Barcelona, 23 d'Abril 2002

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS	1
INTRODUCCIÓ GENERAL	5
1. METABOLISME DEL GLICOGEN I VIES RELACIONADES	5
1.1. GLUCÒLISI I GLUCONEOGÈNESI	6
1.2. SÍNTESI DE GLICOGEN	10
1.2.1. Síntesi de glicogen: via directa	11
1.2.2. Síntesi de glicogen: via indirecta	13
1.3. DEGRADACIÓ DE GLICOGEN	13
2. MECANISMES DE REGULACIÓ DE LA METABOLISME DEL GLICOGEN HEPÀTIC	15
2.1. LA GLUCOQUINASA I LA SEVA PROTEÏNA REGULADORA	17
2.2. LA GLUCOSA 6-FOSFATASA	18
2.3. LA GLICOGEN SINTASA HEPÀTICA	19
2.4. LA GLICOGEN FOSFORILASA HEPÀTICA	23
3. CONTROL DE LA SÍNTESI DEL GLICOGEN HEPÀTIC	25
4. ACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA PER GLUCOSA	28
5. ELS ADENOVIRUS COM A EINES DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA	30
5.1. REGIONS MÉS RELLEVANTS DEL GENOMA DE L'ADENOVIRUS	31
5.2. AVANTATGES I INCONVENIENTS DELS ADENOVIRUS COM A VECTORS DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA	32
RESULTATS I DISCUSSIÓ	35
1. CAPÍTOL 1: CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS CODIFICANT PER A LA RLGS, I LA GFP/RLGS.	
1.1. INTRODUCCIÓ	39
1.2. RESULTATS	40
1.2.1 Obtenció i caracterització de l'AdCMV-RLGS i de l'AdCMV-GFP/RLGS	40
1.2.2 Localització Subcel·lular de la RLGS i de la GFP/RLGS	45
1.3 DISCUSSIÓ	49

2. CAPÍTOL 2: CONTROL COMPARTIT DE LA SÍNTESI DE GLICOGEN ENTRE LA GLICOGEN SINTASA I LA GLUCOQUINASA

2.1	INTRODUCCIÓ	53
2.2	RESULTATS	54
2.2.1.	Activitat GS, activitat fosforiladora de glucosa i GP en hepatocits que sobreexpressen la RLGS.	54
2.2.2.	Activitat GS en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK o ambdues (RLGS/GK)	57
2.2.3.	Acumulació de glicogen en resposta a glucosa en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK ambdues (RLGS/GK).	59
2.2.4.	Nivells de Glc 6-P i UDP-Glc en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK o ambdues (RLGS/GK).	61
2.2.5.	Producció de Lactat en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK o ambdues (RLGS/GK).	64
2.3.	DISCUSSIÓ	66

3. CAPÍTOL 3: COEFICIENT DE CONTROL DE LA GS EN LA SÍNTESI DE GLICOGEN EN HEPATÒCITS

3.1.	INTRODUCCIÓ	71
3.2.	RESULTATS	72
3.2.1.	Sobreexpressió de la GS en hepatòcits en cultiu: Canvis en la relació d'activitats	72
3.2.2.	Determinació del coeficient de control de la GS	74
3.2.3.	Distribució de la GP en hepatòcits que sobreexpressen diferents nivells de GS	78
3.3.	DISCUSSIÓ	82

4. CAPÍTOL 4: LA ISOFORMA HEPÀTICA DE LA GLICOGEN SINTASA PERÒ NO LA MUSCULAR ÉS CAPAÇ DE DIFERENCIAR ENTRE LA GLUCOSA 6-FOSFAT PRODUÏDA PER LA GLUCOQUINASA DE LA HEXOQUINASA

4.1.	INTRODUCCIÓ	87
4.2.	RESULTATS	89
4.2.1.	Caracterització de les cèl·lules FTO-2B	89
4.2.2.	Sobreexpressió de la HK I, la GK, la LGS i la MGS mitjançant adenovirus	91
4.2.3.	Impacte metabòlic de la sobreexpressió de la HK I o la GK	94
4.2.4.	Impacte metabòlic de la sobreexpressió de la	

glicogen sintasa de múscul i de fetge	98
4.2.5. Impacte metabòlic de la sobreexpressió de la LGS o la MGS de manera concomitant amb la HK I o la GK	102
4.3. DISCUSSIÓ	105
5. CAPÍTOL 5: LA DIHIDROXIACETONA INDUEIX L'ACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA I LA SEVA TRANSLOCACIÓ VIA GLU-6-P EN HEPATÒCITS EN CULTIU	
5.1. INTRODUCCIÓ	109
5.2. RESULTATS	110
5.2.1. Efecte de la DHA en l'acumulació de glicogen	110
5.2.2. Efecte de la DHA sobre l'estat d'activació de la GS	112
5.2.3. Efecte de la DHA en la localització subcel·lular de la GS	114
5.2.4. Efecte de la sobreexpressió de la GS en hepatòcits incubats amb DHA o glucosa	117
5.2.5. Efecte de la sobreexpressió de la G6Pasa en hepatòcits incubats amb glucosa o DHA	122
5.2.6. Efecte de la sobreexpressió de la GK en hepatòcits incubats amb DHA o glucosa	124
5.3. DISCUSSIÓ	125
6. DISCUSSIÓ GENERAL	130
7. CONCLUSIONS	149
MATERIALS I MÈTODES	
1. TÈCNiques ESTÀNDARD DE BIOLOGIA MOLECULAR	153
1.1. PCR	153
1.2. Electroforesi de DNA	153
1.3. Clonatge	154
1.4. Quantificació de DNA	155
1.5. Transformació de cèl·lules competents	156
1.6. Obtenció de DNA plasmídic	158
1.7. Seqüenciació de DNA	161
2. CONSTRUCCIÓ DELS PLASMIDIS QUE CODIFIQUEN PER A LA RLGS I PER A LA GFP-RLGS	161
2.1. RLGS i fusió amb GFP	162
2.2. Preparació de plasmids per generar adenovirus recombinants	162

2.2.1. pACCMVpLpA-RLGS	162
2.2.2. pACCMVpLpA-GFP/RLGS	163
3. PREPARACIÓ D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS	164
3.1. Construcció de l'adenovirus ADCMV-RLGS, AdCMV-GFP/RLGS	164
3.2. Amplificació dels adenovirus	167
3.3. Titulació dels adenovirus	167
4. TRANSDUCCIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES	168
4.1. Co-precipitació del DNA amb fosfat càlcic	168
4.2. Transfecció mitjançant liposomes o dendrímers activats	168
4.3. Infecció de cèl·lules en cultiu amb adenovirus recombinants	169
5. ANIMALS	170
6. CULTIU PRIMARI D'HEPATÒCITS DE RATA	170
7. CULTIU CEL·LULAR DE LÍNIES ESTABLES	172
7.1. Cèl·lules 293	172
7.2. Cèl·lules FTO-2B	172
7.3. Metodologia de cultiu de línies cel·lulars	172
8. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES	173
8.1. Preparació d'extractes a partir de cèl·lules en cultiu	173
8.2. Determinació de l'activitat glicogen sintasa	173
8.3. Determinació d'activitat glicogen fosforilasa	176
8.4. Determinació d'activitats glucoquinasa i hexoquinasa	177
8.5. Determinació de l'activitat glucosa 6-fosfatasa	178
9. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS	179
9.1. Determinació de glicogen	179
9.2. Determinació de glucosa 6-fosfat	180
9.3. Determinació d'UDP-glucosa	181
9.4. Determinació de glucosa i lactat	182
10. DETERMINACIÓ DE FLUXES METABÒLICS	183
10.1. Incorporació de [U- ¹⁴ C]glucosa a glicogen	183
11. DETERMINACIÓ I SEPARACIÓ DE PROTEÏNES	184

11.1. Valoració de la concentració de proteïnes. Mètode de Bradford.	184
11.2. Tècnica del <i>Western blot</i>	184
11.2.1 Electroforesi en condicions desnaturalitzants	184
11.2.2. Transferència	185
11.3 Tinció amb vermell de Poinceau	186
11.4. Immunoblot	186
12. IMMUNOFLUORESCÈNCIA	187
13. MICROSCÒPIA CONFOCAL	188
BIBLIOGRAFIA	191
ANNEX	215

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS:

El metabolisme hepàtic del glicogen participa d'una manera important en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa a la sang dels organismes. En conseqüència, és important conèixer com es regulen els enzims que hi participen i quines interrelacions s'estableixen entre ells.

L'objectiu d'aquest treball és l'estudi del paper de la GS en el control de la síntesi hepàtica de glicogen i la seva relació amb d'altres enzims implicats en la mateixa via metabòlica. En el moment de començar aquest estudi es coneixia la importància qualitativa de la GS però no quantitativa. També es coneixia la importància quantitativa de la GK en el control d'aquesta via però es desconeixia quina relació s'establiria amb la GS. Per això, es va construir l'adenovirus codificant per a la GS hepàtica i per la GS hepàtica fusionada amb la GFP. Aquests virus i d'altres com el que dirigia l'expressió de la GK ens van permetre estudiar l'impacte metabòlic de la GS en hepatòcits en presència de glucosa i la seva relació amb l'activitat fosforiladora de glucosa. Els resultats ens van dirigir cap a l'esclariment de la relació que existia entre la GS hepàtica i les diferents activitats fosforiladores de glucosa a través de la Glu 6-P. Finalment, també ens vàrem interessar per conèixer el paper d'aquesta Glu 6-P quan s'originava de substrats gluconeogènics.

Introducció:

1. METABOLISME DEL GLICOGEN I VIES RELACIONADES.

La glucosa és la principal font d'energia de les cèl·lules. Aquest monosacàrid entra a la cèl·lula mitjançant un transportador que en facilita el seu pas a través de les membrana cel·lular i que varia en funció del teixit. Aquests transportadors difereixen en la seva afinitat per glucosa així com per la seva diferent capacitat de transport. Una vegada la glucosa ha entrat dins la cèl·lula és fosforilada. Aquesta reacció és catalitzada per una hexoquinasa, la qual també varia en funció del teixit. Una vegada s'ha format l'hexosa fosfat dins de la cèl·lula aquesta pot ser incorporada en diferents vies del metabolisme de la glucosa. Pot ser degradada a través de la glucòlisi per obtenir energia, pot ser emmagatzemada en forma de glicogen com a reserva d'energia o bé utilitzada per a la producció de pentoses fosfat i posterior síntesi, entre d'altres, de nucleòtids.

La glucosa 6-fosfat (Glu 6-P) és el primer intermediari del metabolisme de la glucosa per la glucòlisi, la síntesi de glicogen i la via de les pentoses fosfat, i un intermediari de la producció de glucosa per gluconeogènesi o degradació de glicogen. A més a més del seu paper com a intermediari, també es considera un metabòlit clau com a regulador al·lostèric de l'hexoquinasa (Wilson 1995), la glicogen sintasa (Villar-Palasi i Guinovart 1997) i la glicogen fosforilasa (Browner i Fletterick 1992) i s'ha demostrat que és un element important per determinar l'estat d'activació de la GS (Ciudad *et al* 1986 i Villar-Palasi i Guinovart 1997). Les principals entrades en el reservori de Glu 6-P són la captació de glucosa, procedent de la circulació, o bé, en determinats teixits com el fetge, la gluconeogènesi a partir de substrats com ara el lactat (Cicle de Cori), el glicerol i aminoàcids glucogènics (alanina). Aquest procés és conegut per alguns autors com la Glu 6-P neogènesi. Les sortides d'aquest reservori són la sortida de glucosa cap al torrent circulatori

(via glucosa 6-fosfatasa), la seva degradació cap a fragments de tres carbonis i finalment a CO_2 (glucòlisi i oxidació), la síntesi de pentoses fosfat, i per últim, el seu emmagatzemament com a glicogen.

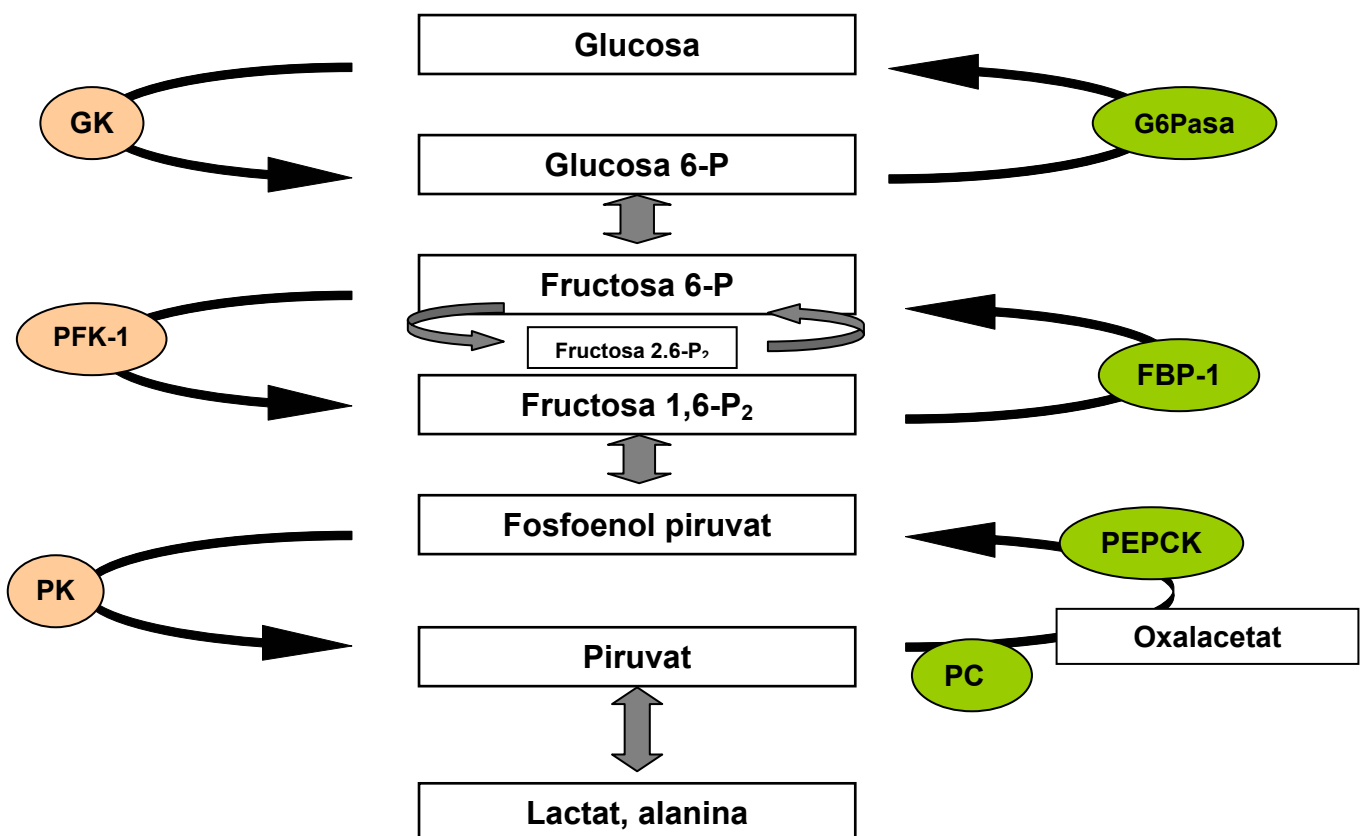
1.1. Glucòlisi i Gluconeogènesi.

La glucòlisi presenta tres característiques principals: es tracta de la ruta de degradació per la qual la glucosa és transformada a piruvat, que al seu torn té dues possibilitats. Quan la quantitat d'oxigen necessari per l'oxidació és insuficient, el piruvat és reduït a lactat per mantenir els nivells de NAD^+ (glucòlisi anaeròbia). En condicions aeròbies, el piruvat format per la glucòlisi és descarboxilat a acetil-CoA, que entra al cicle de Krebs on és oxidat a CO_2 i aigua. Una altra característica de la glucòlisi és que està integrada per molts processos que tenen lloc a través de diferents intermediaris. Aquests intermediaris són comuns a d'altres vies, com la de les pentoses fosfat. Els compostos intermediaris faciliten substrats per a la biosíntesi de diferents molècules com el triacilglicerol a partir del gliceraldehid 3-fosfat, la L-alanina a partir del piruvat i el glicogen a partir de la glucosa 6-fosfat (Mourrieras *et al* 1997, Bollen *et al* 1998). L'última característica de la glucòlisi és que s'acompanya de la formació d'ATP, encara que aquest representa la petita part de tot el que es pot obtenir per l'oxidació completa de la glucosa a CO_2 i aigua.

Les cèl·lules de mamífer poden utilitzar la glucosa com a font d'energia, ara bé, certs tipus de cèl·lules, com les neurones i els eritròcits en són absolutament dependents. Els mecanismes homeostàtics existeixen per tal d'evitar que els nivells de glucosa en sang disminueixin excessivament, de tal manera que protegeixen l'organisme de la hipoglicèmia durant els períodes de dejú. La gluconeogènesi, juga un paper fonamental en aquests mecanismes d'homeostasi de la glucosa i està intrínsecament relacionada amb el metabolisme del glicogen per la seva capacitat de generar Glu 6-P.

La major part de les reaccions involucrades en el procés de gluconeogènesi tenen lloc al citosol i molts dels enzims implicats són comuns als que participen a la glucòlisi. Aquests enzims catalitzen reaccions reversibles i properes a l'equilibri que es veuen afavorides en un sentit o altre en funció de l'estat metabòlic de la cèl·lula (Start i Newsholme 1970 i Okar *et al* 2001). Les etapes irreversibles són les responsables de la regulació del flux de les vies gluconeogèniques i glucolítiques: el pas de glucosa a Glu 6-P, el pas de fructosa 6-fosfat a fructosa 1,6-bisfosfat i per últim, el pas de piruvat a fosfoenol piruvat (Fig. 1). Aquestes reaccions són catalitzades per un enzim diferent en la glucòlisi i en la gluconeogènesi, de manera que s'estableixen cicles fútils. Quan una de les activitats és estimulada, o l'altre és inhibida s'aconsegueix un flux net en una o altra direcció. Així són set els enzims que determinen quina de les dues vies funcionarà.

Fig. 1 Etapes determinants de la glucòlisi i la gluconeogènesi.



El cicle glucosa/Glu 6-P és un dels més importants i participa tant en el control de la glucòlisi/gluconeogènesi com en el metabolisme del glicogen. Aquest cicle, és determinant per a la producció de glucosa hepàtica en situacions de dejuni i està regulat per dues activitats, la glucoquinasa (GK o Hexoquinasa IV) i la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa). El flux net que s'estableix com a balanç entre la G6Pasa i la GK determina la producció neta o captació de glucosa per part del fetge i és, per això, fonamental per a mantenir els nivells de glucosa en dejú, a l'igual que la tolerància a la glucosa exògena en les ingestes, és a dir en situacions d'hiperglicèmia postpandrial (Clore *et al* 2000 i Barzilai i Rossetti, 1993).

El segon cicle és el que s'estableix entre la fructosa 6-fosfat i la fructosa 1,6-bisfosfat on hi participen dues activitats enzimàtiques: la 6-fosfofructo 1-quinasa (PFK-1) i la fructosa 1,6-bisfosfatasa. El control d'aquest cicle en el fetge és responsabilitat d'un efector al·lostèric: la fructosa 2,6-bisfosfat, que activa el primer enzim i inactiva el segon. Els nivells d'aquest efector són regulats per un enzim bifuncional que presenta dues activitats catalítiques, una quinasa (PFK-2) i una fosfatasa (FBPasa-2) (Okar *et al* 2001). Durant els períodes de dejuni el cicle només funciona en sentit gluconeogènic ja que les concentracions de fructosa 2,6-bisfosfat són molt baixes i no són capaces d'activar la PFK-1 (Neely *et al* 1981). En canvi, quan els animals són realimentats es produeix un flux glucolític net, això es degut a un augment en els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat que activen la PFK-1 (Bartrons *et al* 1983 i Hue i Bartrons, 1985).

El tercer cicle és el que s'estableix entre el fosfoenolpiruvat i el piruvat. A diferència de l'anterior, aquest està format per tres activitats enzimàtiques. La L-piruvat quinasa (PK) que és l'enzim glucolític i que en el fetge és responsable de la transformació del fosfoenolpiruvat en piruvat. Per contra, la ruta gluconeogènica de transformació del piruvat a fosfoenolpiruvat està catalitzada per dos enzims. El primer, la piruvat carboxilasa (PC), és responsable de la transformació del piruvat en oxalacetat per incorporació

d'un residu carboxil. El segon, la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK), és responsable de la transformació de l'oxalacetat en fosfoenolpiruvat.

La L-piruvat quinasa es troba regulada a curt termini: pot ser inactivada covalentment per fosforilació depenent d'AMPc (Ljunstrom et al 1974) o bé la seva activitat pot ser modulada per efectors al·lostèrics: com l'ATP i l'alanina que l'inhibeixen, o la fructosa 1,6-bisfosfat que activa. Aquest enzim també pot ser regulat a llarg termini ja que els seus nivells augmenten amb una dieta rica en carbohidrats.

La piruvat carboxilasa és un enzim intramitocondrial format per un complex tetramèric de 500 kDa. Aquest enzim no presenta regulació covalent i la seva activitat fluctua segons els nivells intracel·lulars del seu substrat ja que la seva Km pel piruvat es troba dins del rang fisiològic. Només quan hi ha una elevada relació ATP/ADP o nivells alts d'acetil-CoA s'ha vist que l'activitat piruvat carboxilasa està estimulada (Jitrapakdee i Wallace 1999). En canvi, La PEPCK és una proteïna monomèrica l'activitat de la qual es regula pels nivells d'expressió. Així les dietes pobres en carbohidrats o el dejuni, n'estimulen l'expressió.

Les hormones, juguen un paper molt important en la regulació d'aquests enzims claus, ja sigui a curt termini (fosforilació i desfosforilació i/o efectors al·lostèrics) o a llarg termini (control de l'expressió gènica). Les hormones involucrades en aquests mecanismes de regulació són principalment la insulina i el glucagó. Així la insulina és la responsable d'estimular la síntesi de glicogen i de reprimir la gluconeogènesi mentre que el glucagó és responsable d'estimular la gluconeogènesi i la degradació del glicogen. De fet, l'activitat del promotor de la L-piruvat quinasa és inhibit pel glucagó a través de l'augment d'AMPc i s'estimula per glucosa i altres carbohidrats en presència d'insulina (Decaux et al 1989 i Casado et al 1995). El glucagó també estimula l'expressió de la PEPCK, tant per estabilització del transcrit com per estimulació de la transcripció del gen via factors de transcripció C/EBP (Jurado et al 2002). En canvi dietes riques en carbohidrats i la insulina

fan disminuir els nivells d'expressió del gen (Pilkis i Granner, 1992). Aquests nivells d'expressió són controlats per la insulina a través del coactivador PGC-1. En absència de l'hormona, el coactivador s'expressa i forma un complex amb el receptor de glucocorticoids o factor de transcripció HNF-4 (*hepatic nuclear factor 4*) per actuar sobre el promotor de diferents gens implicats en la gluconeogènesi (Yoon *et al* 2001).

1.2. Síntesi de glicogen.

En aquest treball, ens concentrarem en el metabolisme del glicogen com a destí final de la Glu 6-P, tant procedent de glucosa captada del medi com de gluconeogènesi. El glicogen és la principal reserva d'energia de ràpida mobilització en els teixits i està format per molècules de glucosa (Meléndez *et al* 1999). Aquest polisacàrid es troba principalment en el fetge i en el teixit muscular. El fetge, és el teixit de l'organisme que presenta un major contingut relatiu de glicogen respecte d'altres teixits, i pot arribar a ser un 6 % del seu pes. El múscul, en canvi, presenta un contingut de glicogen molt menor per unitat de massa de teixit, al voltant del 0,5 %, ara bé, la massa muscular és molt més gran que no pas la del fetge. Per tant, el glicogen emmagatzemat al múscul d'un organisme pot arribar a ser aproximadament el doble que el del fetge.

El metabolisme del glicogen presenta notables diferències entre el múscul i el fetge. Aquestes diferències s'expliquen pel paper fisiològic que juga aquest polímer en cada teixit. Al múscul la funció del glicogen és la de reserva d'energia per a la contracció muscular, mentre que al fetge la seva funció és mantenir els nivells de glucosa en sang estables.

El glicogen hepàtic és, doncs, la principal reserva per acumular l'excés de glucosa que es produeix amb la ingesta. En la fase post absorptiva, aquest és degradat per tal d'alliberar glucosa. A mesura que avança el dejú, les reserves de glicogen disminueixen i cal procedir a la síntesi de glucosa per

gluconeogènesi. S'han descrit dues vies de síntesi de glicogen a partir de glucosa que són: la via directa i la indirecta.

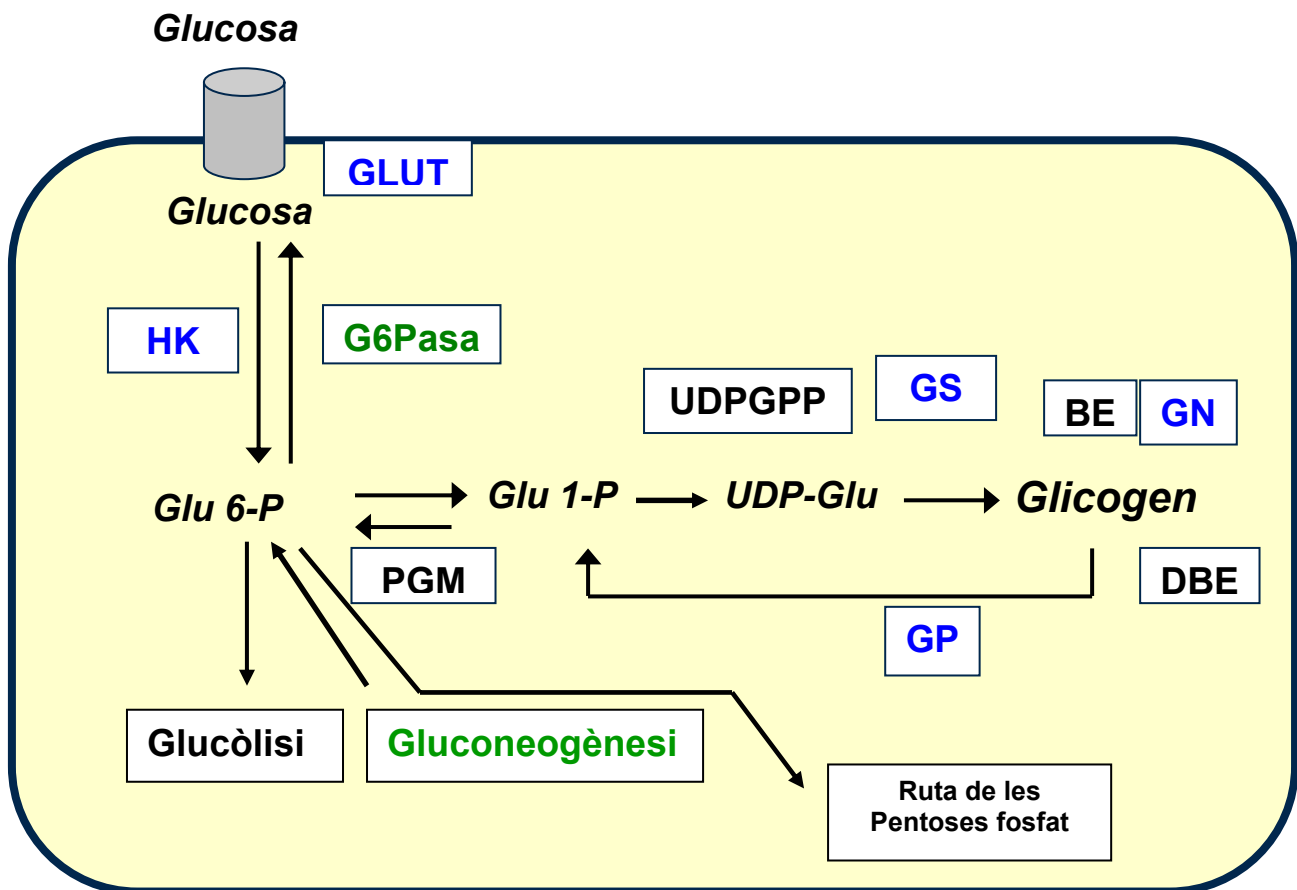
1.2.1. Síntesi de glicogen: via directa.

La via directa de síntesi de glicogen (Katz i McGarry 1984, Newgard *et al* 1984) es produeix a través d'un mecanisme general que es dona en tots els teixits (Smythe i Cohen 1991 i Alonso *et al* 1995). Des de l'entrada de la glucosa a l'interior cel·lular, fins a la seva incorporació al glicogen, aquest monosacàrid experimenta diferents transformacions que condueixen a l'activació de la posició C-1 de la molècula. Per ordre cronològic, aquestes són les diferents transformacions (Fig. 2): la glucosa és convertida a Glu 6-P per acció d'una hexoquinasa, després és isomeritzada a glucosa 1-fosfat per acció de la fosfoglucomutasa. Posteriorment, es produeix la seva conversió a UDP-Glu per acció de la UDP-glucosa-pirofosforilasa. Aquest enzim intercanvia el fosfat de la posició C-1 de la glucosa 1-fosfat per UDP. L'energia de l'enllaç fosfoglicosil de l'UDP-glucosa és utilitzada per la glicogen sintasa (GS) per catalitzar la incorporació de la glucosa al glicogen preexistent mitjançant un enllaç α -1,4 (Leloir i Cardini 1957). Aquest enzim utilitza com a substrat la UDP-glucosa així com l'extrem no reductor d'una molècula de glicogen. Les ramificacions que presenta el glicogen i que consisteixen en unions glucosídiques α -1,6 són fruit de l'acció de l'amilo-(1,4-1,6)-transglicosilasa, també anomenat enzim ramificador. Aquest transfereix un fragment terminal de 6-7 residus de glucosa (des d'un polímer de com a mínim 11 residus de glucosa) cap a la posició C-6 hidroxil d'un residu de glucosa intern (Bollen *et al* 1998).

Durant molts anys es desconeixia l'origen del precursor de la molècula de glicogen. D'uns anys ençà sabem que la glicogenina té aquesta funció (Lomako *et al* 1988, Calder *et al* 1986 i Smythe i Cohen 1991). Aquesta proteïna, de 37-40 kDa, té la propietat de catalitzar la seva pròpia glicosilació fins a formar un polímer de vuit a deu residus de glucosa. Aquest polisacàrid

primari, unit a la glicogenina, actua com a precursor per a la glicogen sintasa (Skurat *et al* 1997). Recentment s'ha identificat una nova proteïna que s'uneix a la glicogenina i l'activa, la GNIP (*glycogenin interacting protein*), que podria ser un nou participant en el mecanisme d'iniciació de la síntesi de glicogen (Skurat *et al* 2002).

Figura 2. Esquema del metabolisme del glicogen en fetge i en múscul. En color **blau** aquelles proteïnes per les quals hi ha una isoforma hepàtica i una de muscular, en **verd** aquelles proteïnes o rutes metabòliques del fetge.



GLUT	Transportador de glucosa
HK	Hexoquinasa
G6Pasa	Glucosa 6-fosfatasa
PGM	Fosfoglucomutasa
UDPGPP	UDP-pirofosforilasa
BE	Enzim ramificador
DBE	Enzim desramificador
GN	Glicogenina
GP	Glicogen fosforilasa
GS	Glicogen Sintasa

1.2.2. Síntesi de glicogen: via indirecta

En el fetge, el glicogen es pot sintetitzar a través del què es coneix com la via de síntesi indirecta. Aquesta via de síntesi es produeix en el fetge per què disposa de tots els enzims que permeten sintetitzar glucosa a partir de substrats de tres carbonis. En aquest cas, la síntesi de glicogen implica que la glucosa es fosforili generant Glu 6-P i que aquesta sigui degradada a través d'etapes glucolítiques (Katz i McGarry 1984, Newgard *et al* 1984). Els intermediaris generats són incorporats a la gluconeogènesi. Després de les successives etapes gluconeogèniques, tenim la formació de Glu 6-P. Aquesta és utilitzada com a precursor per a la síntesi de glicogen seguint etapes similars a les descrites per la via directa. La importància d'aquesta via ha estat demostrada utilitzant l'àcid 3-mercaptocolínic que bloqueja el flux a través de la PEPCK. Alguns autors han observat que la síntesi de glicogen postpandrial es troba disminuïda en presència d'aquest àcid, demostrant que la síntesi de glicogen és molt dependent d'algun component gluconeogènic que pot actuar bé com a substrat o bé com a senyal (Newgard *et al* 1984). El més sorprenent és que davant d'una ingesta de glucosa, una gran fracció del glicogen del fetge es sintetitza per la via indirecta, tal i com es mostra en diferents espècies (Radziuk 1982, Shikama *et al* 1978 i Katz *et al* 1979).

1.3. Degradació de glicogen.

La síntesi és una de les vies importants del metabolisme del glicogen però també ho és la seva degradació. El glicogen està implicat en el procés de regulació de la captació i d'alliberació de glucosa al torrent circulatori. La direcció i la magnitud dels fluxos cap a glicogen són determinants, per exemple en el fetge, per establir si la cèl·lula capta glucosa o n'allibera en situacions de dejú (Jahoor *et al* 1990 i Clore *et al* 1991).

La degradació del glicogen succeeix per acció de la glicogen fosforilasa (GP). L'acció de la GP és la d'alliberar un residu de glucosa unit a través de l'enllaç α -(1,4) a una molècula de glicogen. El producte d'aquesta reacció és una molècula de glucosa 1-fosfat.

La glucosa 1-fosfat produïda per l'acció de la fosforilasa es converteix en Glu 6-P per acció de l'enzim fosfoglucomutasa. Una altra conseqüència de l'alliberació de la glucosa fosforilada és que aquesta no difon lliurement a través de la membrana de la cèl·lula. En el cas de les cèl·lules de múscul, això és molt important ja que la funció de la via de degradació del glicogen és subministrar substrat per a la glucòlisi.

La GP no pot eliminar del glicogen els residus de glucosa units a través d'enllaços α -1,6. Per això, l'activitat GP s'atura 4 residus abans d'arribar al punt d'inici de la ramificació, l'eliminació del qual requereix de l'acció de l'enzim desramificador. Aquest enzim posseeix dues activitats: glucosiltransferasa i glucosidasa. L'activitat transferasa elimina els tres residus terminals de glucosa de la ramificació i els uneix l'hidroxil del carboni C-4 lliure de l'extrem d'una altra branca. La glucosa unida per enllaç α -(1,6) a la ramificació pot ser aleshores alliberada per acció de la glucosidasa. Aquest residu de glucosa no està fosforilat ja que la reacció catalitzada per la glucosidasa no és fosforolítica.

2. MECANISMES DE REGULACIÓ DE LA METABOLISME DEL GLICOGEN HEPÀTIC

La regulació de la síntesi de glicogen presenta diferències importants entre el fetge i el múscul. Aquestes diferències es troben tant en l'enzim responsable de la síntesi de glicogen (GS) així com en d'altres elements.

El transport de glucosa és el primer dels elements diferencials entre ambdós teixits. En el fetge hi ha un flux bidireccional de glucosa a través de la membrana plasmàtica, gràcies a l'acció d'un transportador de glucosa, GLUT-2, que permet la difusió facilitada del monosacàrid (Thorens *et al* 1990). En canvi, el transportador de glucosa característic del múscul, GLUT-4, es troba altament regulat i per tant, l'entrada de glucosa només es produeix en determinades condicions. Només en presència d'insulina GLUT-4 es mobilitza des de vesícules intracel·lulars cap a la membrana plasmàtica on realitzarà les seves funcions (Watson i Pessin 2001 i Ros-Baró *et al* 2001).

Una vegada la glucosa entra dins la cèl·lula és fosforilada. Aquesta reacció està catalitzada per una activitat hexoquinasa (n'hi ha fins a 4 isoformes), ara bé, cada teixit presenta una combinació determinada d'isoformes que són les responsables d'aquest procés. És important destacar que en el cas del múscul, l'enzim responsable de fosforilar la glucosa és majoritàriament l'HK I (75%) (Wilson 1998). Mentre que en fetge, l'enzim responsable d'aquest procés és majoritàriament la GK (95%) (Cárdenas 1995), un enzim amb una menor afinitat per glucosa que la HK I.

Les dues isoformes majoritàries de GS de mamífers són les de múscul i fetge. La majoria dels teixits expressen la primera, mentre que la de fetge sembla ser teixit específica (Roach *et al* 1998). Ambdues isoformes presenten un 70% d'identitat en la seva seqüència d'aminoàcids. Els extrems N- i el C- terminals són els que presenten un menor grau de similitud (Bai *et al* 1990 i Skurat *et al* 1994)). Ambdues isoformes presenten una distribució

intracel·lular diferent en absència o en presència de glucosa (Fernández-Novell *et al* 1997 i Ferrer *et al* 1997).

En mamífers, trobem fins a tres isoformes de GP que reben el nom d'aquell teixit en el que preferentment s'expressen: la de múscul, la de cervell i la de fetge (Browner i Fletterick 1992) que estan codificades per gens diferents. Els diferents isoenzims presenten diferents mecanismes de regulació al·lostèrica. Les formes de múscul i de cervell presenten activació al·lostèrica per AMP i són inhibides per Glu 6-P. En canvi, l'enzim de fetge principalment presenta regulació covalent i no al·lostèrica. Només la unió de la glucosa al centre catalític provoca la inhibició de l'enzim i n'afavoreix la inactivació per desfosforilació (Stalmans *et al* 1987). Totes aquestes observacions suggereixen l'existència de diferències significatives entre els mecanismes moleculars de control de la síntesi de glicogen al múscul i al fetge.

Les isoformes hepàtiques dels enzims implicats en el metabolisme del glicogen permeten al fetge actuar com a sensor de glucosa. La glucoquinasa, l'isoenzim fosforilador de glucosa predominant en hepatòcits i en les cèl·lules α i β del pàncreas, és considerada un sensor de glucosa. Així, la GK produeix la Glu 6-P, un metabòlit essencial per a l'activació de la GS alhora que un precursor de la síntesi de glicogen (Villar-Palasi i Guinovart 1997). Aquest mecanisme només es dispara quan la concentració de glucosa en sang és superior a 5 mM, ja que a nivells inferiors no hi ha flux a través de la GK degut a la seva elevada $S_{0.5}$ per glucosa i a l'acció de la proteïna reguladora, que disminueix l'activitat de la GK. Això fa que la LGS només estimuli la síntesi de glicogen a altes concentracions de glucosa. En aquestes circumstàncies la glucosa també inactiva la GP hepàtica i facilita l'acumulació de glicogen. Totes aquestes diferències fan que sigui difícil parlar d'un mecanisme comú de regulació en ambdós teixits.

2.1. La Glucoquinasa i la seva proteïna reguladora.

La GK (hexoquinasa IV,) s'expressa al fetge i en cèl·lules β i α del pàncreas. La GK, degut a la seva baixa afinitat per glucosa, està implicada en el paper de sensor de les concentracions de glucosa en aquests dos òrgans (Matchinsky 1990). L'acció de la GK es veu afavorida per la presència en l'hepatòcit del transportador de glucosa GLUT-2 que facilita la difusió de la glucosa a través de la membrana plasmàtica i que té una elevada capacitat de transport (Thorens *et al* 1990). El seu rellevant paper en la homeostasis de la glucosa s'ha fet palès gràcies al descobriment que alguns tipus de MODY (maturity onset diabetes of the young) estan associades a mutacions en aquest enzim (Froguel *et al* 1992 i Miller *et al* 1999). Així, mutacions en la GK que disminueixen la seva activitat provoquen una disminució en la secreció d'insulina (Byrne *et al* 1994), a l'igual que en el metabolisme hepàtic de la glucosa i la síntesi de glicogen en particular (Velho *et al* 1996). L'eliminació del gen de la GK en la cèl·lula beta de forma específica és letal pels animals. Aquests moren al cap de pocs dies de néixer a causa d'una diabetis severa. En canvi, l'eliminació del gen de la GK en fetge provoca una diabetis lleugera, amb una moderada hiperglicèmia i una secreció d'insulina defectuosa (Postic *et al* 1999).

L'activitat de la GK en fetge està modulada per la presència d'una proteïna reguladora (GKRP) (van Schaftingen *et al* 1989 i van Schaftingen *et al* 1994). En presència de fructosa 6-fosfat, la GKRP s'uneix a la GK formant un complex inactiu. El complex se separa en presència de fructosa 1-fosfat o glucosa. Això implica una desinhibició de la GK i, per tant, un increment en la quantitat de glucosa captada pel fetge.

La GKRP s'associa a la GK al nucli de l'hepatòcit, lloc on la GK transloca quan els nivells de glucosa són baixos. La *translocació* al citoplasma es produeix quan les concentracions de glucosa (i/o la fructosa) són altes, per exemple en estat postpandrial. La localització o segrest al nucli de la GK pot

esdevenir un mecanisme per tal de minimitzar el cicle fútil que existeix entre glucosa i Glu 6-P (Agius *et al* 1996). A més a més, tant la GK nuclear com productes del metabolisme de la glucòlisi poden tenir un paper en l'expressió d'altres enzims (Towle 1995). La GK també té un efecte en la síntesi de glicogen ja que la sobreexpressió de la GK, però no de la HK I, en hepatòcits, s'ha vist que afavoreix la deposició de glicogen (Seoane *et al* 1996 i Gomis *et al* 2000). Els nivells d'aquest enzim estan regulats hormonalment; l'insulina incrementa la transcripció de GK, mentre que el glucagó, via AMPc, la disminueix (Iynedjian *et al* 1987 i Iynedjian 1993). Aquestes accions formen part de la resposta de captació de glucosa postpandrial.

2.2. La Glucosa 6-Fosfatasa.

La glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) és un complex enzimàtic situat al reticle endoplasmàtic (Mithieux, 1996). Compren una hidrolasa (35 kDa), el centre catalític de la qual es troba al lumen del reticle endoplasmàtic, i una translocasa que és la responsable del transport transmembrana del substrat, Glu 6-P, i, probablement, dels productes: glucosa i fosfat inorgànic (Gerin *et al* 1997). Es tracta d'un enzim crític en l'últim pas de la producció de glucosa, tant per la via gluconeogènica com de la via de degradació del glicogen. Hi ha evidències que indiquen que l'activitat G6Pasa està disminuïda després d'una ingesta de carbohidrats i aquesta disminució s'atribuïa en part a la insulina (Newgard *et al* 1984, Minassian *et al* 1995 i Steeper *et al* 1997). Recentment, s'ha demostrat que els nivells de G6Pasa són regulats per insulina a través del factor de transcripció Foxo-1 i que aquesta regulació està alterada en la diabetis (Nakae *et al* 2001). A part de la regulació per insulina, l'expressió de la G6Pasa està estimulada per glucosa (Massillion, 2001) i leptina. En el cas de la glucosa, tot i la paradoxa aparent, sembla que la funció que faria seria mantenir uns nivells apropiats de Glu 6-P enfront d'uns nivells alts d'activitat GK (Aiston *et al* 1999).

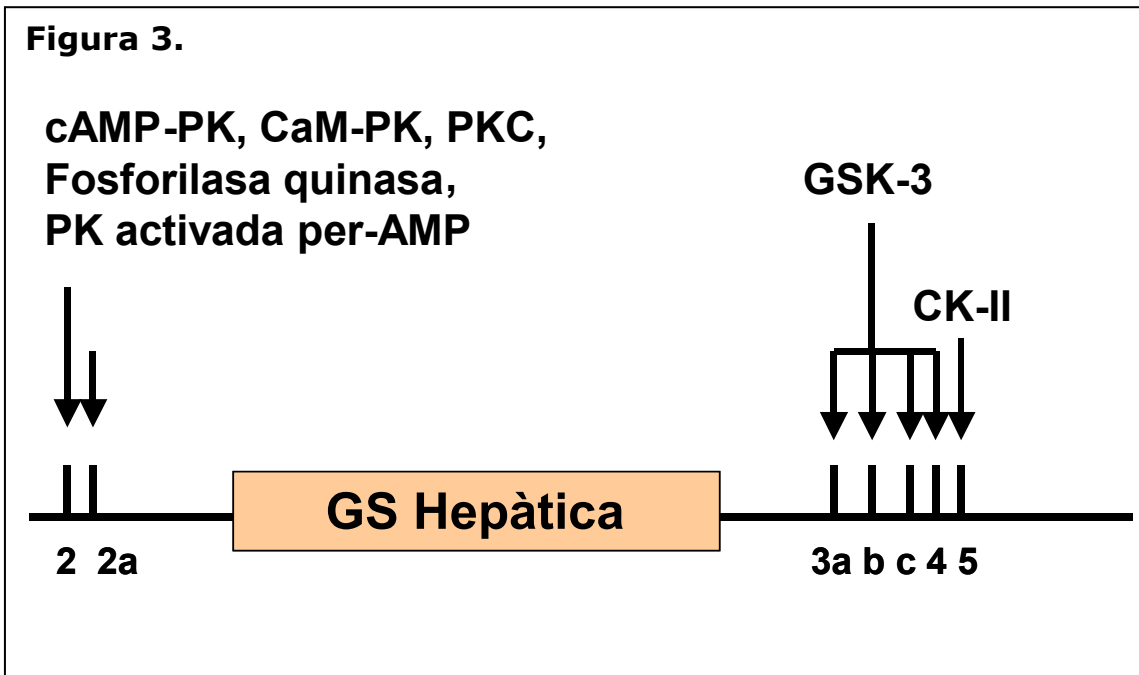
2.3. La Glicogen Sintasa hepàtica.

La GS hepàtica és un enzim l'activitat del qual està regulada per fosforilació en múltiples residus de serina situats a prop dels extrems N- i C-terminals (Fig. 3). *In vivo*, la GS hepàtica pot ser fosforilada com a mínim en sis llocs, i aquesta fosforilació en redueix l'activitat degut a una disminució de la V_{max} (Roach 1990 i Roach *et al* 1991). A més a més, la GS presenta un mecanisme de regulació al·lostèrica per Glu 6-P. L'activitat de la glicogen sintasa es mesura en absència i presència de Glu 6-P. En presència de la Glu 6-P es mesuren totes les formes de GS presents mentre que en absència només aquelles formes de l'enzim desfosforilades i per tant actives. Aquesta relació d'activitats és, doncs, funció del nivell de fosforilació de l'enzim. Antigament, es considerava la forma activa de la GS com sintasa *a* o I i la fosforilada i dependent de Glu 6-P. com a forma *b* o D (Villar-Palasi i Guinovart 1997).

In vitro, la glicogen sintasa hepàtica pot ser fosforilada per varies proteïnes quinases incloent la proteïna quinasa A (depenent de AMPc), la fosforilasa quinasa, la proteïna quinasa C (PKC), la Ca^{2+} -calmodulina, la caseïna quinasa II (CK-II), la glicogen sintasa quinasa-3 (GSK-3) i la proteïna quinasa estimulada per AMP (PKA) (Roach 1986 i Roach 1990). Cadascuna d'aquestes fosforilacions es produeix en residus de serina diferents que poden portar a un increment progressiu de l'estat de fosforilació de la sintasa.

Els efectes d'aquesta fosforilació porten a:

1. Disminució de la $V_{màx}$.
2. Una disminució de l'afinitat per la Glu 6-P



L'activació de la sintasa requereix la seva desfosforilació. Aquesta es du a terme predominantment per acció de les proteïnes fosfatases de tipus 1 (PP-1). Les mateixes fosfatases involucrades en la desfosforilació de la glicogen fosforilasa (GP). Aquestes fosfatases de tipus 1 (PP-1) estan formades per una subunitat reguladora, específica de teixit, i una altra catalítica, ubiqua (Bollen *et al* 2001).

En el fetge s'expressen fins a tres formes diferents de subunitats reguladores de fosfatases, que presenten un tamany inferior a la seva homòloga de múscul degut a la manca d'un domini d'interacció amb el reticle endoplasmàtic (Newgard *et al* 2000). Cap d'aquestes isoformes de fetge s'ha descrit que presenti regulació per fosforilació. Les subunitats reguladores de la PP-1 promouen la desfosforilació de substrats associats al glicogen de varies maneres: uneixen la subunitat catalítica de la PP-1 al glicogen en el qual, s'hi uneixen la GS, la GP i la fosforilasa quinasa (Printen *et al* 1997 i Armstrong *et al* 1997). A més a més, una d'aquestes tres subunitats reguladores, la PTG (*protein targeting to glycogen*) permet la interacció de la

subunitat catalítica de la fosfatasa així com dels seus substrats (Fong *et al* 2000). Segon, facilita l'acció específica de la fosfatasa sobre els seus substrats, i per últim, les subunitats reguladores disminueixen l'afinitat de les subunitats catalítiques de la fosfatasa cap a inhibidors citoplasmàtics com l'inhibidor-1 o el 2 (Brady *et al* 1997, Brady *et al* 1997). En el fetge les dues subunitats reguladores més importants en la regulació de la síntesi de glicogen són la G_L i la PTG (R5). La PTG facilita la inactivació de la GP i l'activació de la GS i la seva interacció amb aquestes proteïnes permet una eficient activació de la síntesi de glicogen (Berman *et al* 1998).

La insulina juga un paper clau a l'hora de generar unes condicions òptimes per tal que es pugui produir la síntesi del glicogen hepàtic. La insulina modula l'acumulació de glicogen i indueix l'activació de la GS (Ciudad *et al* 1981): la unió de la insulina a la subunitat α del seu receptor activa una tirosina-quinasa associada a la subunitat β del mateix, la qual s'autofosforila i fosforila l'IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*). Aquesta fosforilació, en tirosina, genera en IRS-1 uns dominis d'unió a d'altres proteïnes coneguts amb el nom de SH2 (Saltiel i Kahn 2001). Aquesta fosforilació activarà una cascada de senyals amb múltiples conseqüències per la cèl·lula. Una de les últimes proteïnes d'aquesta cascada és la PI3-quinasa (Fosfatidil inositol 3-quinasa), la qual és activada per acció de l'hormona i converteix el PIP₂ (fosfatidil inositol difosfat) en PIP₃ (fosfatidil inositol trifosfat). Aquest últim s'uneix a la proteïna quinasa B i la recluta cap a la membrana plasmàtica on fosforila i activa dues Ser/Thr quinases anomenades PDK-1 i PDK-2 (*phosphoinositide-dependent kinase*) (Fasshauer *et al* 2001, Cohen *et al* 1997). Les PDK, seguidament fosforilen i activen la proteïna quinasa B (PKB/AKT) i les isoformes atípiques de la proteïna quinasa C: PKC ζ i PKC ι (Fasshauer *et al* 2001, Méndez *et al* 1996). Un dels substrats finals de la PKB és la glicogen sintasa quinasa-3 la qual és inactivada per fosforilació. El resultat és una menor fosforilació de la GS (Fasshauer *et al* 2001).

En l'hepatòcit, la insulina estimula la utilització de la glucosa i el seu emmagatzematge cap a lípids o glicogen i, reprimeix la síntesi de glucosa i la

seva alliberació. Aquest efecte el fa a través d'una regulació coordinada de l'activitat i els nivells dels enzims implicats en aquestes vies. La insulina estimula l'expressió dels gens que codifiquen per enzims glucolític o de la síntesi d'àcids grassos i, en canvi, reprimeix l'expressió d'aquells que codifiquen per enzims gluconeogènics. Aquests efectes els realitza mitjançant una sèrie de factors de transcripció o cofactors que inclouen l'SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*)(Brown i Goldstein 1999), el factor nuclear hepàtic 4 (HNF-4)(Stoffel i Duncan 1997), la família forkhead (Fox)(Nakae *et al* 2001) i el coactivador de PPAR- γ (PGC-1)(Yoon *et al* 2001). A més a més, l'hormona també regula l'activitat d'alguns enzims com la GS, a través de canvis en l'estat de fosforilació. La presència de la insulina és important per a l'expressió de la GK i també de la subunitat reguladora G_L de la PP-1, de tal manera que explicaria per què hi ha nivells baixos de glicogen en animals deficients en insulina (Bollen *et al* 1998 i Doherty *et al* 1998). Encara que es desconeix el mecanisme pel qual la insulina activa les PP-1 associades a glicogen, se sap que inhibidors de la PI3-quinasa bloquegen aquest efecte, suggerint que aquestes quinases i podrien estar involucrades (Saltiel i Kahn 2001).

En hepatòcits aïllats, la glucosa o algun metabòlit derivat també és capaç d'induir canvis en la distribució intracel·lular de la GS de fetge o múscul, deixant de banda el seu efecte sobre l'estat d'activació. Així, en resposta a la glucosa, la GS *transloca* des d'una fracció soluble a la fracció que sedimenta a baixa força centrífuga. (Fernández-Novell *et al* 1992, Fernández-Novell *et al* 1994 i Fernández-Novell *et al* 1996). Més recentment s'ha demostrat que la incubació d'hepatòcits de rata aïllats amb glucosa causa l'acumulació de la GS a la perifèria de la cèl·lula, on sembla que es produeix un increment en la marca de col·localització amb els filaments d'actina (Fernández-Novell, *et al* 1997). Aquest fenomen també s'ha observat en hepatòcits en cultiu primari (García-Rocha *et al* 2001). Aquesta *translocació* de la GS és reversible i l'activació covalent de l'enzim no és suficient per induir-la (García-Rocha *et al* 2001). Inicialment, el glicogen se sintetitza a les proximitats de la membrana

plasmàtica i els dipòsits del polisacàrid creixen des de la perifèria cap a l'interior de la cèl·lula.

Aquestes dades suggereixen que la síntesi de glicogen induïda per glucosa o algun derivat requereix de l'activació, i alhora, de la *translocació* o el moviment subcel·lular de determinats enzims. Alguns autors s'atreveixen a especular amb la possible formació d'un complex d'iniciació de glicogen consistent en la GK, la glicogenina, i la GS (Bollen et al 1998) i d'altres suggereixen que també s'hi podria trobar la PTG o alguna altre subunitat reguladora de les fosfatases (PP-1) (Newgard et al 2000).

2.4. La Glicogen Fosforilasa hepàtica.

La GP hepàtica és un enzim l'activitat del qual és regulable per modificacions covalents (fosforilació i desfosforilació). En particular, la forma *b* inactiva és convertida en la forma *a* per fosforilació per la fosforilasa quinasa del residu Ser¹⁴ (Browner i Fletterick 1992). L'enzim modificat es coneix com a GP-a. La conformació activa és estimulada *in vitro* per la unió de AMP i inhibida per la unió de ATP o glucosa 6-fosfat tot i que, *in vivo*, per la isoforma hepàtica, sembla que aquest canvi de conformació no és possible sense la presència de la fosforilasa quinasa i per tant aquests efectors juguen un paper secundari (Clark i Haynes 1988). L'activitat relativa de l'enzim GP no modificat és suficient per generar la glucosa 1-fosfat necessària per a la glucòlisi i produir suficient ATP per mantenir els nivells d'activitat de la cèl·lula en repòs. Això és veritat tant per a les cèl·lules del múscul com del fetge.

En resposta a nivells baixos de glucosa a la sang, les cèl·lules α del pàncreas segreguen glucagó. Les cèl·lules hepàtiques són la primera diana de l'acció de l'hormona peptídica. La resposta de les cèl·lules a la unió del glucagó als seus receptors és l'activació de adenilat ciclase que es troba

associat al receptor. L'activació de l'adenilat ciclasa condueix a l'increment dels nivells de AMPc, el qual, en funció de missatger secundari, s'uneix a la proteïna quinasa dependent de AMPc o PKA. Aquesta, aleshores, pot fosforilar la fosforilasa quinasa. La fosforilació de la fosforilasa quinasa activa l'enzim, el qual al seu torn fosforila la forma *b* de la GP. Aquesta fosforilació augmenta la seva activitat de degradació de glicogen. El resultat últim és una inducció de la degradació del glicogen en resposta a la unió del glucagó amb el seu receptor (Bollen *et al* 1998).

Aquesta mateixa seqüència d'esdeveniments és la que també succeeix en les cèl·lules musculars. Ara bé, en aquestes cèl·lules l'activació de la cascada és resultat de la unió de l'adrenalina als receptors de la superfície de les cèl·lules musculars. L'adrenalina és alliberada per les glàndules adrenals en resposta a senyals neuronals que indiquen un requeriment elevat de glucosa per part del múscul.

La regulació de l'activitat fosforilasa quinasa està afectada per mecanismes que impliquen ions de calci. Aquests regulen la fosforilasa quinasa a través d'una de les subunitats que formen aquest enzim. Aquesta subunitat de l'enzim és la calmodulina a la qual, la unió del calci li provoca un canvi conformacional que alhora estimula l'activitat catalítica de la fosforilasa quinasa cap al seu substrat la GP-b.

3. CONTROL DE LA SÍNTESI DEL GLICOGEN HEPÀTIC.

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori han permès determinar que la sobreexpressió de GK, però no la de HK I, condueix a l'acumulació de glicogen en hepatòcits encara que, també implica un augment important en la producció de lactat (Seoane *et al* 1996). Així doncs, l'increment de la Glu 6-P procedent de l'acció de la GK és capaç d'estimular en aquestes cèl·lules tant la deposició de glicogen com la glucòlisi. L'objectiu que s'ha plantejat en aquesta tesi, era determinar com està distribuït, en hepatòcits, el control del metabolisme del glicogen entre aquests dos enzims. A tal fi s'ha construït l'adenovirus que codifica per la glicogen sintasa de fetge de rata (RLGS). S'ha utilitzat aquest adenovirus recombinant que codifica per la GS hepàtica de rata i el que codifica per la GK per a sobreexpressar aquests dos enzims, en hepatòcits de rata en cultiu, de manera combinada o bé independent per a cadascun dels enzims.

El coeficient de control és una mesura del flux d'una via quan hi ha una variació en els nivells o bé de proteïna o bé d'activitat enzimàtica i ens mostra la importància d'un enzim en el control d'una determinada via metabòlica (Kacser i Burns 1979 i Fell 1992). La suma dels coeficients de control d'una via és la unitat (Kacser i Burns 1979). En el cas de les vies sense ramificacions, tots els enzims tenen un coeficient de control positiu. Això implica, segons el teorema de la sumació, que tots els enzims tindran un coeficient de control menor que la unitat. En el cas de les vies metabòliques ramificades, un enzim en un punt de ramificació que competeix pel substrat o un inhibidor, tenen un coeficient de control negatiu (Cornish-Bowden 1995).

L'anàlisi del control metabòlic mostra que la síntesi de glicogen presenta una alta sensibilitat a l'activitat GK (Agius *et al* 1996). S'ha descrit que per la síntesi de glicogen a partir de glucosa, la GK hepàtica presenta un elevat

coeficient de control, positiu i major que la unitat. A més a més aquest és més elevat a baixes concentracions de glucosa. Aquest fenomen s'explica perquè en aquestes condicions existeix una menor quantitat de GK lliure, o altrament considerada activa (Agius *et al* 1996). La GKRP, en canvi té un coeficient de control per a la síntesi de glicogen negatiu, compensant d'aquesta manera l'elevat coeficient de control positiu de la GK ja que actua com a inhibidor i limita la quantitat de GK disponible per fosforilar glucosa (de la Iglesia *et al* 2000). La G6Pasa presenta un coeficient de control negatiu sobre la síntesi de glicogen a partir de glucosa de manera que contraresta el control exercit per la GK (Aiston *et al* 1999). La GP, també té un coeficient de control negatiu i molt elevat sobre la síntesi de glicogen a partir de glucosa tot i que és dependent d'altres enzims de la via com la GK. Aquest control s'ha postulat que s'exerceix a través de la regulació de l'activació de la GS, tanmateix aquest mecanisme no és suficient per a explicar l'elevat coeficient de control de la GP i s'especula que la regulació de la translocació de la GS per la GP també hi podria tenir un paper important (Aiston *et al* 2001). Així és important quantificar el control que exerceix la GS en la síntesi de glicogen, determinant el coeficient de control d'aquest enzim. Aquest ens permetrà comprendre les relacions que s'estableixen entre els diferents enzims de la via d'una manera quantitativa (Cascante *et al* 2002).

La sobreexpressió en hepatòcits de diferents enzims mitjançant adenovirus ha permès aconseguir un ampli espectre d'expressió de les diferents proteïnes; i ha esdevingut per tant una eina molt útil per aquests estudis (Seoane *et al* 1997, Aiston *et al* 2001). De fet, la sobreexpressió de la GKRP o la GP han estat utilitzades pel càlcul del coeficient de control d'aquestes proteïnes (de la Iglesia *et al* 2000, Aiston *et al* 2001). Les característiques biològiques que presenten els adenovirus els fan molt útils com a vectors de transferència gènica als hepatòcits en cultiu (Berkner, 1992 o Graham i Prevec, 1995). L'eficiència de transfecció dels adenovirus és de més d'un 95% en les condicions de treball del laboratori, la qual cosa ens permet assolir nivells de sobreexpressió adients per a realitzar els estudis d'impacte metabòlic de la proteïna d'interès.

Hem trobat que la sobreexpressió de la GS en hepatòcits en cultiu de rata té un impacte metabòlic restringit a l'acumulació de grans quantitats de glicogen en presència de glucosa. En canvi, la sobreexpressió de la GK comporta un increment en els nivells de Glu 6-P, que es tradueix en un notable increment en les vies de síntesi de glicogen i glucòlisi. L'efecte sobre la síntesi de glicogen es additiu quan es sobreexpressen alhora la GK i la GS, això evidència que existeix un mecanisme de control compartit.

4. ACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA PER GLUCOSA.

Durant molt de temps s'ha postulat que la glucosa estimulava la síntesi de glicogen per un mecanisme seqüencial. Segons aquest, la glucosa s'uneix directament a la GP-a. Aquesta unió provoca la inhibició de l'enzim i també fa que aquest sigui més sensible a l'acció de la PP-1G_L que, al fosforilar la GP provoca la seva inactivació. La GP-a s'ha considerat un potent inhibidor de la PP-1G_L. Quan hi ha una quantitat suficient de GP inactiva, la inhibició de la PP-1G_L desapareix i com a resultat tenim una activació de la GS i de la síntesi neta de glicogen (Stalmans *et al* 1974). Aquest és un mecanisme elegant d'activació pel qual el fetge es pot convertir d'un òrgan de producció neta de glucosa en un de captació i d'emmagatzemament de glucosa.

Tanmateix, s'han descrit diverses observacions que posen en dubte aquest mecanisme. Per una banda hi ha experiments que indiquen que la GS es pot activar abans de la inhibició de la GP (Nuttall *et al* 1972) i fins i tot sense (Niewoehner *et al* 1984 i Ciudad *et al* 1979) una disminució de l'activitat GP-a. També s'ha vist que la fosforilació de la glucosa és imprescindible per què tingui lloc l'activació de la GS (Carabaza *et al* 1992). S'ha demostrat *in vitro* que la Glu 6-P pot activar la GS fosforilada. *In vivo*, la unió de Glu 6-P a la GS la converteix en un millor substrat per a la seva desfosforilació per la fosfatasa (PP-1G_L o PP1-PTG). S'ha descrit també que la inducció de la síntesi de glicogen en fetge per glucosa implica una desfosforilació de la GS dependent de Glu 6-P (Ciudad *et al* 1986, Cadefau *et al* 1997). Aquest conjunt de resultats mostren que aquest mecanisme seqüencial no pot explicar, en conjunt, el procés d'activació de la GS per glucosa i que han d'existir altres mecanismes de control. En aquesta tesi s'ha intentat aprofundir en el coneixement sobre el mecanisme pel qual la Glu 6-P regula l'activació de la GS i com aquest enzim controla la síntesi de glicogen en hepatòcits en cultiu. Per tal fi, ens cal entendre la funció senyalitzadora de la

molècula de Glu 6-P i la importància que pugui tenir el seu origen per a aquesta funció.

S'ha descrit en hepatòcits que la Glu 6-P procedent de la sobreexpressió de la GK activa més la GS que no pas la Glu 6-P que prové de la sobreexpressió de la HK I (Seoane *et al* 1996). Aquesta evidència indica que la GS hepàtica té algun tipus de preferència per la Glu 6-P de la GK i s'ha decidit estudiar amb profunditat aquest fenomen. A més a més, volem estudiar si aquesta possible relació entre la GK i la GS hepàtica també es manté amb la isoforma muscular de la GS. En aquest estudi s'han aprofitat les característiques de la línia cel·lular FTO-2B d'hepatoma de rata que expressa la isoforma hepàtica de la GS i no expressen la GK. Aquesta línia cel·lular ens ha permès aprofundir la relació entre la GK i la HK I i la GS en el control de la síntesi de glicogen

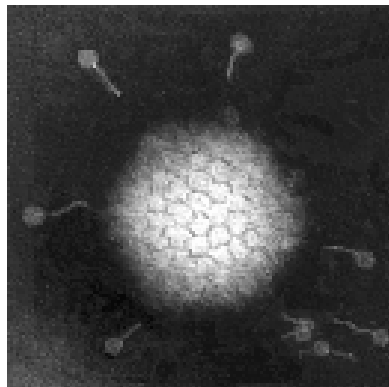
També es van voler estudiar les característiques del procés de síntesi de glicogen a partir de substrats gluconeogènics i com es regula la GS en aquestes situacions. A tal fi, es van sobreexpressar diferents enzims, entre ells la GS, mitjançant adenovirus recombinants per estudiar la seva importància en condicions gluconeogèniques. Aquest model era molt atractiu ja que suposava una situació en la qual no hi havia inhibició per glucosa de la GP i ens permetia aprofundir en el paper que juga la Glu 6-P en aquestes condicions.

La dihidroxiacetona (DHA) és un precursor gluconeogènic molt eficient (Azzout *et al* 1984, Burelle *et al* 2000). Tanmateix hi ha pocs estudis sobre la seva capacitat d'estimular l'acumulació de glicogen i els possibles mecanismes a través dels quals activa la glicogen sintasa (van Dijk *et al* 2001). Aquest substrat s'incorpora a la gluconeogènesi a nivell de les trioses fosfat. Aquestes es condensen i després d'una sèrie de reaccions acaben resultant en glucosa, glicogen o pentoses fosfat.

5. ELS ADENOVIRUS COM A EINES DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA

Els adenovirus presenten característiques específiques que els fan molt adequats com a vectors de transferència gènica. L'ample coneixement de la seva biologia, ha permès que el seu genoma hagi pogut ser adaptat per a introduir-hi gens aliens i preparar partícules víriques capaces d'infectar però no de replicar-se (Berkner 1992 i Graham *et al* 1995). La sobreexpressió d'enzims claus del metabolisme de la glucosa mitjançant adenovirus recombinants ha estat una tècnica àmpliament utilitzada i constitueix una eina molt potent per modular la capacitat de les cèl·lules de captar i utilitzar la glucosa. (Antoniozzi *et al* 1999)

Figura 4. Imatge d'un adenovirus per microscopia electrònica. Obtinguda per Linda Stannard, del Department of Medical Microbiology, University of Cape Town, Center for Cell Imaging de la Yale University School of Medicine.



Els serotips d'adenovirus més coneguts són els de tipus 2 (Ad2) i els de tipus 5 (Ad5). El seu genoma té un tamany aproximat de 36 kb i està format

per una doble cadena de DNA. Presenten una forma de càpside icosaèdrica (Horwitz, 1990) (Fig. 4).

Després de la infecció viral, i quan el virió ha entrat dins la cèl·lula i ha perdut la coberta proteica, el genoma viral és dirigit al nucli on adopta una localització episomal. En el cas dels virions salvatges, el seu cicle lític es pot dividir en dues fases, la primerenca i la tardana, definides en funció del moment de la replicació viral. Els gens que s'expressen en la fase primerenca del cicle lític o *Early* s'anomenen E1, E2, E3 i E4. Després de la replicació vírica s'activa el promotor tardà major (*MLP*) que és responsable de la transcripció en la fase tardana.

5.1 Regions més rellevants del genoma de l'adenovirus

Les estratègies de disseny d'adenovirus es basen en l'eliminació i posterior substitució de porcions del genoma que permet que els inserts de DNA d'elevat tamany s'empaquetin. Així, es poden arribar a empaquetar inserts de fins a 7 kb. En el nostre cas, aquesta capacitat estava limitada a seqüències de menys de 5 Kb de longitud. La regió E1 va ser eliminada. En el seu lloc s'hi ha introduït un promotor de Citomegalovirus (CMV) i a continuació un *Multiple Cloning Site* (MCS) on es pot inserir el cDNA que ens interessi. Amb l'eliminació de la regió E1 aconseguim un espai per empaquetar el DNA forani i alhora evitem que els adenovirus generats tinguin capacitat proliferativa quan infecten, al manca-los les proteïnes codificades per la regió E1. La regió E1A és particularment important per què expressa proteïnes requerides per l'expressió d'altres regions primerenques (E1B, E2, E3 i E4).

La regió E1, per si mateixa, és capaç de codificar per proteïnes amb capacitat de transformar cèl·lules primàries i immortalitzar-les. Aquesta mateixa regió es va utilitzar per transformar cèl·lules embrionàries de ronyó

humà, generant una línia cel·lular estable, imprescindible per a la construcció d'adenovirus recombinants: les cèl·lules 293 (Graham *et al* 1977). Aquestes cèl·lules són les úniques on els adenovirus recombinants poden proliferar ja que els subministren en *trans* les proteïnes de la regió E1 que necessiten els adenovirus.

5.2 Avantatges i inconvenients dels adenovirus com a vectors de transferència gènica.

Els adenovirus presenten capacitat per infectar un gran ventall de tipus cel·lulars eucariotes, cosa que els fa una eina molt útil en el nostre cas. Hi ha molts cultius primaris, com per exemple els hepatòcits en cultiu, que presenten resistència a ser transduïts amb DNAs forans mitjançant tècniques més convencionals, des de la tansfecció amb liposomes fins a la coprecipitació amb fosfat càlcic. Un altre avantatge que cal esmentar és la possibilitat d'obtenir títols molt elevats d'adenovirus (fins a 10^{10} pfu/ml), que poden ser incrementats mitjançant mètodes de separació en gradients de CsCl.

També, cal destacar el fet que els adenovirus tenen la capacitat d'infectar cèl·lules quiescents que no s'estan replicant en el moment de la infecció (Berkner 1988 i Horwitz 1990) a diferència d'altres tipus de virus que necessiten cèl·lules en replicació activa, per tal d'ésser eficients en la infecció. Les infeccions amb adenovirus, *in vitro* tenen una eficiència de quasi el 100%, tal i com es descriu en els múltiples estudis en els quals s'han utilitzat com a vectors de transferència. La demostració que aquests virus no són patogènics ha donat la suficient informació sobre la seguretat dels mateixos (Graham i Prevec, 1995).

L'inconvenient més gran que presenten els vectors adenovírics rau en la complicació del seu disseny i construcció. Actualment, nous sistemes en faciliten la construcció (Souza i Armentano, 1999). Tot i així, totes les

estratègies de què disposem, impliquen la recombinació homòloga de dos plasmidis. Un primer, on s'hi troba la major part del genoma de l'adenovirus, que presenta un tamany de 35 kb i un segon, més petit que conté zones homologues al primer i el *cassette* d'expressió del nostre cDNA d'interès. Aquest és un procés complex, lent i de baixa eficiència. És per aquest motiu que només s'inicia el procés de generació d'un adenovirus recombinant d'aquelles proteïnes que s'ha vist, en altres tipus cel·lulars de fàcil transducció, que tenen una funció rellevant.

Per últim, els adenovirus presenten un inconvenient potencial i és la possibilitat de que vectors adenovírics deficients en la seva replicació pateixin processos de recombinació amb adenovirus salvatges reconstituïnt-se la seva capacitat de proliferar. És per això que la manipulació d'aquests adenovirus s'ha de realitzar sempre en instal·lacions adequades a les seves necessitats de seguretat.

Resultats: Capítol 1

CONSTRUCCIÓ DELS ADENOVIRUS CODIFICANTS PER A LA RLGS, I GFP/RLGS.

1.1 INTRODUCCIÓ:

Les característiques biològiques que presenten els adenovirus els fan molt útils com a vectors de transferència gènica en hepatòcits en cultiu (Berkner, 1992 o Graham i Prevec, 1995). L'eficiència de transfecció dels adenovirus és de més d'un 95% en les condicions de treball del laboratori, la qual cosa ens permet assolir nivells de sobreexpressió adients per a realitzar els estudis d'impacte metabòlic de la proteïna d'interès.

En aquesta tesi, s'han construït dos adenovirus que codifiquen per la glicogen sintasa de fetge de rata (RLGS), de 2,3 Kb, i la seva fusió amb la proteïna verda fluorescent (GFP/RLGS), de 3,0 Kb. En aquest capítol s'estudia la funcionalitat de les proteïnes sobreexpressades i el seu comportament en diferents situacions metabòliques.

1.2 RESULTATS:

1.2.1 Obtenció i caracterització de l'AdCMV-RLGS i l'AdCMV-GFP/RLGS.

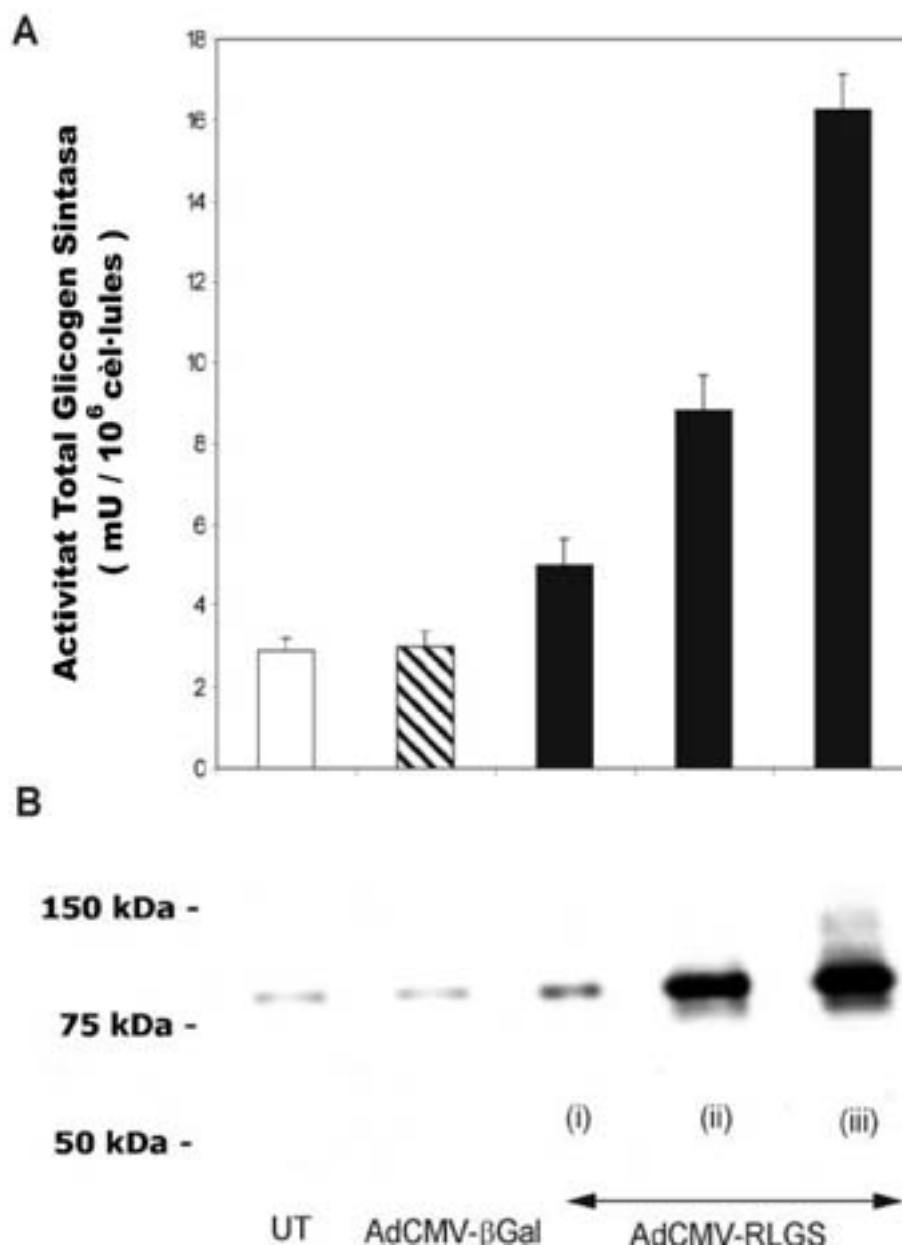
L'obtenció de l'adenovirus recombinant que conté el cDNA de la RLGS sota el control del promotor del citomegalovirus (CMV) es va realitzar segons s'indica en l'apartat corresponent dels materials i mètodes. Després de la seva construcció, clonació i posterior amplificació es va determinar si era capaç de dirigir l'expressió de la RLGS en les cèl·lules infectades i si aquesta proteïna era funcional. Per fer aquesta verificació, es varen infectar hepatòcits de rata en cultiu amb diferents dosis de l'adenovirus. Es va mesurar la concentració catalítica de la GS, en presència de Glu 6-P, en homogenats d'aquestes cèl·lules (Fig. 1A). També es mesurà per *Western blot* la quantitat de proteïna present en cada cas després del tractament (Fig. 1B).

Les cèl·lules no tractades i aquelles infectades amb l'AdCMV- β GAL, que codifica per l'enzim β -galactosidasa i que s'utilitza com a control de la infecció, van mostrar uns nivells d'activitat GS total (mesurada en presència de Glu 6-P) de $3,0 \pm 0,3$ mU/ 10^6 cèl·lules. Per contra, aquells hepatòcits infectats amb AdCMV-RLGS a una multiplicitat d'infecció de 10 van arribar a nivells d'activitat GS total de $18,5 \pm 1,4$ mU/ 10^6 cèl·lules, després de 18 hores de tractament.

Els nivells de proteïna immunoreactiva, tal i com es mostra, van incrementar de manera paral·lela a l'activitat de la GS (Fig. 1, B). La utilització de grans dosis d'adenovirus o períodes d'infecció més llargs van donar nivells de GS encara més alts.

Figura 1 Expressió de la RLGS en hepatòcits tractats amb l' AdCMV-RLGS

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS (■) a una multiplicitat d'infecció de 2,5 (i), 5 (ii), i 10 (iii), o amb una dosi única de l'AdCMV-βgal a una multiplicitat d'infecció de 10 (▨), o bé no tractats (□) com es descriu en el capítol de materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM, les cèl·lules es van incubar durant 2 hores amb 25 mM glucosa. Les cèl·lules van ser recuperades i es va mesurar l'activitat total GS en els homogenats (A) o bé es van analitzar per *Western blot* els nivells de proteïna, utilitzant un anticòs contra la RLGS (10 μg de proteïna total per carril) (B). Els resultats són les mitjanes ± S.E.M. de sis experiments.

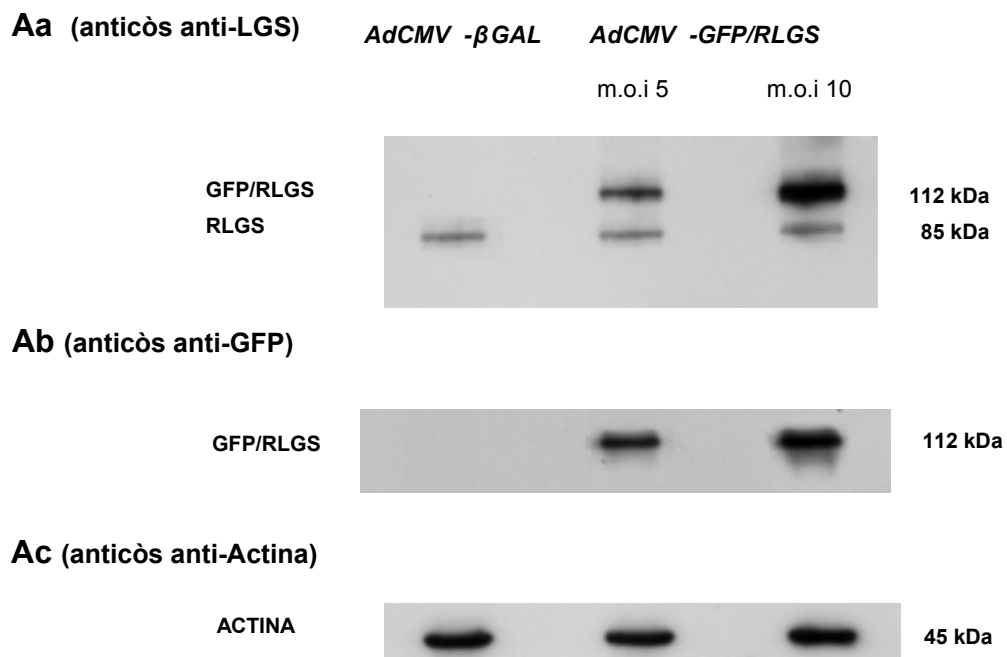


L'adenovirus recombinant que conté el cDNA de la fusió o quimera proteica GFP/RLGS sota el control del promotor del citomegalovirus (CMV), es va fer seguint el mateix procediment que pel virus anterior. Després de la seva construcció, clonació i posterior amplificació es va verificar si era capaç de dirigir l'expressió de la GFP/RLGS en les cèl·lules infectades i, el més important, si aquesta mantenia l'activitat GS i la seva regulació. Per fer aquesta verificació, es varen infectar hepatòcits de rata en cultiu amb l'adenovirus. Es va mesurar la concentració catalítica de la glicogen sintasa, en presència i absència de Glu 6-P, en homogenats d'aquestes cèl·lules. Alhora es va mesurar per *Western blot* la quantitat de proteïna (Fig. 2).

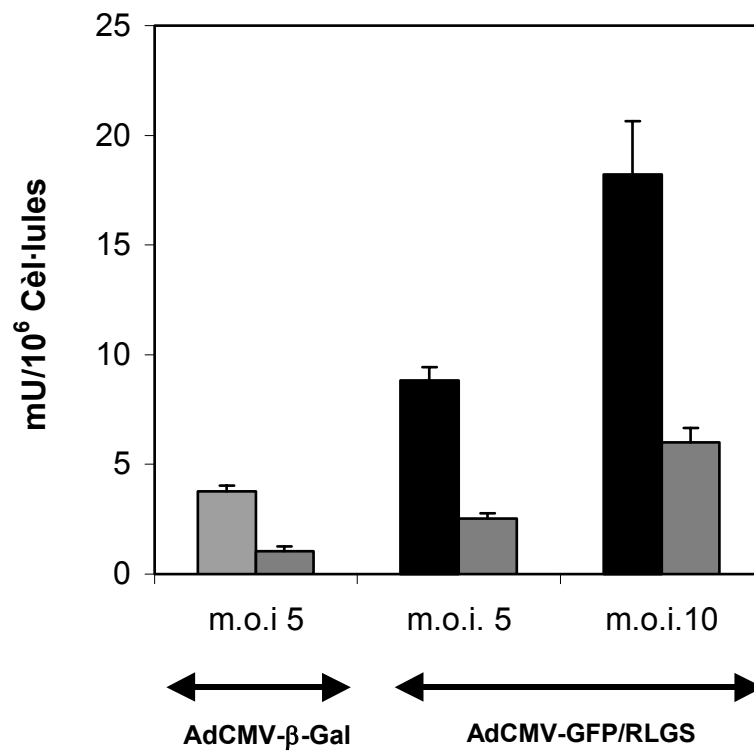
Com en el cas anterior, els hepatòcits tractats amb l'AdCMV-GFP/RLGS a una multiplicitat d'infecció de 10 van arribar a nivells d'activitat GS total de $18,20 \pm 2,43$ mU/ 10^6 cèl·lules, després de 18 hores de tractament i, el més important, aquesta quimera era activada per Glu 6-P com l'enzim salvatge (Fig. 2B). Endemés, es va mesurar la capacitat d'activació de la quimera, expressada en hepatòcits, per glucosa i es va observar que la GFP/RLGS era funcional (Fig. 2C). Per *Western blot*, utilitzant l'anticòs contra la GS (L1), es varen obtenir 2 bandes en homogenats d'hepatòcits tractats amb l'AdCMV-GFP/RLGS (Fig. 2Aa). Una banda alta, de 112 kDa, que corresponia al pes molecular teòric de la GFP/RLGS, i que també reaccionava amb l'anticòs contra la GFP (Fig. 2Ab) i no es trobava en els hepatòcits control. I, una segona banda de 85 kDa, que corresponia a la proteïna salvatge (Fig. 2Aa).

Figura 2 Expressió de la GFP/RLGS en hepatòcits tractats amb l' AdCMV-GFP/RLGS

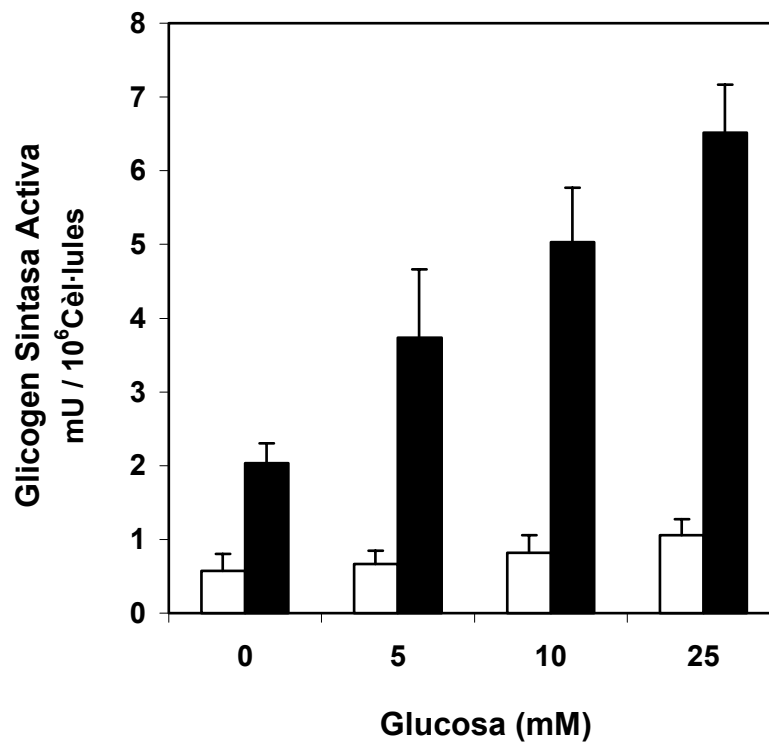
Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS a una multiplicitat d'infecció (m.o.i) de 5 o de 10, o amb una dosi única de l'AdCMV- β gal a una multiplicitat d'infecció de 10 com es descriu en el capítol de materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, les cèl·lules es van incubar durant 2 hores amb 25mM glucosa. Les cèl·lules van ser recuperades i es va analitzar per *Western blot* els nivells de proteïna (10 μ g de proteïna per carril), utilitzant un anticòs contra la LGS (Aa), contra la GFP (Ab) o contra l'actina (Ac) o bé, es va mesurar en els homogenats l'activitat total GS (l'AdCMV- β gal, barres amples i l'AdCMV-RLGS, barres negres) i la GS activa (barres estretes) (B). La figura (C) ens mostra els nivells de GS activa que s'obtenen en hepatòcits control (barres blanques) i aquells tractats amb l'AdCMV-RLGS amb una m.o.i. de 10 (barres negres) incubats a diferents dosis de glucosa. El resultat són les mitjanes \pm S.E.M. de 3 experiments.



B



C



1.2.2. Localització Subcel·lular de la RLGS i la GFP/RLGS

Es va fer un estudi on s'observava l'efecte que produïen diferents condicions metabòliques sobre la localització subcel·lular de la GS en hepatòcits en cultiu tal i com ja s'havia descrit pel laboratori (García-Rocha *et al* 2001). Per tal fi es va fer servir un anticòs específic contra la isoforma hepàtica de la GS. Així, es va poder observar que quan els hepatòcits en cultiu es trobaven en absència de glucosa, la GS es trobava localitzada al citosol de la cèl·lula de manera difusa (Fig. 3). Per contra, quan incubàvem hepatòcits en presència de glucosa 25 mM durant 2 hores vam observar que la GS s'acumulava a la perifèria de la cèl·lula, lloc en el qual hi ha la síntesi de glicogen (García-Rocha *et al* 2001).

Amb aquest mateix anticòs L1 es va fer una detecció per immunofluorescència de la proteïna en hepatòcits tractats amb l'AdCMV-RLGS. Es van comparar diferents situacions metabòliques, corresponents a situacions de 0 mM i 25 mM glucosa. En aquest cas es va voler comprovar si la GS sobreexpressada es comportava, pel què fa a la seva localització subcel·lular, igual que la GS endògena. Es va estudiar si la proteïna sobreexpressada mantenia la capacitat de resposta a un canvi en els nivells de glucosa del medi tal i com havíem vist per la GS endògena (Fig. 4). Es va observar que la proteïna exògena (Cèl·lules que presenten una elevada immunofluorescència (Fig. 4, A)), també responia al mateix patró i *translocava* des d'una localització citosòlica cap a la perifèria cel·lular formant grumolls. Un comportament idèntic al que es produïa en aquells hepatòcits que no sobreexpressaven la GS i que corresponia als que presentaven una baixa immunofluorescència (Fig. 4, B).

També es va estudiar si la localització del complex GFP/RLGS es comportava com l'enzim salvatge. Gràcies a l'autofluorescència que li donava la GFP al conjunt, va ser possible la detecció per fluorescència de la proteïna exògena en hepatòcits tractats amb l'AdCMV-GFP/RLGS. Es van comparar diferents

situacions metabòliques, en absència o presència de 25 mM glucosa, i es va observar que la sintasa fusionada a GFP també *translocava* en presència de glucosa com s'havia descrit per a la proteïna salvatge (Fig. 5).

Figura 3 Immunocitoquímica de la RLGS en hepatòcits.

Els hepatòcits en cultiu van ser tractats com es descriu al capítol de materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, les cèl·lules van ser incubades durant 2 hores amb 0 mM, 5 mM, 10 mM o 25 mM de glucosa. Les cèl·lules van ser fixades amb paraformaldehid al 4% tal i com es descriu als materials i mètodes i després es va fer una immunocitoquímica utilitzant un anticòs contra la RLGS. Finalment es van visualitzar amb un microscopi de fluorescència confocal.

Barra d'escala = 10 μ m

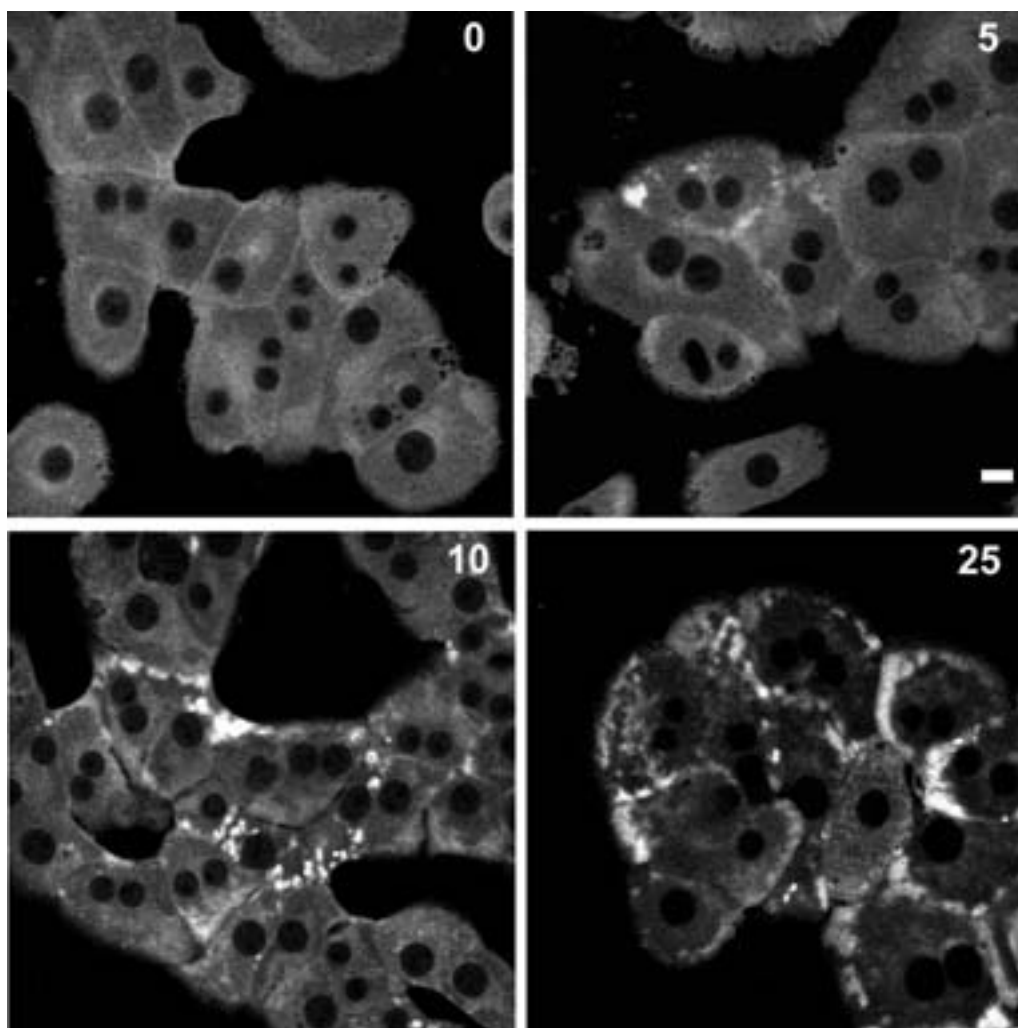
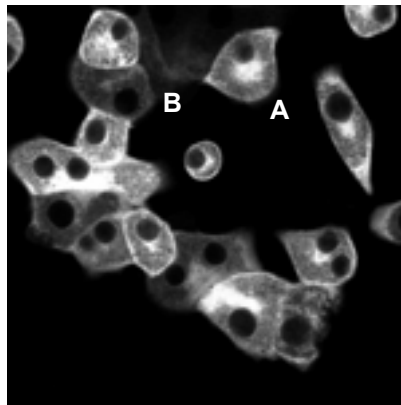
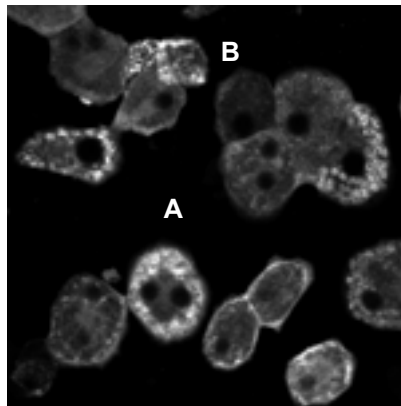


Figura 4 Immunocitoquímica de la RLGS en hepatòcits tractats amb l' AdCMV-RLGS.

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS com es descriu en el capítol de materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, les cèl·lules es van incubar durant 2 hores amb 0 mM o 25 mM de glucosa. Les cèl·lules van ser fixades amb paraformaldehid al 4% tal i com es descriu en els materials i mètodes i després es va fer una immunocitoquímica utilitzant un anticòs contra la RLGS. Finalment es van visualitzar amb un microscopi de fluorescència confocal. Observeu que la intensitat del senyal als hepatòcits infectats amb AdCMV-RLGS (A) és més alta que en els no infectats (B).



**Glucosa
0 mM**

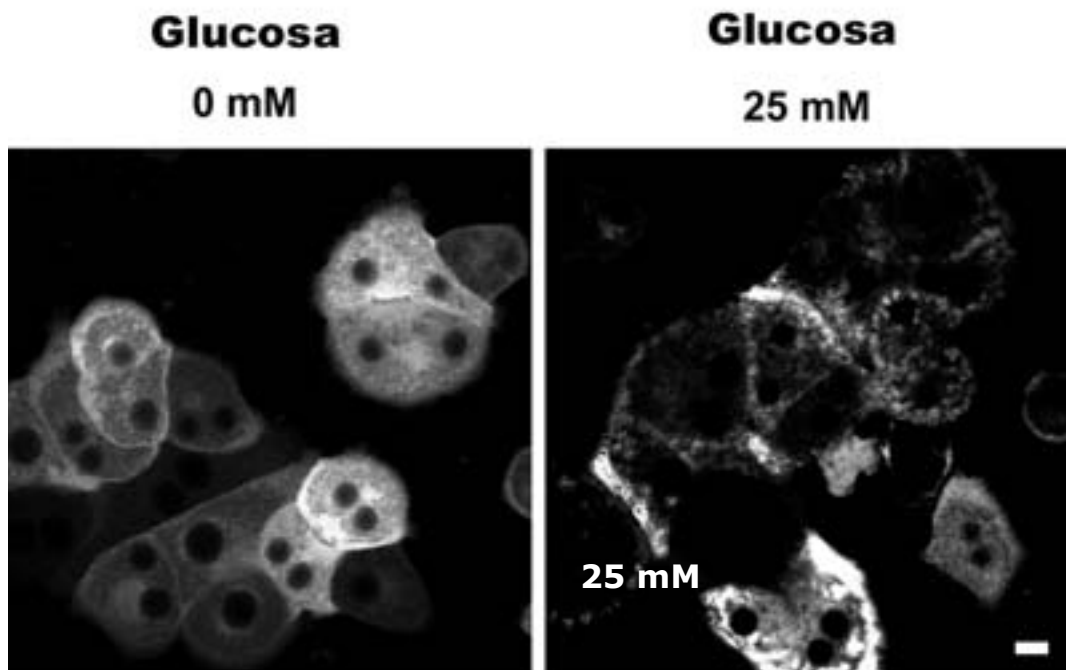


**Glucosa
25 mM**

Figura 5 Localització de la GFP/RLGS en hepatòcits tractats amb l' AdCMV-GFP/RLGS.

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-GFP/RLGS com es descriu al capítol de materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, les cèl·lules van ser incubades durant 2 hores amb 0mM o 25mM de glucosa. Les cèl·lules van ser fixades amb paraformaldehid al 4% segons es descriu en els materials i mètodes i després es va fer una localització subcel·lular utilitzant l'autofluorescència de la GFP. Finalment es van visualitzar amb un microscopi de fluorescència confocal.

Barra d'escala = 10 μ m



1.3 DISCUSSIÓ

La infecció d'hepatòcits en cultiu amb l'AdCMV-RLGS induïx un augment de l'activitat GS present en les cèl·lules de manera dependent a la dosi de virus utilitzada. Aquest increment d'activitat correspon a un increment en els nivells d'aquest enzim. En el cas d'utilitzar l'AdCMV-GFP/RLGS ens trobem amb una situació similar. L'increment de la dosi de virus utilitzada per infectar un cultiu d'hepatòcits fa que aquests tinguin un increment en els nivells de la proteïna i un augment de l'activitat codificada pel virus. En aquest últim cas, la fusió de la GS a la proteïna verda fluorescent (GFP) no implica una pèrdua d'activitat per part de l'enzim.

Els resultats indiquen que la GS hepàtica sobreexpressada en hepatòcits en cultiu mitjançant adenovirus recombinants manté la capacitat de *translocar* en resposta a glucosa. En el cas de la sobreexpressió de la proteïna de fusió GFP/RLGS, la seva distribució respon al mateix patró descrit per la proteïna endògena. La proteïna quimèrica en presència de glucosa es desplaça des d'una distribució citosòlica uniforme cap a la perifèria cel·lular formant agregats.

Així aquests dos adenovirus constitueixen eines molt útils. El primer, per l'estudi de l'impacte metabòlic de la GS sobre el metabolisme del glicogen, tant en hepatòcits en cultiu com en d'altres tipus cel·lulars. En canvi l'adenovirus que codifica per a la proteïna de fusió GFP/RLGS serà de gran utilitat per a l'estudi de la *translocació* de la GS i la relació amb la seva activitat. Permetrà fer estudis de localització de la proteïna en diferents sistemes cel·lulars i diferents condicions metabòliques.

Resultats: Capítol 2

CONTROL COMPARTIT DE LA SÍNTESI DE GLICOGEN ENTRE LA GLICOGEN SINTASA I LA GLUCOQUINASA

2.1 INTRODUCCIÓ:

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori havien permès determinar que la sobreexpressió de GK, però no la de HK I, conduïa a l'acumulació de glicogen en hepatòcits encara que, també implicava un augment important en la producció de lactat (Seoane *et al* 1996). Així doncs, l'increment de la Glu 6-P procedent de l'acció de la GK era capaç d'estimular en aquestes cèl·lules tant l'acumulació de glicogen com la glucòlisi. Un primer objectiu que ens vàrem plantejar, era determinar com estava distribuït, en hepatòcits, el control del metabolisme del glicogen entre la GK i la GS.

A tal fi es van utilitzar els adenovirus recombinants que codifiquen per la GS hepàtica de rata i la GK per a sobreexpressar aquests dos enzims, en hepatòcits de rata en cultiu, de manera combinada o bé independent per a cadascun d'ells.

Hem trobat que la sobreexpressió de la GS en hepatòcits en cultiu de rata té un impacte metabòlic restringit a l'acumulació de grans quantitats de glicogen en presència de glucosa. La sobreexpressió GK comporta un increment en els nivells de Glu 6-P, que es tradueix en un notable increment en les vies de síntesi de glicogen i glucòlisi. L'efecte sobre la síntesi de glicogen es additiu quan es sobreexpressa alhora la GK i la GS, evidència que suggereix l'existència d'un mecanisme de control compartit.

2.2 RESULTATS:

2.2.1 Activitat GS, activitat fosforiladora de glucosa i GP en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS.

En els experiments descrits en aquest capítol es va utilitzar una multiplicitat d'infecció de 10 per l'adenovirus AdCMV-RLGS. Aquesta dosi vírica portava a uns nivells d'activitat GS total (mesurada en presència de 6,6 mM Glu 6-P) d'unes 18 mU/10⁶ cèl·lules, tal i com s'ha descrit en el capítol anterior.

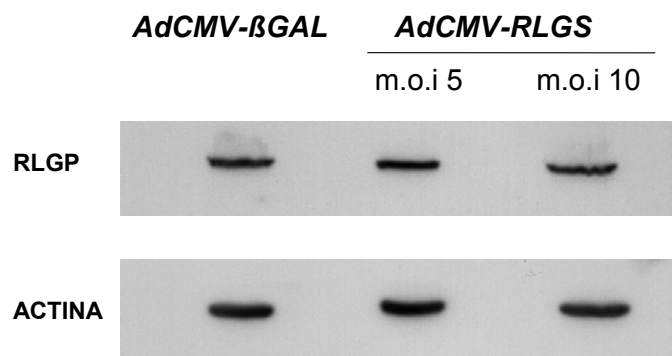
A vegades, la sobreexpressió d'una determinada proteïna pot comportar com a resultat, l'alteració dels nivells d'expressió d'algun enzim relacionat. Per exemple, la sobreexpressió de la GP de múscul de conill mitjançant adenovirus comporta un increment en els nivells totals de GS (Baqué *et al* 1996), en fibres musculars. De forma similar, ratolins transgènics que sobreexpressen la isoforma muscular de la GS mostren nivells incrementats de GP en les fibres musculars (Azpizu *et al* 2000 i Manchester *et al* 1996). Sembla doncs que existeixen mecanismes encaminats a mantenir un equilibri entre els nivells de GS i GP.

Per això vam estudiar si la sobreexpressió de GS hepàtica en hepatòcits en cultiu afectava l'expressió de la proteïna GP. L'anàlisi densitomètrica del *Western blot*, utilitzant un anticòs contra la GP hepàtica, va revelar que els nivells de la proteïna GP es mantien constants, independentment dels nivells de GS.

També vam mesurar la capacitat fosforiladora de glucosa dels hepatòcits que sobreexpressaven la GS. Les activitats GK i HK mesurades eren constants, independentment de la sobreexpressió de la GS hepàtica (Taula 1). D'altra banda, els hepatòcits tractats amb l'adenovirus AdCMV-GK a una multiplicitat d'infecció de 4 mostraven un increment de 3 vegades el valor d'activitat GK dels hepatòcits control però no s'alteraven els nivells d'HK (Taula 1).

Figura 1 Western blot de GP.

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS a una multiplicitat d'infecció de 5, i 10, o amb una dosi única de l'AdCMV- β gal a una multiplicitat d'infecció de 10 tal i com es descriu en el capítol de materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, les cèl·lules es van incubar durant 2 hores amb glucosa a 25 mM. Les cèl·lules van ser recuperades i en els homogenats es van analitzar per *Western blot* els nivells de proteïna, utilitzant un anticòs contra la RLGP i un anticòs comercial contra actina.



Taula 1 L'activitat GK i HK en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, GK i la combinació RLGS/GK.

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS, amb l'AdCMV-GK, amb l'AdCMV-RLGS més l'AdCMV-GK o bé es van deixar sense tractar. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores a 25 mM glucosa. Les cèl·lules van ser descongelades i es va mesurar l'activitat de la GK i la HK segons està descrit als materials i mètodes. L'activitat s'expressa en mU/10⁶ cèl·lules. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de vuit experiments independents per l'AdCMV-RLGS i hepatòcits no tractats. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de sis experiments independents per l'AdCMV-GK i la combinació AdCMV-RLGS/GK.

	GK (mU/10 ⁶ cèl·lules)	HK (mU/10 ⁶ cèl·lules)
No tractats	12.0 ± 1.8	4.5 ± 0.6
AdCMV-GK	38.6 ± 5.3	3.6 ± 0.3
AdCMV-RLGS	13.5 ± 1.6	5.0 ± 0.7
AdCMV-RLGS/GK	41.9 ± 5.7	3.4 ± 0.2

2.2.2 Activitat GS en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK o ambdues (RLGS/GK).

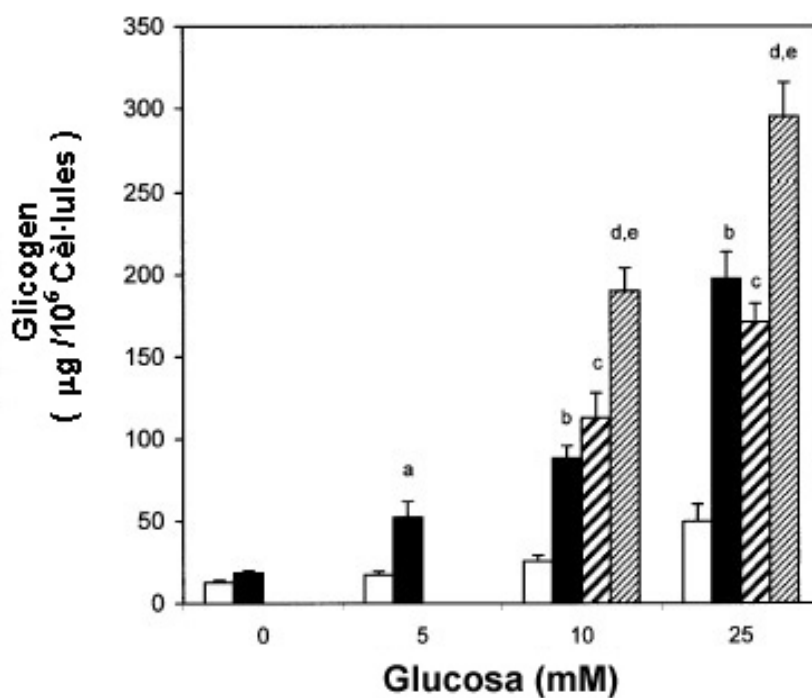
L'activitat total de l'enzim GS, en hepatòcits de rata en cultiu, era $3,0 \pm 0,3$ mU/ 10^6 de cèl·lules. Quan es sobreexpressava la GK en hepatòcits aquesta activitat total no es veia alterada. Ara bé, quan els hepatòcits es tractaren amb l'AdCMV-RLGS els nivells d'activitat total de GS s'incrementaven de l'ordre de 6 vegades, arribant a nivells de $18,5 \pm 1,4$ mU/ 10^6 de cèl·lules.

En aquests experiments no podíem utilitzar la tradicional relació d'activitats, en presència o absència de Glu 6-P, per mesurar els canvis en la capacitat de la cèl·lula per sintetitzar glicogen, ja que els nivells de GS total eren diferents en els hepatòcits infectats amb l'AdCMV-RLGS dels altres que no havien estat infectats. És per això, que vàrem utilitzar la concentració de GS activa (activitat mesurada en absència de Glu 6-P).

La incubació amb glucosa dels hepatòcits de rata en cultiu comportava l'activació de la GS endògena. La GS sobreexpressada també s'activava en resposta a la glucosa, de manera que es van incrementar els nivells d'activitat mesurada en absència de Glu 6-P així que s'augmentava la concentració de glucosa en el medi. Els nivells de GS activa que s'assolien eren aproximadament 4 vegades més alts en les cèl·lules tractades amb l'AdCMV-RLGS respecte les cèl·lules control no tractades (Fig. 2). En els hepatòcits que sobreexpressaven la GK, els nivells de sintasa activa incrementaven de l'ordre de 3 vegades, tal i com s'havia descrit anteriorment (Seoane *et al* 1996). Quan s'utilitzaven els dos adenovirus alhora, s'aconseguien nivells de GS activa de l'ordre de 9 vegades superiors als que s'observaven en hepatòcits no tractats.

Figura 2 Efectes de la glucosa sobre l'activació de la GS

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS (□), amb l'AdCMV-GK (■), amb l'AdCMV-RLGS més l'AdCMV-GK (▨) o bé es van deixar sense tractar (□) seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a diferents concentracions. Les cèl·lules van ser recuperades i es va mesurar en els homogenats l'activitat GS. La GS activa es va mesurar en absència de Glu 6-P. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de vuit experiments independents per l'AdCMV-RLGS i hepatòcits no tractats. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de sis experiments independents per l'AdCMV-GK i la combinació AdCMV-RLGS/GK. Les lletres indiquen la significància estadística als següents nivells: a, $p < 0,01$, b, $p < 0,001$ Per comparacions entre hepatòcits tractats amb l'AdCMV-RLGS i el grup control no tractat. La lletra c, $p < 0,001$ Per comparacions entre els hepatòcits tractats amb l'AdCMV-GK i hepatòcits no tractats. La lletra d, $p < 0,001$ i e, $p < 0,001$ per comparacions entre hepatòcits tractats amb la combinació AdCMV-GS/GK i hepatòcits control o bé tractats amb l'AdCMV-GK.



2.2.3 Acumulació de glicogen en resposta a glucosa en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK o ambdues (RLGS/GK).

En absència de glucosa els hepatòcits acumulaven nivells molt baixos de glicogen, estiguessin o no tractats amb l'AdCMV-RLGS. Quan s'incubaven les cèl·lules dues hores en presència de dosis creixents de glucosa, els hepatòcits incrementaven els nivells de glicogen acumulat de forma dependent de la concentració de glucosa en el medi d'incubació. Aquest comportament es produïa tant si els hepatòcits sobreexpressaven la GS, com si es tractava d'hepatòcits control. Però, quan els hepatòcits sobreexpressaven la GS, els nivells de glicogen que acumulaven eren aproximadament de 4 vegades els dels hepatòcits no tractats. A la dosi de 25 mM glucosa els hepatòcits que sobreexpressaven la GS hepàtica arribaven a acumular nivells de glicogen propers a 200 µg de glicogen/10⁶ de cèl·lules (Fig. 3).

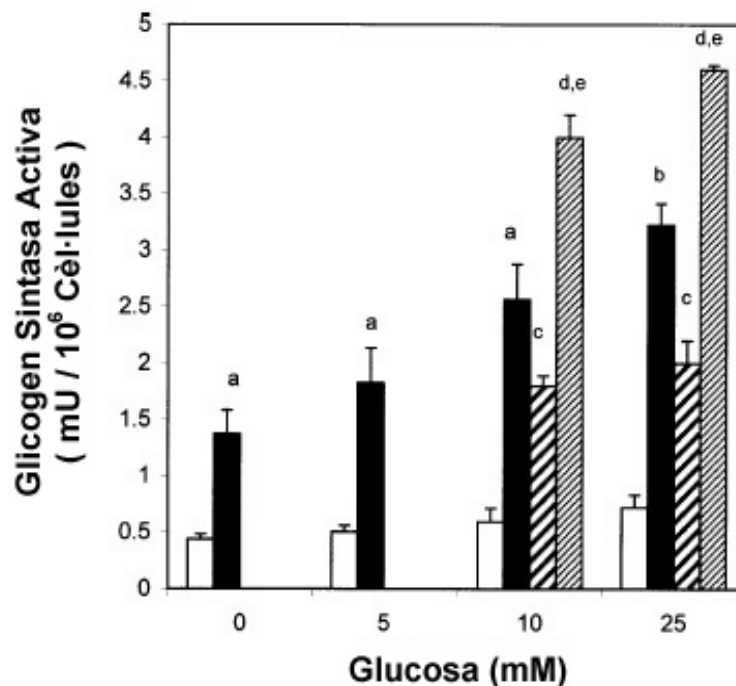
Com ja ha estat descrit anteriorment el tractament dels hepatòcits en cultiu amb l'AdCMV-GK també portava a un augment en l'acumulació de glicogen. En aquest cas, un augment d'unes 2,5 a 3 vegades en els nivells d'expressió de l'enzim portava a un increment en els nivells de glicogen acumulats de l'ordre de 3 vegades. S'arribava a nivells de 170 µg de glicogen/10⁶ de cèl·lules, després de dues hores d'incubació a 25 mM glucosa (Fig. 3).

Quan es van coexpressar els dos enzims alhora, es va observar un efecte additiu pel que fa a la acumulació de glicogen que conduïa, quan s'incubava amb concentracions de glucosa de 10 o 25 mM, a un increment de fins a sis vegades respecte els hepatòcits control. Després de dues hores d'incubació amb una concentració de glucosa de 25 mM, els nivells de glicogen que assolien aquests hepatòcits tractats amb tots dos adenovirus arribava a 300 µg de glicogen/10⁶ de cèl·lules (Fig. 3), dada comparable als nivells de glicogen que

es trobaven en el fetge de les rates alimentades *ad libitum* (Berman *et al* 1998).

Figura 3 Efectes en l'acumulació del glicogen de la sobreexpressió de la GS, GK o d'ambdues (GK/GS)

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS (□), amb l'AdCMV-GK (▨), amb l'AdCMV-RLGS més l'AdCMV-GK (▩) o bé es van deixar sense tractar (□) seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a diferents concentracions. Les cèl·lules van ser descongelades i s'hi va mesurar el contingut de glicogen. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de vuit experiments independents per l'AdCMV-RLGS i hepatòcits no tractats. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de sis experiments independents per l'AdCMV-GK i la combinació AdCMV-RLGS/GK. Les lletres indiquen la significància estadística als següents nivells: a, $p < 0,01$, b, $p < 0,001$ per les comparacions entre les cèl·lules tractades amb l'AdCMV-RLGS i el grup control no tractat. La lletra c, $p < 0,001$ per comparacions entre el grup tractat amb l'AdCMV-GK i el grup control no tractat. Les lletres d, $p < 0,001$ i e, $p < 0,001$ Per les comparacions entre les cèl·lules tractades amb la combinació AdCMV-GS/GK i el grup control o bé el grup tractat amb l'AdCMV-GK.



2.2.4 Nivells de Glu 6-P i UDP-Glu en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK o ambdues (RLGS/GK).

La Glu 6-P és el metabòlit clau en la via de síntesi del glicogen. Per una banda, està en equilibri amb la glucosa 1-fosfat, el precursor de l'UDP-Glu. Aquest últim, és el substrat de la GS ja que actua com a donador del grup glucosil en l'allargament de la molècula de glicogen. Per l'altra, la Glu 6-P és un activador al·lostèric de la GS, i, el què encara és més important, estimula l'activació covalent i permanent de la GS per desfosforilació (Villar-Palasi i Guinovart 1997).

Per comprovar si la sobreexpressió de la GS afectava els nivells dels precursors de la síntesi de glicogen, vàrem mesurar els nivells de Glu 6-P i els d'UDP-Glu, tant en hepatòcits de rata tractats amb l'AdCMV-RLGS com no tractats, en presència de glucosa. Els resultats mostraven que l'acumulació de grans quantitats de glicogen en hepatòcits que sobreexpressen la GS de fetge s'esdevenia sense alterar o afectar els nivells intracel·lulars d'aquests metabòlits. Els nivells de Glu 6-P incrementaven de manera dosi dependent respecte la glucosa del medi (Fig. 4), mentre els nivells d'UDP-Glu no es veien alterats a cap concentració de glucosa (Fig. 5). Tanmateix, podíem dir que no hi havia diferències significatives entre el comportament dels hepatòcits no tractats i aquells que sobreexpressaven la GS.

Per altra banda, la sobreexpressió de la GK, en hepatòcits de rata en cultiu, portava a un increment important dels nivells de Glu 6-P. En canvi, no s'observava cap canvi significatiu en els nivells d'UDP-Glu. Quan es combinava la sobreexpressió de la GK i la GS, en hepatòcits en cultiu, ni els nivells de Glu 6-P ni els nivells d'UDP-Glu es veien significativament alterats respecte aquells que es van obtenir en hepatòcits no tractats (Fig. 4 i Fig. 5).

Figura 4 Efecte sobre els nivells de Glu 6-P de la sobreexpressió en hepatòcits de rata en cultiu de l'activitat GS, GK i la seva combinació (GS/GK).

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS (■), amb l'AdCMV-GK (▲), amb l'AdCMV-RLGS més l'AdCMV-GK (●) o bé es van deixar sense tractar (□) seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a diferents concentracions. Les cèl·lules van ser recuperades i es va mesurar la concentració intracel·lular de Glu 6-P. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de vuit experiments independents per l'AdCMV-RLGS i hepatòcits no tractats. Les dades representen les mitjanes ± la S.E.M. de sis experiments independents per l'AdCMV-GK i la combinació AdCMV-RLGS/GK. Les lletres indiquen la significància estadística als següents nivells: a, $p < 0,01$, b, $p < 0,001$ Per comparacions entre els hepatòcits tractats amb l'AdCMV-GK i els tractats amb la combinació AdCMV-GK/GS o bé els hepatòcits no tractats.

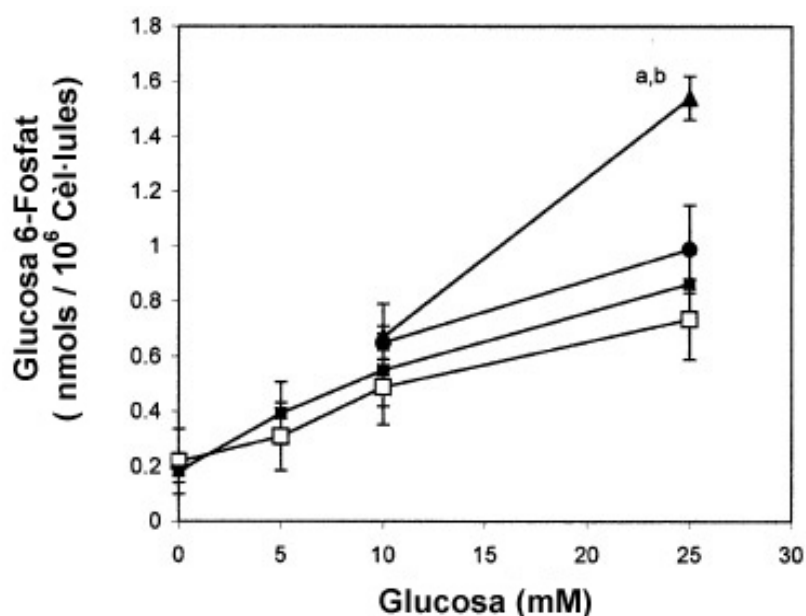
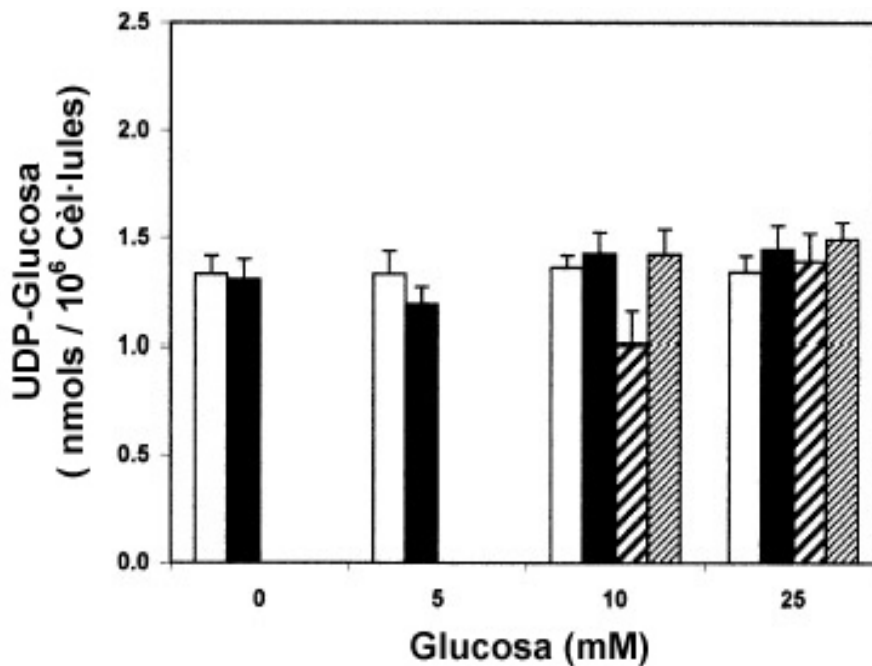


Figura 5 Efecte sobre els nivells de UDP-Glu de la sobreexpressió en hepatòcits de rata en cultiu de l'activitat GS, GK i la seva combinació GS/GK

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS (□), amb l'AdCMV-GK (■), amb l'AdCMV-RLGS més l'AdCMV-GK (▨) o bé es van deixar sense tractar (□) seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a diferents concentracions. Les cèl·lules van ser recuperades i es va mesurar la concentració intracel·lular de UDP-Glu. Les dades representen les mitjanes \pm la S.E.M. de vuit experiments independents per l'AdCMV-RLGS i hepatòcits no tractats. Les dades representen la mitja \pm la S.E.M. de sis experiments independents per l'AdCMV-GK i la combinació AdCMV-RLGS/GK.



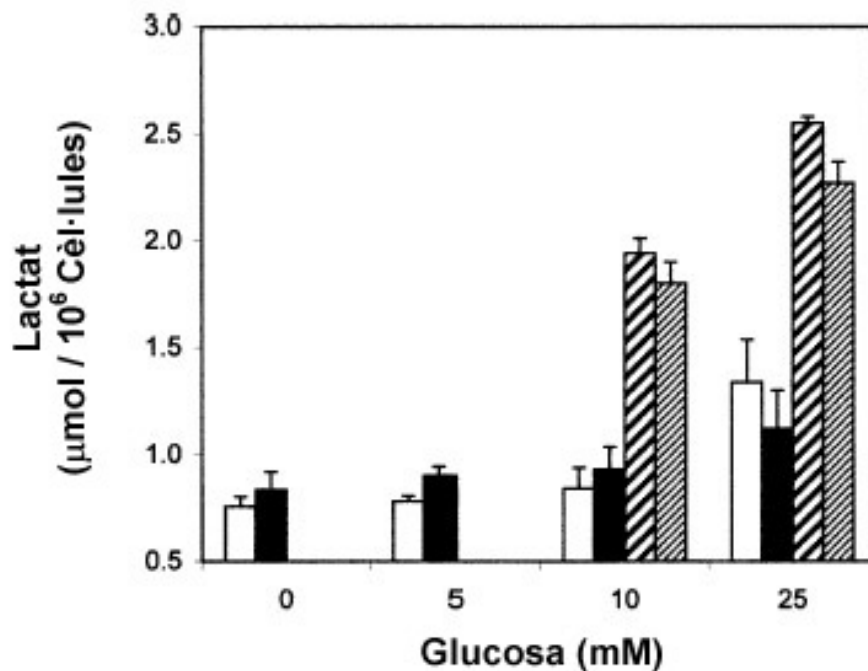
2.2.5 Producció de Lactat en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK o ambdues (RLGS/GK).

Per estudiar si la sobreexpressió afectava o no la via glucolítica es va mesurar la producció de lactat. La quantitat de lactat que s'alliberava al medi augmentava amb la concentració de glucosa, ara bé, aquests valors no eren significativament diferents entre els hepatòcits no tractats i aquells que sobreexpressaven la GS (Fig. 6).

Per contra, la sobreexpressió de la GK provocava un augment significatiu en el nivell de lactat alliberat al medi. Aquest augment era comparable al que es produïa quan es sobreexpressaven la GS i la GK de manera concomitant (Fig. 6).

Figura 6 Efecte sobre la producció de lactat de la sobreexpressió en hepatòcits de rata en cultiu de l'activitat GS, GK i la seva combinació (GS/GK).

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS (□), amb l'AdCMV-GK (■), amb l'AdCMV-RLGS més l'AdCMV-GK (▨) o bé es van deixar sense tractar (□) seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a diferents concentracions. Les cèl·lules van ser recuperades i la producció de lactat es va mesurar en el medi. Les dades representen les mitjanes \pm la S.E.M. de vuit experiments independents per l'AdCMV-RLGS i hepatòcits no tractats. Les dades representen les mitjanes \pm la S.E.M. de sis experiments independents per l'AdCMV-GK i la combinació AdCMV-RLGS/GK.



2.3 DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha estudiat el control de la biosíntesi hepàtica de glicogen. Generalment s'accepta que la GS és l'enzim limitant d'aquest procés. Els resultats presentats en aquest capítol demostraven que tant la GK com la GS estaven implicades en el control de la biosíntesi de glicogen en els hepatòcits, de tal manera que la GK controlava l'estat d'activació de la GS per la via dels nivells de Glu 6-P.

La sobreexpressió només de la GS provocava un increment en els nivells de la GS activa, induït per l'activitat GK endògena. Aquest fenomen es produïa al tenir més substrat disponible per a la desfosforilació depenent de Glu 6-P de la GS per part de les fosfatases. Quan se sobreexpressava la GK es produïa un augment en els nivells de Glu 6-P, aquests portaven a una major activació de la GS endògena. Quan sobreexpressavem tots dos enzims alhora, teníem una combinació dels dos efectes. Podem dir que l'efecte positiu de la Glu 6-P sobre la acumulació de glicogen no es devia a un efecte *push* per l'increment de la concentració de substrat, ja que els nivells de l'UDP-Glu no estaven augmentats significativament en els hepatòcits que sobreexpressen la GK. Un increment en els nivells de Glu 6-P produïts per la GK facilitava la desfosforilació de les molècules de GS i per tant, incrementava els nivells de GS activa que, per la seva banda, estiraven el substrat cap a glicogen (efecte *Pull*).

Els nostres resultats confirmaven que la concentració de GS activa era el factor clau en la síntesi del glicogen. Quan la glucosa era utilitzada com a substrat, aquesta concentració venia determinada pels nivells totals de GS i de GK.

Una vegada conegut qualitativament el mecanisme de control de la síntesi de glicogen en hepatòcits ens vàrem plantejar estudiar-lo des d'un punt de vista quantitatiu. Per aquest fi, vàrem calcular el coeficient de control de la GS

en diferents condicions metabòliques. El coeficient de control és un valor que ens indica la contribució d'un enzim sobre el flux de la via quan es produeix una variació dels seus nivells de proteïna o activitat. Així, el coeficient de control de la GS el podríem comparar amb el valor que es coneixia per a la GK i que se sap que a baixa glucosa és positiu i superior a 1, és a dir determinant en la via que participa.

Resultats: Capítol 3

COEFICIENT DE CONTROL DE LA GS EN LA SÍNTESI DE GLICOGEN EN HEPATÒCITS

3.1 INTRODUCCIÓ

En aquest capítol es va quantificar el control que exerceix la GS en la síntesi de glicogen, determinant el coeficient de control d'aquest enzim. Aquest paràmetre és una mesura de la variació del flux quan hi ha una variació en els nivells o bé de proteïna o bé d'activitat enzimàtica (Kacser i Burns 1973 i Fell 1992).

La sobreexpressió en hepatòcits de diferents enzims mitjançant adenovirus recombinants ha permès aconseguir un ampli espectre d'expressió de les diferents proteïnes, i per tant ha esdevingut una eina molt útil pel càlcul del seu coeficient de control (de la Iglesia *et al* 2000, Aiston *et al* 2001). En aquest capítol, es van utilitzar els adenovirus recombinants per a sobreexpressar de manera controlada la isoforma hepàtica de la GS en hepatòcits en cultiu.

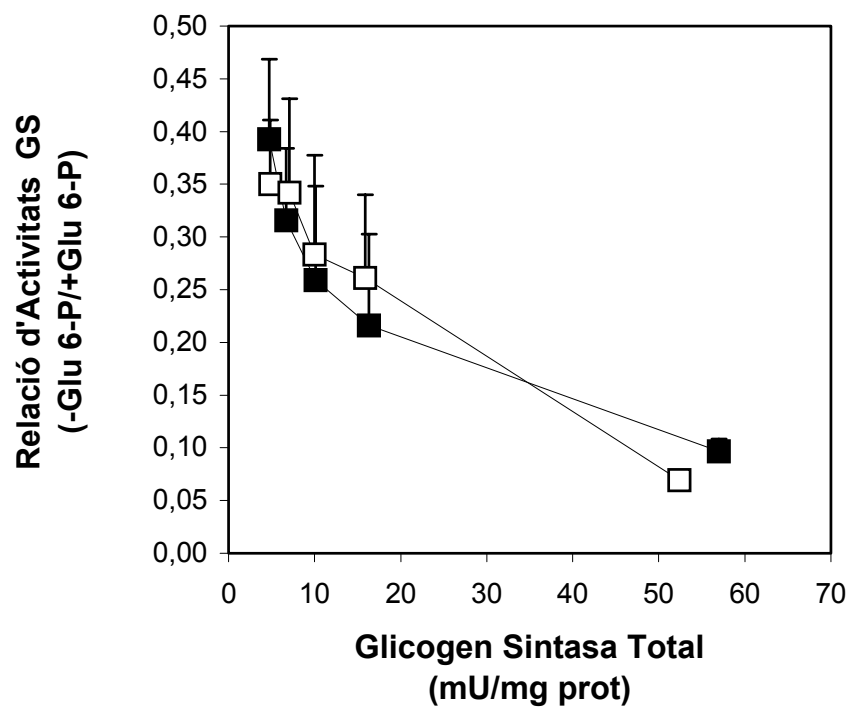
3.2 RESULTATS

3.2.1 Sobreexpressió de la GS en hepatòcits en cultiu: Canvis en la relació d'activitats.

L'objectiu d'aquest estudi era calcular el coeficient de control de la GS en la síntesi de glicogen a partir de glucosa mitjançant la sobreexpressió de l'enzim. A tal fi, es van utilitzar un ventall de dosis de l'adenovirus AdCMV-RLGS per assolir nivells de l'enzim d'interès d'entre 2 a 10 vegades els nivells endògens. L'activitat de la GS es va mesurar en absència (forma activa) o en presència (activitat total) de Glu 6-P. La sobreexpressió de la GS conduí a un increment fraccional menor en els nivells de GS activa (mesurada en absència de Glu 6-P) que no pas en l'activitat total quan els hepatòcits s'incubaven a una determinada dosi de glucosa. Com a resultat es va observar un marcat descens en la relació d'activitats entre la forma activa i la total (Fig. 1). Això suggeria que l'enzim sobreexpressat estava fosforilat en un grau superior que en les cèl·lules no tractades tot i que la concentració catalítica de la forma activa era més alta.

Figura 1 Evolució de la relació d'activitats GS a dosis creixents de GS total en hepatòcits.

Els hepatòcits van ser tractats amb dosis creixents de l'AdCMV-RLGS (no tractats, 5, 10, 20, 100 μ l del mateix *stock* viral) seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a diferents concentracions: 25 mM (\square) i 7,5 mM (\square). Les cèl·lules van ser descongelades i s'hi va mesurar el contingut de GS en presència i absència de Glu 6-P. Les dades representen les mitjanes \pm la S.E.M. de sis experiments independents



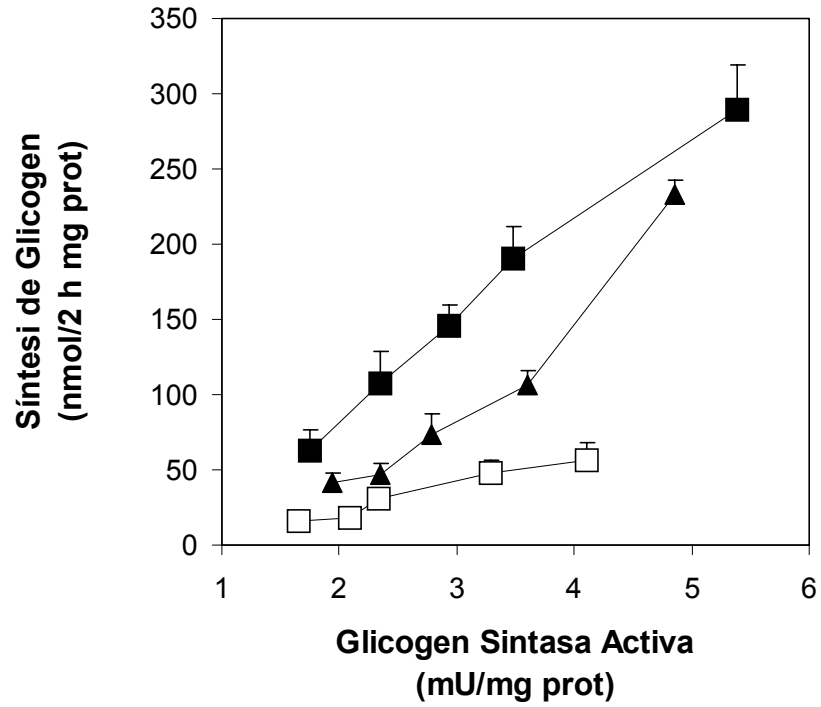
3.2.2 Determinació del coeficient de control de la GS.

La Fig. 2 mostra els efectes de l'increment en els nivells de GS sobre la incorporació de glucosa al glicogen en hepatòcits (mesurat mitjançant la incorporació de glucosa radioactiva marcada uniformement amb ^{14}C), expressat en funció dels nivells de GS total (Fig. 2B) o de l'activa (Fig. 2A). El coeficient de control de la GS sobre la síntesi de glicogen es va determinar calculant el pendent d'una representació doble logarítmica dels valors de síntesi de glicogen (flux metabòlic (J)) enfront de la concentració catalítica de la GS total o de la forma activa (Fig. 2, Bb i Aa). Les cèl·lules es van incubar amb glucosa a baixa (7,5 mM) o a alta concentració (25 mM) i també, amb glucosa a 7,5 mM en presència de sorbitol a una concentració de 200 μM . En aquesta última condició, el sorbitol actuava estimulando la sortida de la GK del nucli (Agius *et al* 1996). El coeficient de control de la GS, que representa el canvi fraccional en el flux com a resultat d'un petit canvi fraccional en el nivell d'activitat de l'enzim o en la seva concentració, va

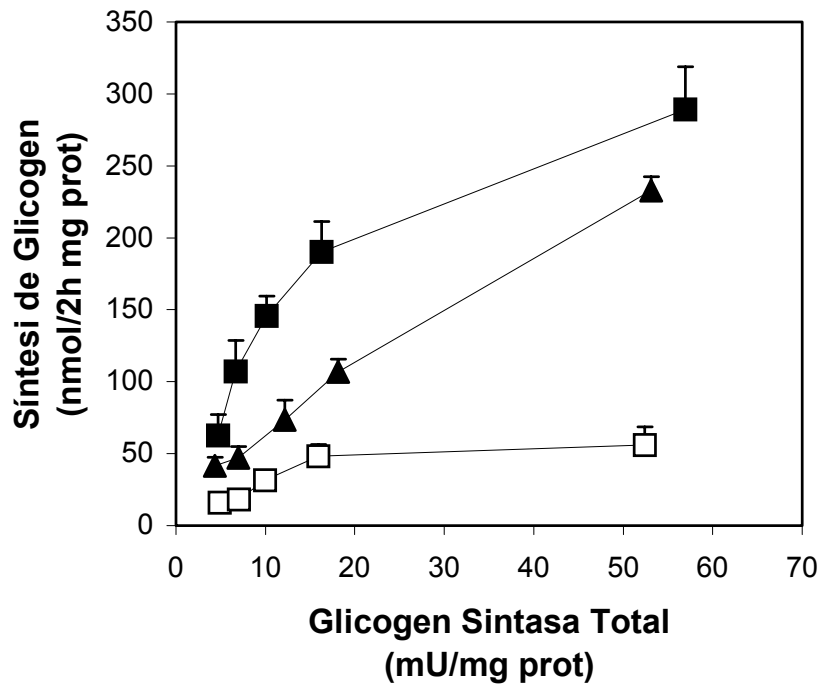
Figura 2 Síntesi de glicogen en funció de la concentració catalítica de GS activa o total.

El tractament dels hepatòcits fou el mateix que en la figura 1 d'aquest capítol. Es van mesurar els nivells de síntesi de glicogen i l'activitat GS activa en absència de Glu 6-P (A) i l'activitat GS total en presència de Glu 6-P (B) tal i com es descriu en els materials i mètodes. La gràfica Aa i Bb són la representació doble logarítmica dels valors de la gràfica A i B respectivament. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis experiments independents.

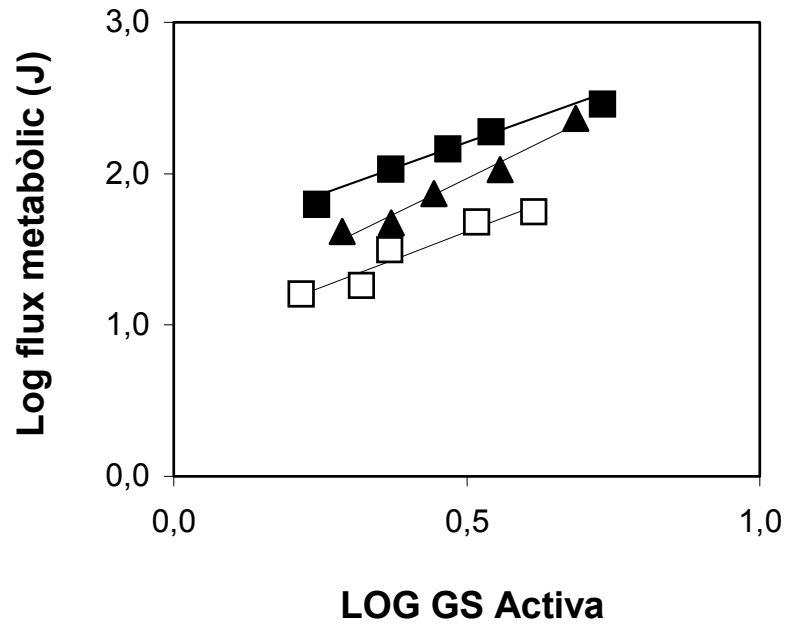
A



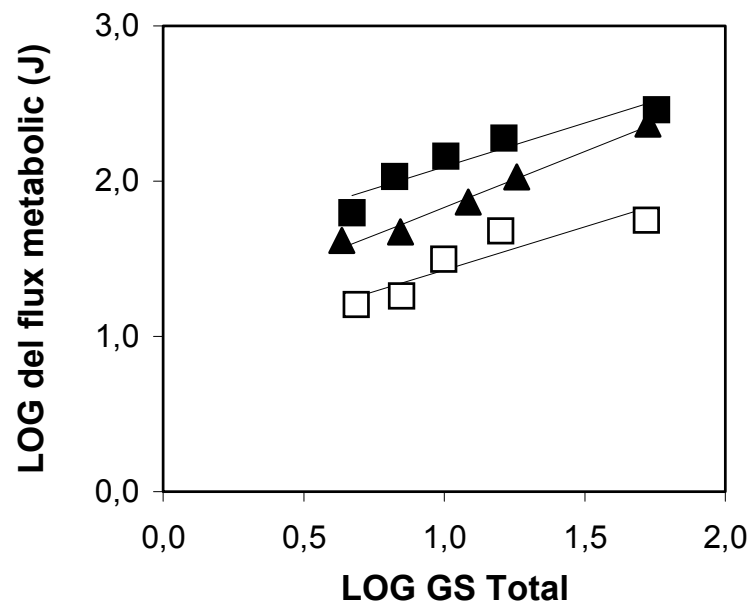
B



Aa



Bb



ser significativament diferent si es calculava a partir dels nivells de GS activa o total (Taula 1). En qualsevol cas, el valor que es va obtenir era positiu i elevat. Com es pot veure, el coeficient que es va obtenir era més alt quan s'expressava en relació a la forma activa que no pas quan es feia amb la GS total tal i com s'esperava de la disminució de la relació d'activitats quan es sobreexpressava la GS. En presència de glucosa a altes concentracions o de glucosa a baixes concentracions i sorbitol es va obtenir un coeficient de control per la forma activa de la GS que era superior a la unitat ($1,6 \pm 0,5$, $1,7 \pm 0,9$). En canvi a baixes concentracions de glucosa el coeficient de control seguia essent positiu però era sensiblement inferior al de les altres condicions ($1,1 \pm 0,3$). Tot i que els nivells de síntesi de glicogen eren superiors en presència de sorbitol o alta glucosa, els coeficients de control de la GS total, determinats com el pendent màxim de la gràfica de dobles logaritmes, eren similars en les tres condicions d'incubació (Fig. 2 i Taula 1).

Taula 1 Coeficients de control de la GS en la síntesi de glicogen a partir de glucosa.

Els coeficients de control han estat calculats com el pendent de les gràfiques doble logaritme de la síntesi de glicogen enfront els nivells de GS total o activa de la Figura 2. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis experiments.

	n	Coeficient Control (C_j)	
		Total	Activa
7,5mM Glucosa	5	* $0,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$
7,5mM Glucosa+Sorbitol	5	* $0,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,5$
25mM Glucosa	5	* $1,2 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,9$

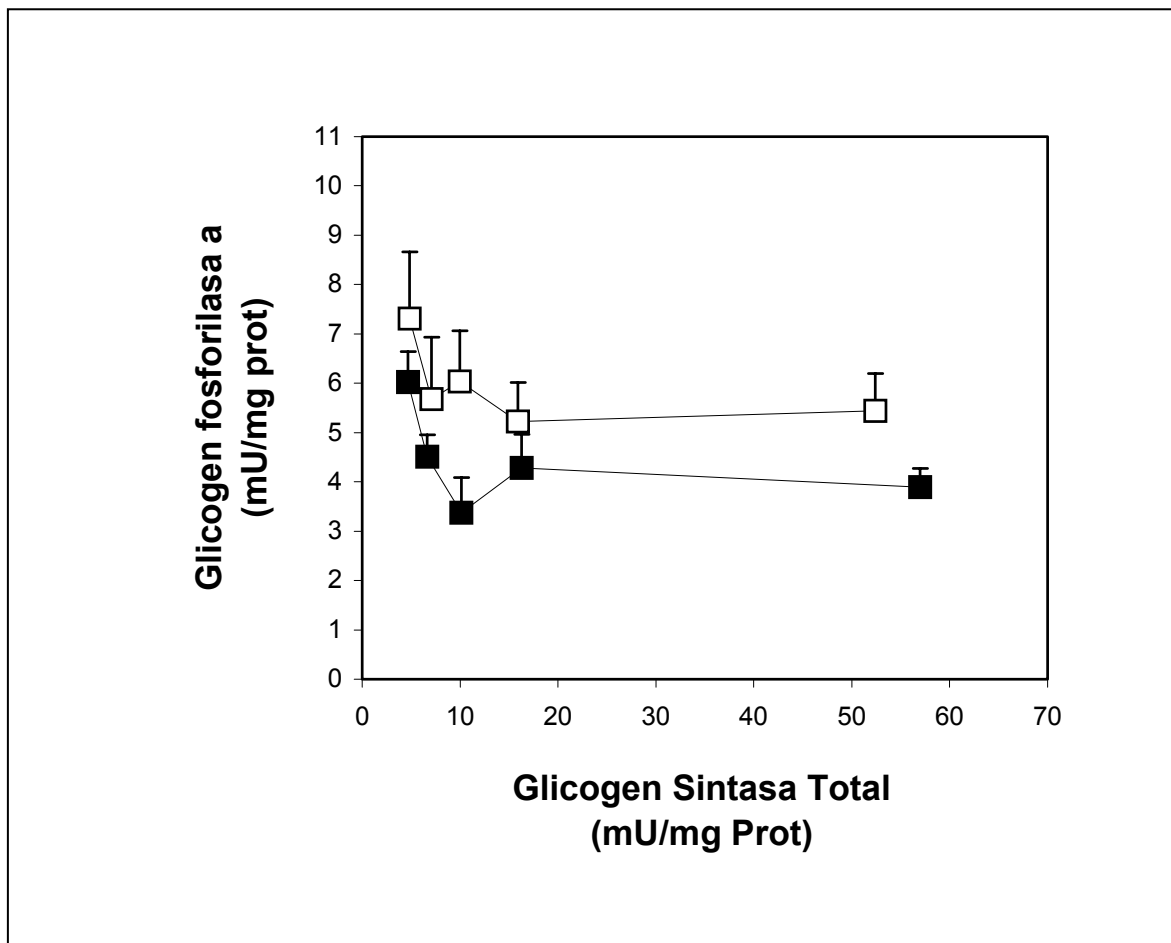
* $p < 0,05$, coeficients calculats per la forma total enfront de l'activa
El número d'experiments va ser n. Els valors representen la mitja \pm SEM.

3.2.3 Distribució de la GP en hepatòcits que sobreexpressen diferents nivells de GS.

S'havia descrit amb anterioritat que la GP tenia un coeficient de control elevat i negatiu en el control de la síntesi de glucosa. Per això es va mesurar l'activitat de la GP en diferents situacions metabòliques i nivells d'expressió de la GS. Volíem veure quin efecte tenia sobre el seu estat de fosforilació i la seva distribució la sobreexpressió de la GS. Una sobreexpressió de la GS total que no duplicava els nivells endògens s'associaven a un increment en els nivells de GS activa del 25-30% i amb una disminució (25%) de l'activitat GP-a mesurada en sobrenedants d'un pellet de 13.000 xg durant 6 minuts. Nivells més alts de sobreexpressió de GS total s'associaven a un progressiu increment en els nivells de GS activa però no amb un descens de la GP-a (Fig 1 i 2). Aquests resultats suggerien que la sobreexpressió de la GS provocava la inactivació de la GP i semblaven descartar la possible competició entre els dos enzims per la maquinària de desfosforilació. Tanmateix volíem aprofundir en l'estudi de l'activitat GP fent ús dels anticossos disponibles al laboratori, contra la GP i la seva forma fosforilada (activa).

Figura 2 Evolució de la relació d'activitats GP a dosis creixents de GS total en hepatòcits.

Els hepatòcits van ser tractats amb dosis creixents de l'AdCMV-RLGS (no tractats, 5, 10, 20, 100 μ l del mateix *stock* viral) seguint el protocol descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a diferents concentracions: 25 mM (\square) i 7,5 mM (\square). Les cèl·lules van ser descongelades i s'hi va mesurar el contingut de GS en presència de Glu 6-P i l'activitat GP en sobrenedants d'una centrifugació de 13.000 x g tal i com es descriu en els materials i mètodes. Les dades representen les mitjanes \pm la S.E.M. de sis experiments independents



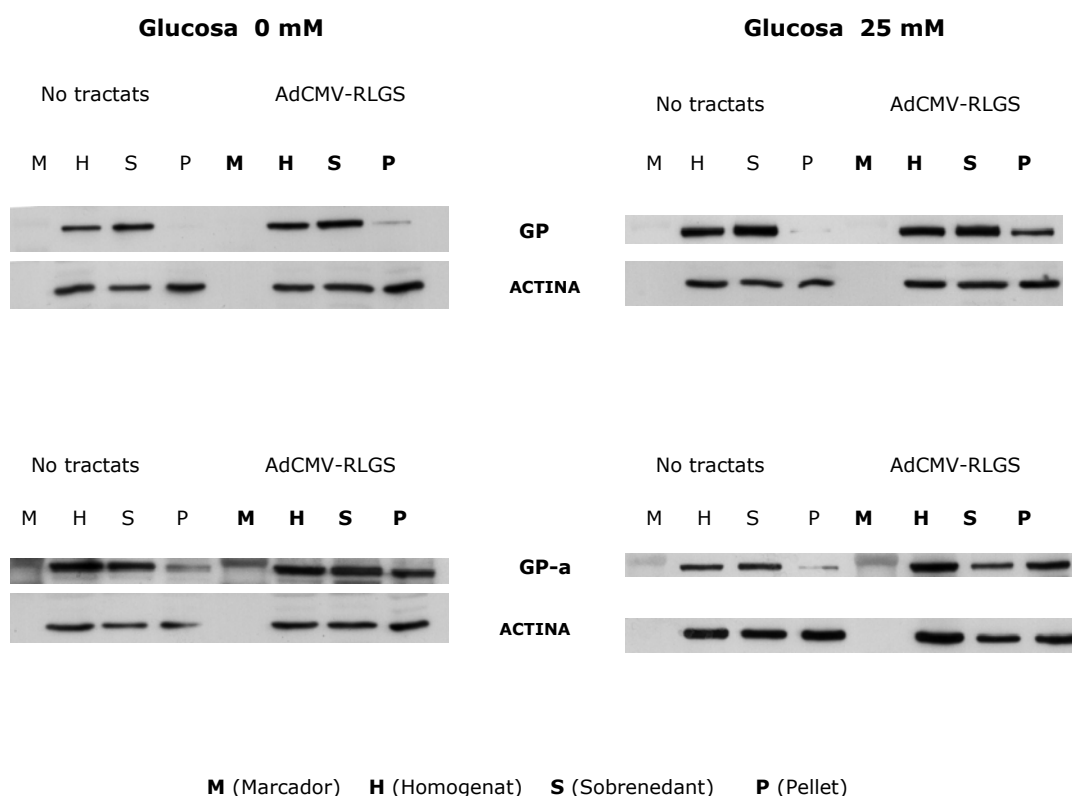
Quan es va mesurar mitjançant la tècnica del *Western blot* com es distribuïa la GP entre les dues fraccions de la centrifugació a 13.000 $\times g$ durant 6 minuts, es va observar que la GP en presència de glucosa 25 mM *translocava* d'una fracció soluble a una insoluble (Fig. 3). A més a més, la GP-a o forma fosforilada de la GP, l'activitat de la qual disminuïa a la fracció de sobrenedant, augmentava mesurada per *Western blot* a la fracció del pellet. Quan sobreexpressavem la GS, en hepatòcits, es va observar com augmentaven els nivells de la forma fosforilada de la GP, o GP-a, en comparació amb les cèl·lules control no tractades (Fig. 3). Aquests resultats indicaven una possible competència entre la GS i la GP pels llocs de desfosforilació i una *translocació* de la GP per glucosa a una fracció insoluble on es trobava el glicogen.

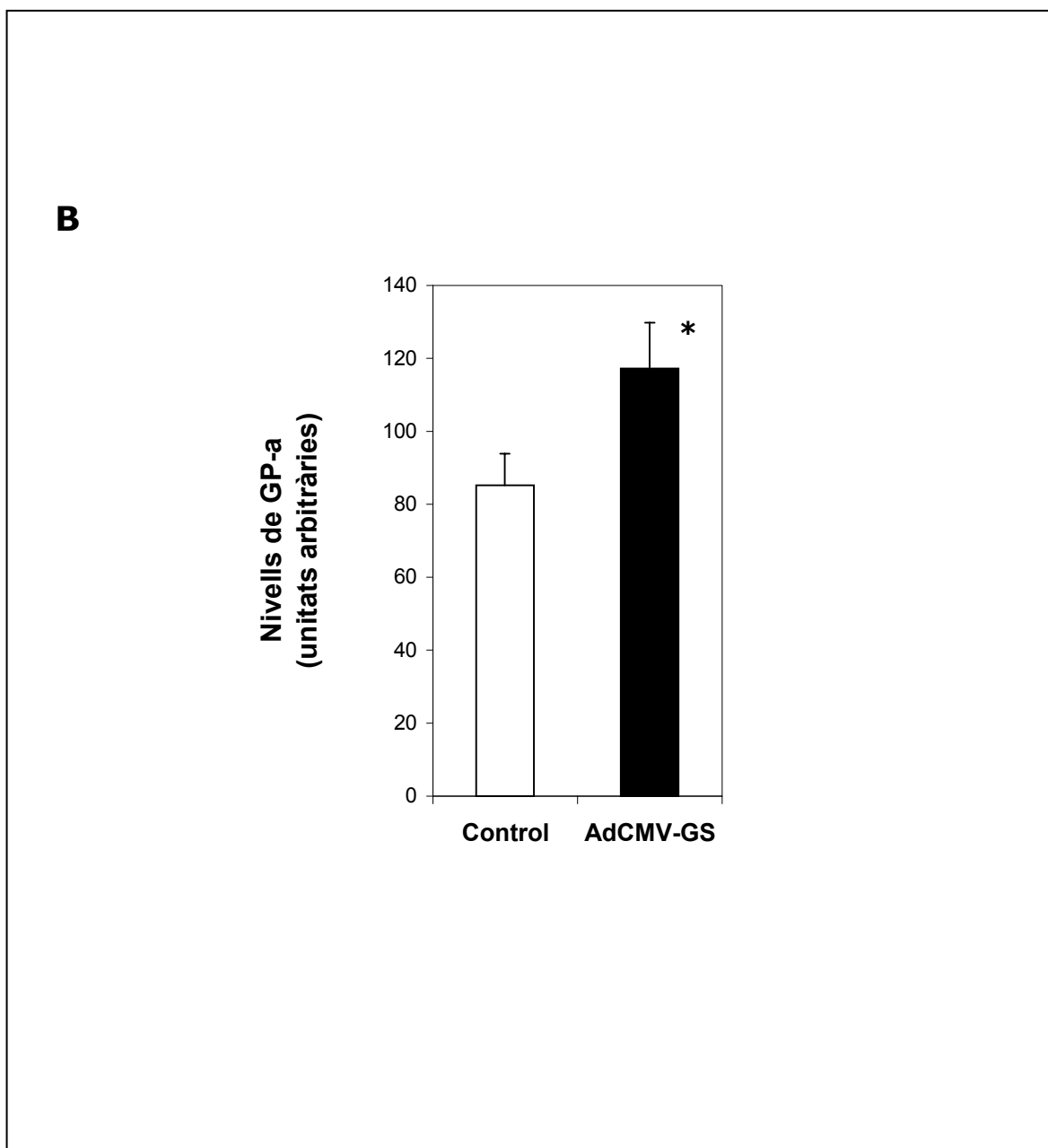
Figura 3 Western blot de GP I GPa.

Els hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS amb una dosi única de 100 μ l com es descriu en el capítol de materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, les cèl·lules es van incubar durant 2 hores amb glucosa a 25 mM. Les cèl·lules van ser recuperades i en els homogenats es van analitzar per *Western blot* els nivells de proteïna, utilitzant un anticòs contra la RLGP i un anticòs contra la GP-a (contra el residuu fosforilat en Ser¹⁴), figura A. Es van carregar 10 μ g en tots els pous i es va utilitzar com a control intern un anticòs comercial contra actina. La gràfica B mostra l'anàlisi densitomètric de les bandes corresponents a GP-a en condicions de glucosa 25 mM en cèl·lules tractades amb el virus i no tractades de tres experiments (Unitats arbitràries).

* $p < 0,05$ respecte els nivells de GP-a de les cèl·lules no infectades

A





3.3 DISCUSSIÓ

Els nostres resultats van confirmar quantitativament el paper clau de la GS en el control de la síntesi de glicogen hepàtic. Es va determinar que la GS tenia un elevat coeficient de control sobre la síntesi de glicogen tot i que depenia de si el es mesurava en relació a la forma activa o a total de l'enzim. La GS activa (aquella responsable de la síntesi de glicogen) tenia un coeficient de control positiu i superior a 1. Això implicava segons la teoria del control metabòlic que la GS tenia un paper important en el control i la regulació de la síntesi de glicogen. Cosa que no havia d'estranyar en veure que el coeficient de control de la GP també és molt elevat i negatiu en condicions de síntesi de glicogen (Aiston *et al* 2001). Cal recordar que la suma de coeficients de control d'una via metabòlica segons la teoria del control metabòlic és 1 (Kacser i Burns 1979).

El coeficient de control de la GS en la síntesi de glicogen a partir de glucosa és elevat al igual que el de la GK (de la Iglesia *et al* 2000). Ara bé, aquests dos enzims presenten un coeficient de control diferent a alta o a baixa glucosa de tal manera que en unes circumstàncies el control sobre la síntesi de glicogen recau majoritàriament en la GS i en d'altres sobre la GK. En particular, el control exercit per la GK és a través de la regulació dels nivells totals de l'enzim a baixes concentracions de glucosa. El flux de la GK no està alterat per canvis en els metabòlits que hi ha al seu darrera (Aiston *et al* 1999). Per això, el control és exercit a través de la seva unió i retenció al nucli (de la Iglesia *et al* 2000). En aquestes condicions de baixa glucosa, el control sobre la síntesi de glicogen recau sobre la GK i l'exercit per la GS és menor. En canvi, a alta glucosa o baixa glucosa amb sorbitol (estimulador de la sortida de GK del nucli) el control síntesi de glicogen a partir de glucosa recau sobre la GS la qual juga un paper molt important, en canvi, la GK passa a ser secundària al trobar-se majoritàriament en forma lliure en el citosol. El fet que s'obtingués un valor diferent a alta i baixa glucosa podia ser modulats per la diferent localització subcel·lular de la GS (capítol 1) o de la GK (de la Iglesia *et*

al 1999) a les diferents condicions. La GP, per altra banda, presenta un elevat coeficient de control sobre la síntesi de glicogen encara que en direcció oposada al de la GK i la GS. El control exercit per la GP és via canvis en el seu estat d'activació (Aiston *et al* 2001).

La sobreexpressió de la GS conduïa a un increment en la quantitat total d'activitat GS. Aquest increment en la quantitat de GS total no implicava un increment paral·lel en els nivells de GS activa. Tanmateix, en presència de glucosa aquest monosacàrid induïa un increment en els nivells de GS activa tot i que, no s'assolia la proporció en les relació d'activitats GS (-Glu 6-P/+ Glu 6-P) que s'observava en els hepatòcits control. Quan es mesuraven els nivells de GP-a (fosforilada) per *Western blot*, també veiem que estaven incrementats en hepatòcits que sobreexpressaven la GS respecte dels controls. Això semblava indicar que tots dos enzims competien per la mateixa maquinària de desfosforilació. La sobreexpressió d'un d'ells podia causar la saturació de la mateixa i en conseqüència l'activació de l'altre enzim. La subunitat reguladora de fosfatases, PTG (*protein targeting to glycogen*), presenta un domini d'unió al C-terminal per la GS i la GP, era per això que es proposava que els dos enzims necessitaven interaccionar amb aquesta proteïna per a ser en un cas activat i en l'altre desactivat per desfosforilació.

A més a més, l'augment en la capacitat de l'hepatòcit d'acumular glicogen en resposta a glucosa, per efecte de l'increment en l'activitat GS, anava acompanyat d'una *translocació* de la GP. Es va descriure que la GP hepàtica *translocava* d'una fracció de sobrenedant de 13.000 xg al pellet en presència de glucosa. A més a més es va observar que aquest enzim *translocat* es trobava fosforilat i per tant en forma activa. Probablement l'enzim estava disposat per degradar glicogen ràpidament quan els nivells de glucosa baixessin per sota d'un determinat llindar.

Resultats: Capítol 4

LA ISOFORMA HEPÀTICA DE LA GLICOGEN SINTASA PERÒ NO LA MUSCULAR ÉS CAPAÇ DE DIFERENCIAR ENTRE LA GLUCOSA 6-FOSFAT PRODUÏDA PER LA GLUCOQUINASA DE LA HEXOQUINASA.

4.1 INTRODUCCIÓ:

S'havia descrit que la Glu 6-P de la GK era capaç d'estimular millor l'activació de la GS que no pas quan aquest metabòlit era sintetitzat per la HK I (Seoane *et al* 1996). En aquest capítol es va intentar aprofundir en el coneixement de la possible relació existent entre les diferents activitats fosforiladores de glucosa presents en hepatòcits i la GS hepàtica i muscular. Els hepatòcits, que havien estat fins a aquest moment el nostre model, no eren adequats per a fer aquest estudi ja que tenien elevats nivells de GK i d'Hexokinasa I (HK I) i no ens permetien diferenciar l'efecte d'un enzim o de l'altre.

En aquest estudi es van aprofitar les característiques de la línia cel·lular FTO-2B d'hepatoma de rata per demostrar que la isoforma hepàtica de la glicogen sintasa (LGS), però no la muscular (MGS), era capaç de diferenciar entre la Glu 6-P produïda per la GK de la HK. En canvi la isoforma muscular era capaç d'activar-se i sintetitzar glicogen en resposta a glucosa, independentment de quin tipus d'HK hi havia en les cèl·lules.

La línia cel·lular FTO-2B d'hepatoma de rata presenta un fenotip hepàtic molt diferenciat (Zvibel *et al* 1998 i Killary *et al* 1984), aquestes cèl·lules expressen gens característics del fetge, com és ara l'albumina i el receptor d'IGF II. Tanmateix, les cèl·lules FTO-2B no expressen GK, però, per contra, expressen nivells alts d'HK I (Valera *et al* 1994). L'expressió mitjançant retrovirus de la GK en aquesta línia cel·lular va restaurar la capacitat de les mateixes per

sintetitzar glicogen. En aquest article es suggeria que l'increment en els nivells de Glu 6-P eren els responsables per l'increment en la deposició de glicogen (Valera et al 1994).

4.2 RESULTATS:

4.2.1 Caracterització de les cèl·lules FTO-2B.

El fenotip de les cèl·lules FTO-2B és el més similar als hepatòcits d'entre totes les línies cel·lulars d'hepatoma (Zvibel *et al* 1998). Aquestes cèl·lules expressaven nivells no detectables de GK tant si es mesurava l'activitat (Taula 1) com si es determinava la proteïna (Fig. 1B, línia i) però presentaven nivells alts d'HK I (fig. 1A, línia i i Taula 1). Aquestes dues observacions estaven d'acord amb resultats previs (Killary *et al* 1984 i Valera *et al* 1994). Les cèl·lules FTO-2B, úniques entre les línies cel·lulars de tumors hepàtics, expressaven la isoforma hepàtica de la GS (Fig. 1C, línia i), inclòs a nivells més alts que els hepatòcits en cultiu (Taula 1), i no expressaven quantitats detectables de MGS (Fig. 1D, línia i).

Taula 1 Activitats HK I, GK i GS total i activa en les cèl·lules FTO-2B que sobreexpressen HK I, GK, LGS i MGS.

Les cèl·lules es van tractar amb adenovirus que codificaven per les diferents proteïnes indicades a la taula i posteriorment, incubades durant 24 hores amb DMEM amb 10 mM glucosa. Després el medi es substituïa per DMEM sense glucosa i es continuava la incubació de 12 a 14 hores. Seguidament, les cèl·lules van ser incubades durant dues hores amb medi que contenia glucosa a 25 mM i es van recollir per mesurar l'activitat HK I, GK i GS total, tal i com es descriu als materials i mètodes. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis experiments. Les dades que es presenten d'hepatòcits en cultiu són per comparar i estan extretes de la referència Gomis *et al* 2000.

	HK I	GK	Total GS
	(mU/mg prot)	(mU/mg prot)	(mU/mg prot)
Hepatòcits en Cultiu	4,5 ± 0,6	12,0 ± 18	3,1 ± 0,2
AdCMV-GFP	8,2 ± 1,6	0,3 ± 0,1	9,9 ± 1,8
AdCMV-HK I	44,7 ± 3,2	0,8 ± 0,2	10,4 ± 1,8
AdCMV-GK	9,2 ± 1,8	12,2 ± 2,2	11,5 ± 1,6
AdCMV-LGS	9,4 ± 1,8	1,0 ± 0,4	33,8 ± 3,5
AdCMV-LGS/HK I	49,4 ± 5,7	1,2 ± 0,3	22,4 ± 2,4
AdCMV-LGS/GK	7,2 ± 0,9	13,6 ± 3,3	26,7 ± 2,8
AdCMV-MGS	8,2 ± 1,6	0,6 ± 0,3	24,3 ± 3,6
AdCMV-MGS/HK I	55,6 ± 0,9	1,2 ± 0,2	23,4 ± 2,5
AdCMV-MGS/GK	6,3 ± 0,9	9,6 ± 2,3	30,1 ± 5,5

4.2.2 Sobreexpressió de la HK I, la GK, la LGS i la MGS mitjançant adenovirus.

La sobreexpressió de proteïnes mitjançant adenovirus recombinants és molt eficient en cèl·lules FTO-2B. Quan es va fer servir l'AdCMV-GFP com a control a una multiplicitat d'infecció de 5, més del 95 % de les cèl·lules tractades amb l'adenovirus expressaven la GFP, detectada mitjançant microscòpia de fluorescència.

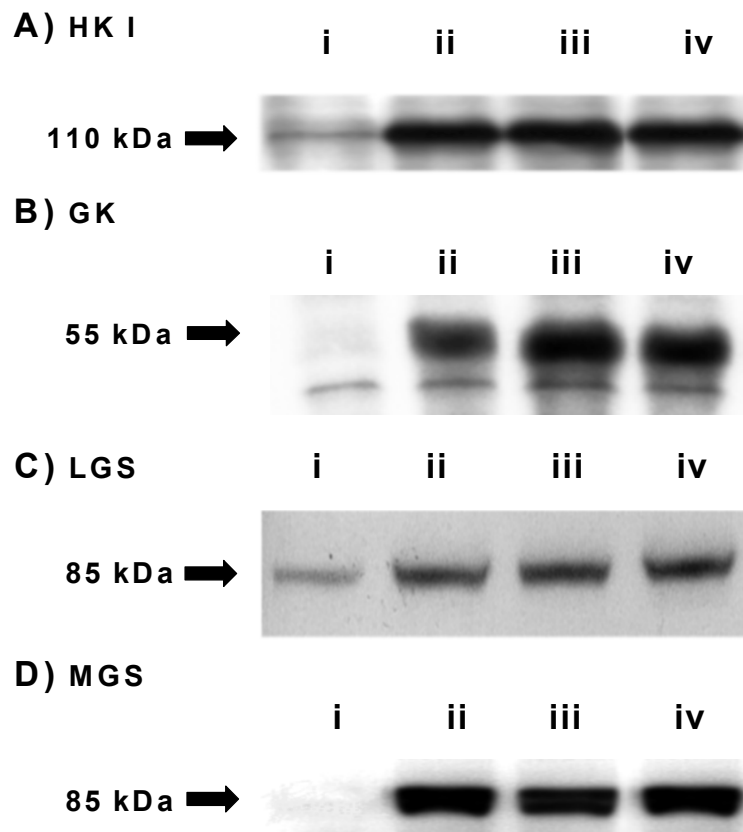
La infecció de les cèl·lules FTO-2B amb l'AdCMV-HK I va produir un increment de 5 vegades en els nivells d'activitat i de contingut de la proteïna HK I (Fig. 1A, línies i-ii i taula 1). Quan es va infectar amb l'AdCMV-GK, l'activitat GK en les cèl·lules infectades arribava a nivells similars a aquells que es van trobar en hepatòcits en cultiu (Taula 1). També es va comprovar la seva expressió per *Western Blot* (Fig. 1B, línia ii). Les cèl·lules infectades amb l'AdCMV-LGS van mostrar un increment de 3 vegades en l'activitat total GS (Taula 1). Aquest increment era consistent amb l'increment en el contingut de proteïna analitzat per *Western Blot* (Fig. 1C, línies i-ii) amb un anticòs específic contra LGS de rata (L_1). De manera anàloga, la MGS es va sobreexpressar en les cèl·lules FTO-2B al infectar-les amb l'AdCMV-MGS assolint uns increments de 3 vegades en l'activitat total GS (Taula 1). La presència de la isoforma muscular també es va detectar per *Western Blot*, utilitzant anticossos específics contra la MGS (Fig. 1D, línia ii). La multiplicitat d'infecció (m.o.i.) utilitzada en tots aquests casos va ser de 5, excepte per l'adenovirus AdCMV-HK I on es va utilitzar una multiplicitat d'infecció de 10 a fi d'obtenir uns nivells intracel·lulars de Glu 6-P similars als que es van obtenir en la infecció amb l'AdCMV-GK.

Les cèl·lules FTO-2B també van ser coinfectades amb l'AdCMV-LGS més l'AdCMV-HK I o l'AdCMV-GK, i coinfectades amb l'AdCMV-MGS més l'AdCMV-HK I o l'AdCMV-GK. En els experiments de doble infecció, tant els nivells d'activitat HK I, GK i activitat total GS com els de proteïna (mesurats per

Western Blot) van ser comparables a aquells obtinguts quan fèiem servir els virus d'un en un (Taula 1). Un dels objectius era assolir per les sobreexpressions de les diferents isoformes de GS uns nivells d'activitat total (mesurats en presència de Glu 6-P) similars.

Figura 1 Expressió de la HK I, GK, LGS i MGS en cèl·lules FTO-2B tractades amb adenovirus.

A) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (i), AdCMV-HK I (ii) AdCMV-LGS/HK I (iii) o AdCMV-MGS/HK I (iv). B) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (i), AdCMV-GK (ii), AdCMV-LGS/GK (iii) o AdCMV-MGS/GK I (iv). C) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (i), AdCMV-LGS (ii), AdCMV-LGS/GK (iii) o AdCMV-LGS/HK I (iv). D) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (i), AdCMV-MGS (ii) AdCMV-MGS/GK (iii) or AdCMV-MGS/HK I (iv), tal i com es descriu en els materials i mètodes. La multiplicitat d'infecció (m.o.i) fou de 5 per a tots els virus, excepte per l'AdCMV-HK I que va ser usat a una m.o.i de 10. Després de la infecció, les cèl·lules van ser incubades durant 24 hores amb DMEM que contenia glucosa a 10 mM. Seguidament el medi es va canviar per DMEM sense glucosa i es van incubar durant 12-14 hores més. Finalment, les cèl·lules es van incubar 2 hores amb DMEM amb 25 mM glucosa, i es van recollir. Els homogenats van ser analitzats per *Western blot*, utilitzant anticossos contra HK I (A), GK (B), LGS (C) o MGS (D) (es van carregar 10 µg de proteïna per carril).



4.2.3 Impacte metabòlic de la sobreexpressió de la HK I o la GK.

Tot i que tenien 3 vegades més activitat GS total que els hepatòcits en cultiu (Taula 1), les cèl·lules FTO-2B sintetitzaven quantitats de glicogen negligibles quan s'incubaven amb glucosa a concentracions creixents (Fig. 2A). Els nivells intracel·lulars de Glu 6-P pujaven bruscament quan les cèl·lules eren incubades amb glucosa a 5 mM i es mantenien constants a 2 nmols/ mg prot, a concentracions més altes de glucosa (Fig. 2B). Tot i això, aquesta acumulació de Glu 6-P no induïa ni l'activació de la LGS (Fig. 2C) ni l'acumulació de glicogen.

La sobreexpressió de la HK I en les cèl·lules FTO-2B portava a un marcat increment dels nivells de Glu 6-P quan s'incubaven amb glucosa i a 25 mM eren aproximadament 3 vegades més grans que en els controls infectats amb l'adenovirus AdCMV-GFP (Fig. 2B). La sobreexpressió de la HK I no provocava cap increment significatiu en la capacitat de sintetitzar glicogen (Fig. 2A), ni la quantitat de sintasa activa variava significativament respecte la que hi havia en les cèl·lules control (Fig. 2C). Per contra, la sobreexpressió de la GK tenia uns efectes molt importants en la capacitat de les FTO-2B de sintetitzar glicogen. Quan es va incubar amb glucosa a concentracions elevades, les cèl·lules infectades amb l'AdCMV-GK produïen més del doble de glicogen que els controls i les que sobreexpressaven la HK I (Fig. 2A). A diferència de les cèl·lules control, en les cèl·lules que sobreexpressaven la GK, la GS endògena era activada per la Glu 6-P de manera depenent de la concentració (Fig. 2C). Curiosament, el gran increment obtingut en els nivells de LGS activa, en el cas de les cèl·lules infectades amb l'AdCMV-GK, s'obtenia a uns nivells de Glu 6-P similars, o fins i tot inferiors, als que es van mesurar en cèl·lules que sobreexpressaven la HK I (Fig. 2B). Tal i com s'ha indicat en l'apartat anterior, no es va observar activació de la GS en l'últim cas.

Figura 2A Efectes de la sobreexpressió de la HK I i la GK en la acumulació de glicogen en cèl·lules FTO-2B.

A) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (barres blanques), AdCMV-HK I (barres ratllades) o AdCMV-GK (barres negres), tal i com s'ha descrit en els material i mètodes. Després de la infecció, les cèl·lules van ser incubades durant 24 hores amb DMEM que contenia 10 mM glucosa. Seguidament el medi es va canviar per DMEM sense glucosa i es van incubar durant 12-14 hores. Finalment, les cèl·lules es van incubar 2 hores amb DMEM amb un ventall de concentracions de glucosa. Després van ser congelades i descongelades i es va mesurar el contingut de glicogen. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis a vuit experiments independents. Les lletres indiquen significació estadística ($p < 0,05$) per les comparacions entre les cèl·lules tractades amb AdCMV-GFP (a), AdCMV-HK I (b).

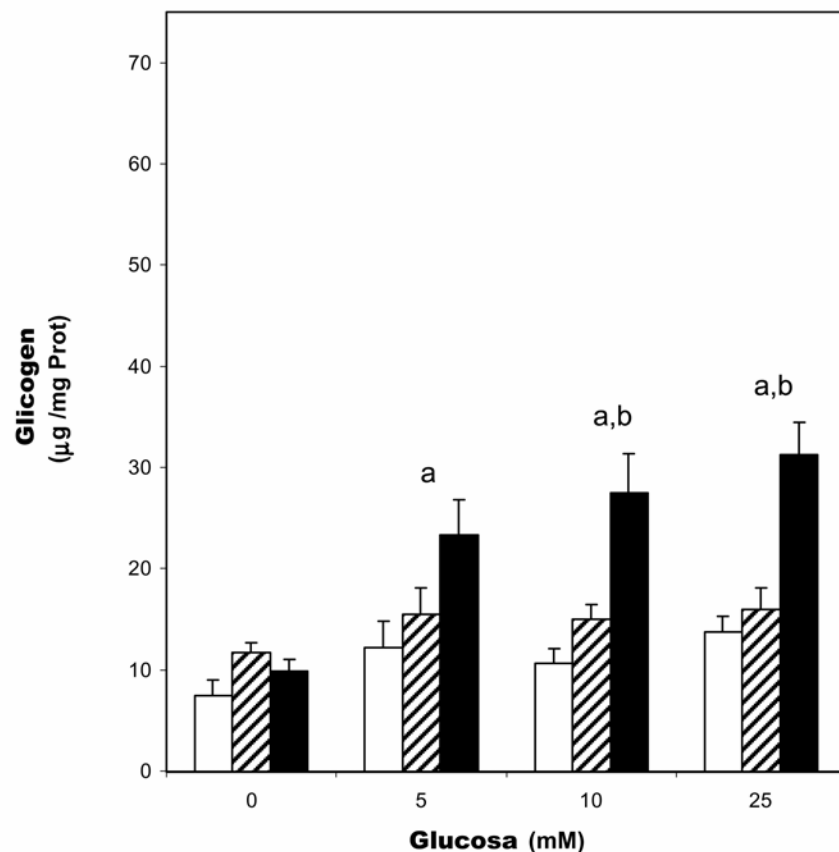


Figura 2B Efectes de la sobreexpressió de la HK I i la GK en els nivells de Glc 6-P en cèl·lules FTO-2B.

Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (quadrats blancs), AdCMV-HK I (Triangles blancs) o AdCMV-GK (triangles negres), i es van incubar tal i com es descriu en la llegenda de la figura 2A. Les cèl·lules es van recollir i es va mesurar la concentració de Glu 6-P intracel·lular. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis a vuit experiments independents.

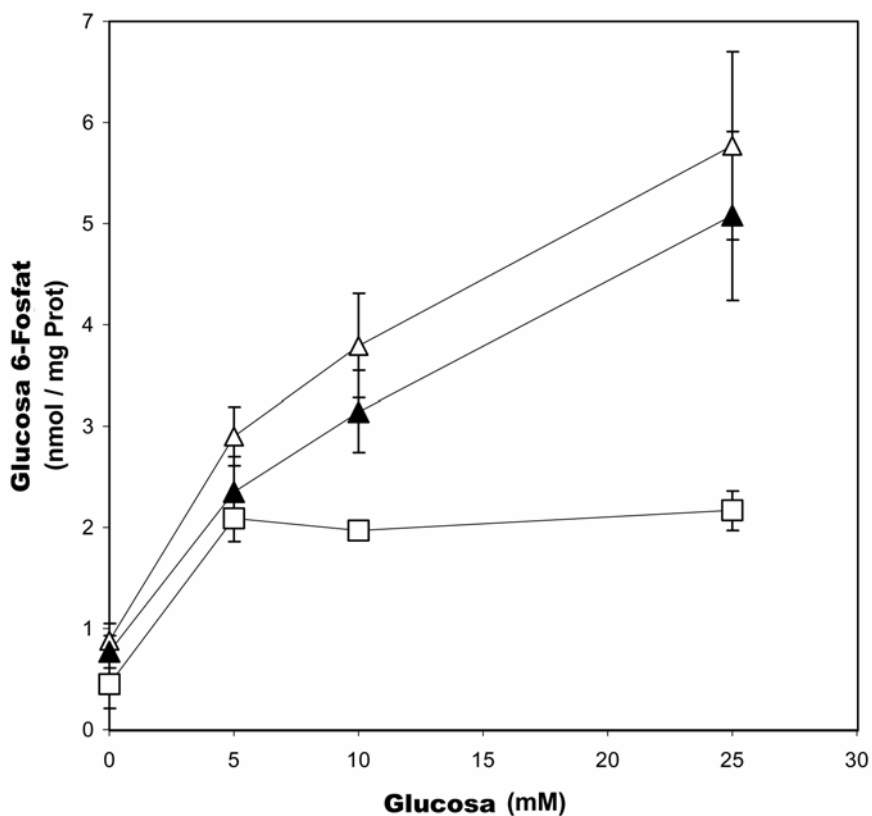
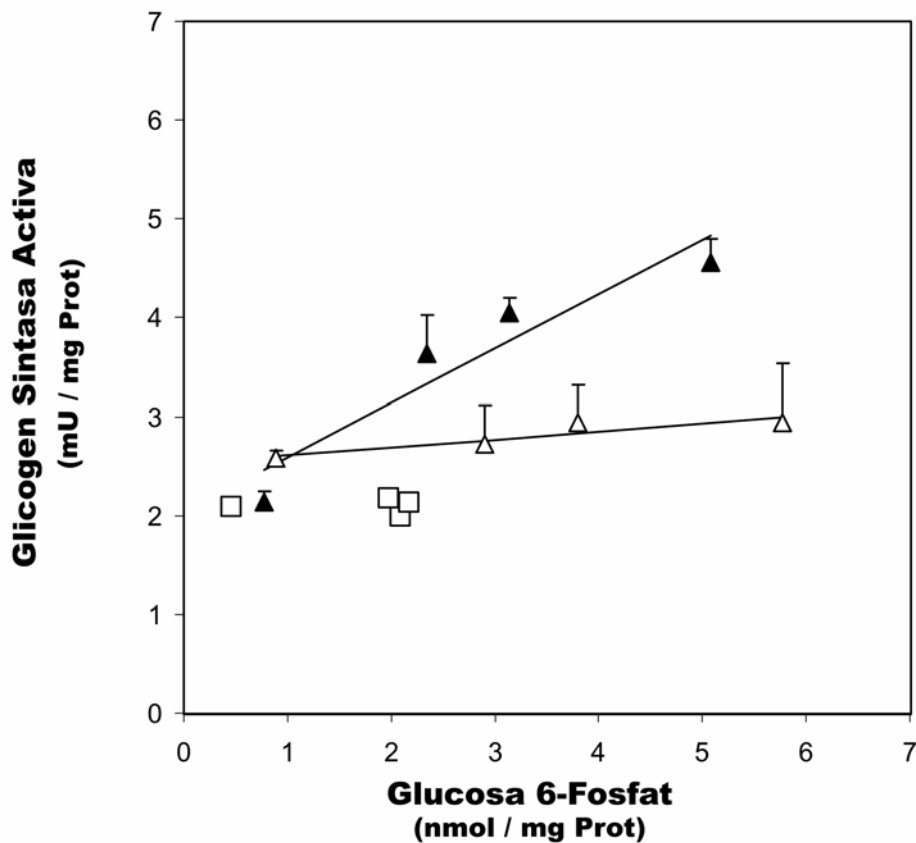


Figura 2C Correlació entre l'activació de la GS i la concentració intracel·lular de Glu 6-P en cèl·lules FTO-2B.

Les cèl·lules van ser tractades amb l'AdCMV-GFP (quadrats blancs), AdCMV-HK I (triangles blancs) o AdCMV-GK (triangles negres), i es van incubar tal i com es descriu en la llegenda de la figura 2a. Les cèl·lules es van recollir i es va mesurar l'activitat GS en els homogenats. La GS activa es mesura en absència de Glu 6-P tal i com es descriu als materials i mètodes. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis a vuit experiments independents.



4.2.4 Impacte metabòlic de la sobreexpressió de la glicogen sintasa de múscul i de fetge.

La sobreexpressió de la LGS tres vegades respecte els nivells control no va incrementar l'acumulació de glicogen, encara que les FTO-2B van ser incubades a altes concentracions de glucosa (Fig. 3A). La LGS sobreexpressada es va comportar com l'enzim endogen, ja que no s'activava en resposta a increments en la concentració intracel·lular de Glu 6-P (Fig. 5A). Per contra quan es va expressar la MGS es va trobar un marcat increment en la síntesi de glicogen (Fig. 3B) en resposta a dosis creixents de glucosa. Els nivells d'activitat total GS eren similars tant en la sobreexpressió de la LGS com de la MGS (Taula 1). Encara que les sobreexpressions de LGS o MGS no variaven la concentració de Glu 6-P (Fig. 4 A, B), el contingut de GS activa era molt més gran en les cèl·lules que sobreexpressaven la isoforma muscular de la GS i aquest contingut augmentava linealment amb l'increment de la concentració de Glu 6-P (Fig. 5B).

Figura 3 Efectes de la sobreexpressió de la LGS i la MGS en la acumulació de glicogen en cèl·lules FTO-2B.

A) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (barres blanques), AdCMV-LGS (barres amb ratlles amples), AdCMV-LGS més AdCMV-HK I (barres amb ratlles estretes) o AdCMV-LGS més AdCMV-GK (barres negres). B) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (barres blanques), AdCMV-MGS (barres amb ratlles amples), AdCMV-MGS més AdCMV-HK I (barres amb ratlles estretes) o AdCMV-MGS més AdCMV-GK (barres negres), tal i com s'ha descrit en els material i mètodes. Després de la infecció, les cèl·lules van ser incubades durant 24 hores amb DMEM amb glucosa 10mM. Seguidament el medi es va substituir per DMEM sense glucosa i es van incubar durant 12-14 hores. Finalment, les cèl·lules es van incubar 2 hores amb DMEM amb un ventall de concentracions de glucosa. Després les cèl·lules van ser congelades i descongelades i es va mesurar el contingut de glicogen.

Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis a vuit experiments independents. Les lletres indiquen significància estadística ($p < 0,05$) per les comparacions entre les cèl·lules tractades amb AdCMV-GFP (a), AdCMV-HK I (b), AdCMV-LGS (c), AdCMV-LGS/HK I (d), o AdCMV-MGS (e).

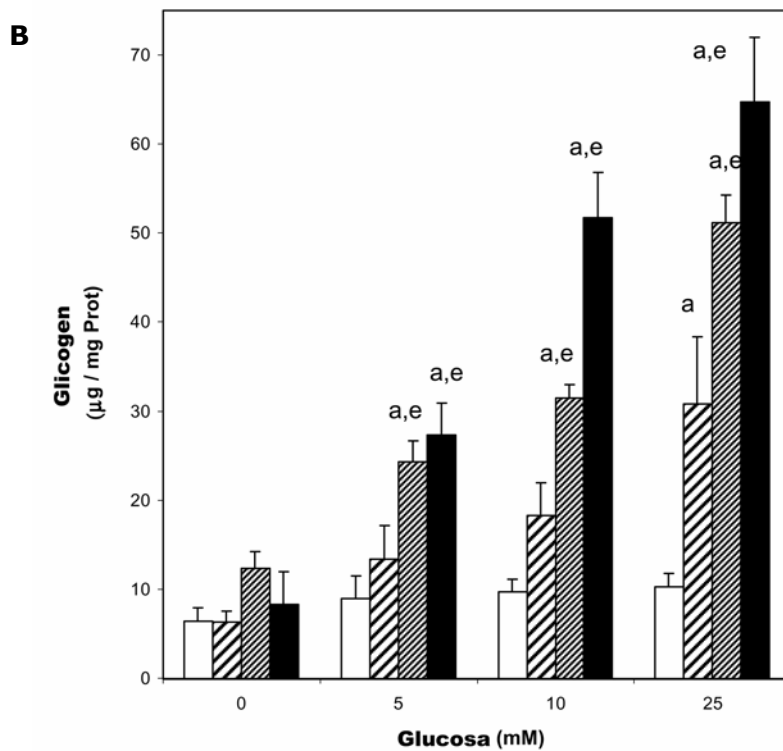
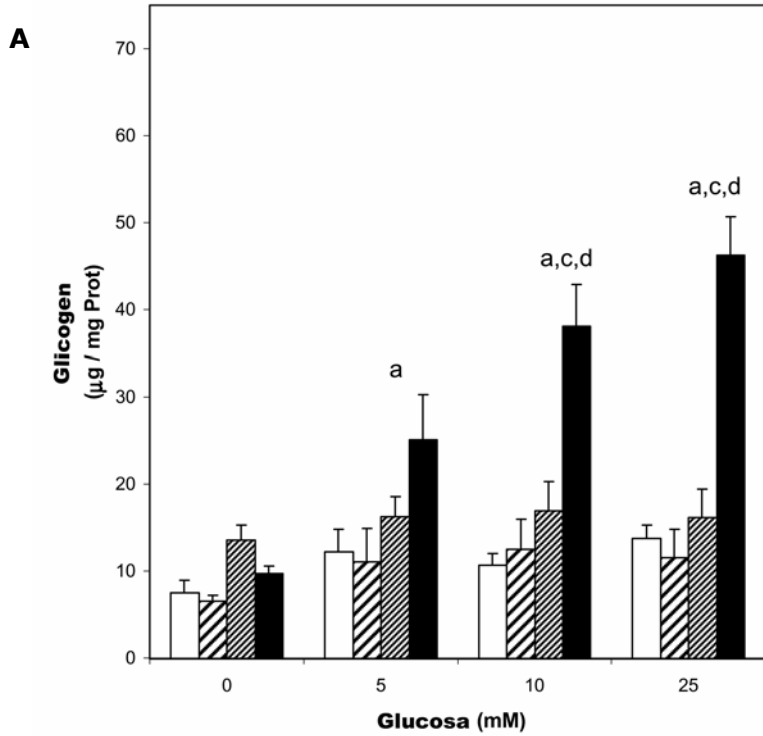
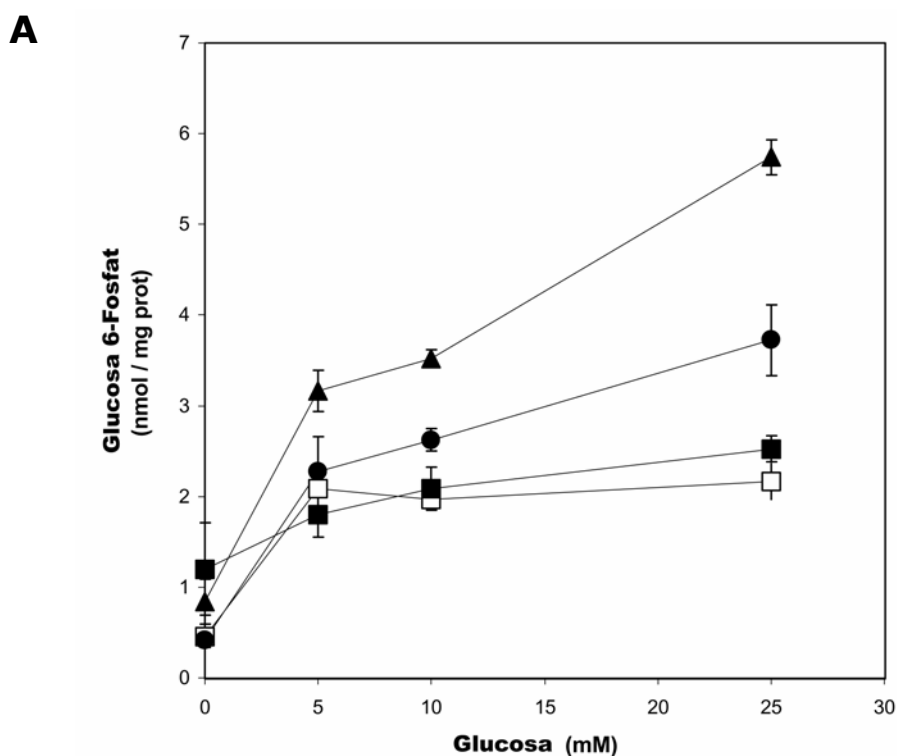
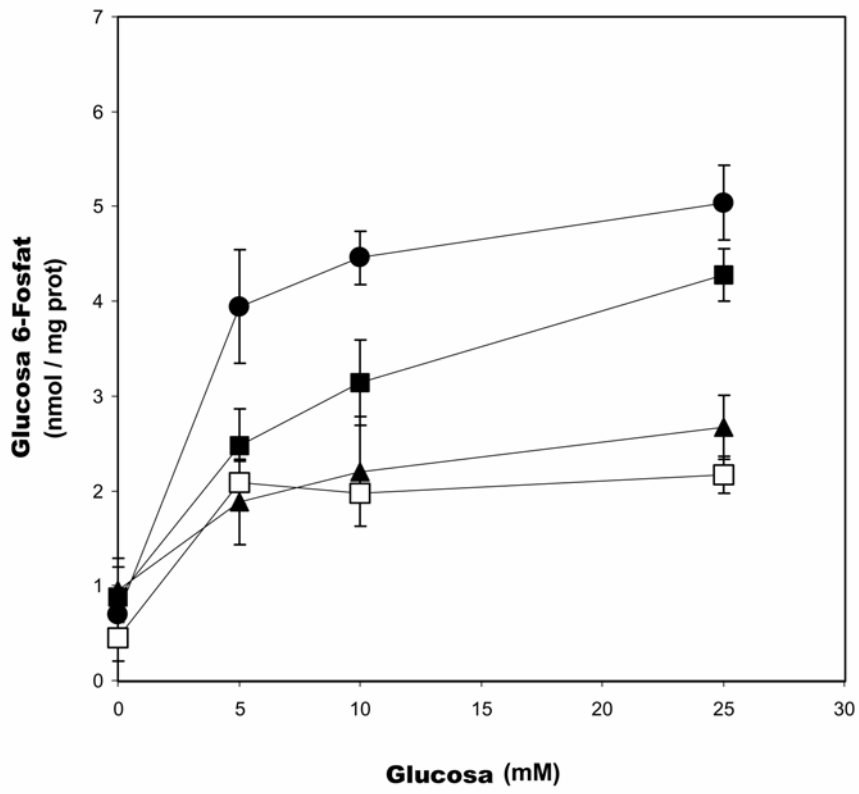


Figura 4 Efectes de la sobreexpressió de la LGS i la MGS en els nivells de Glc 6-P en cèl·lules FTO-2B.

A) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (quadrats blancs), AdCMV-LGS (quadrats negres), AdCMV-LGS més AdCMV-HK I (triangles negres) o AdCMV-LGS més AdCMV-GK (cercles negres). B) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (quadrats blancs), AdCMV-MGS (triangles negres), AdCMV-MGS més AdCMV-HK I (cercles negres) o AdCMV-MGS més AdCMV-GK (quadrats negres), i es van incubar tal i com es descriu en la llegenda de la figura 2a. Les cèl·lules es van recollir i es va mesurar la concentració de Glu 6-P intracel·lular. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis a vuit experiments independents.



B



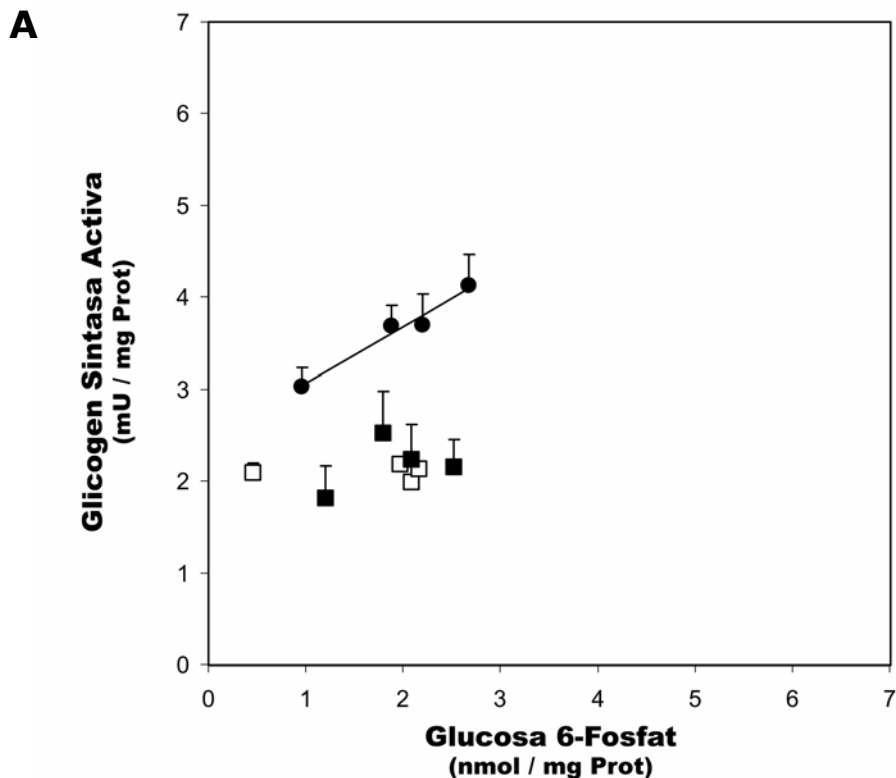
4.2.5 Impacte metabòlic de la sobreexpressió de la LGS o la MGS de manera concomitant amb la HK I o la GK.

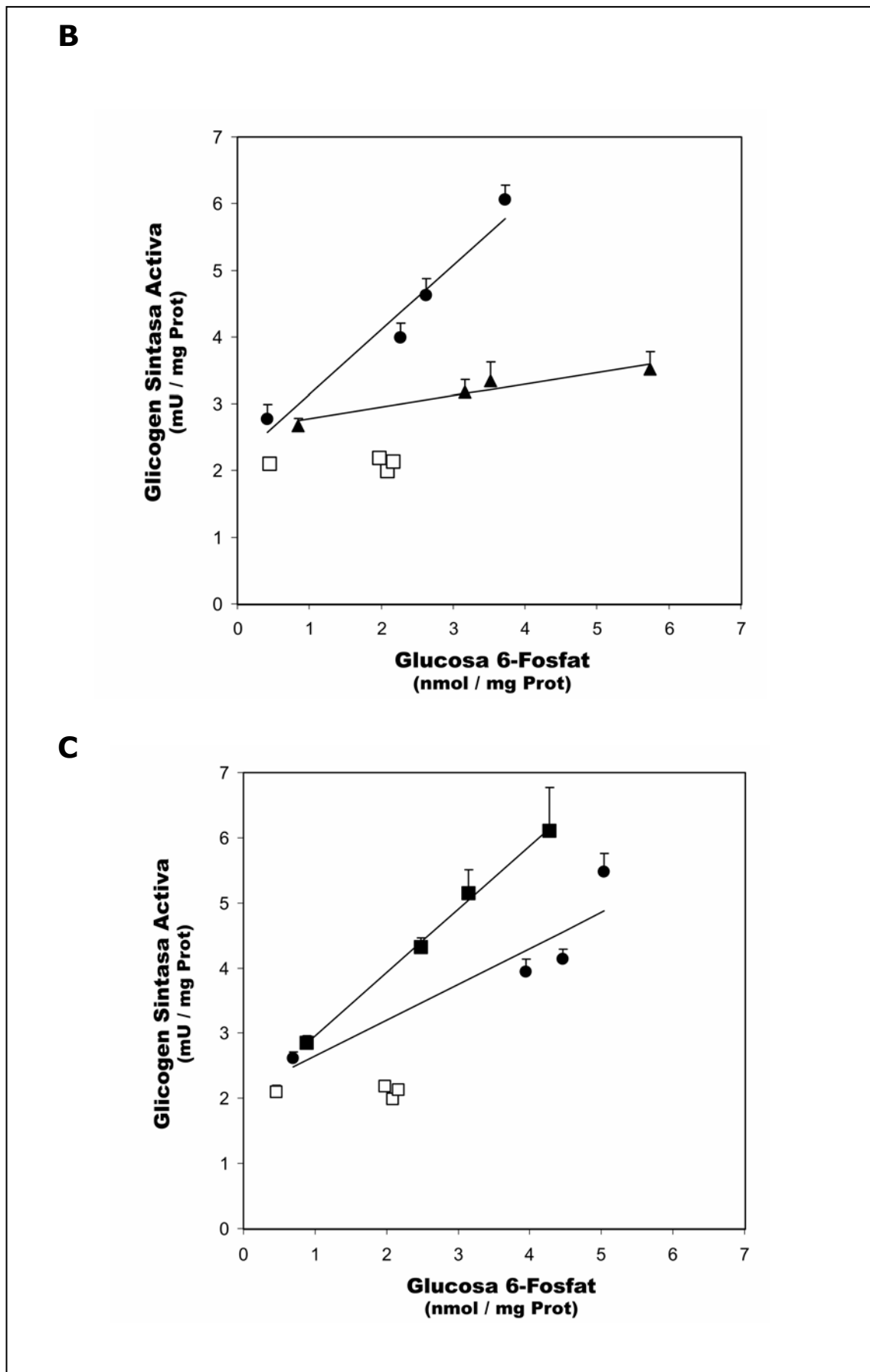
En les cèl·lules FTO-2B que sobreexpressaven la LGS més la GK, la síntesi de glicogen estava fortament potenciada (Fig. 3A) en comparació amb les cèl·lules control o aquelles que només sobreexpressaven la LGS. Per contra, quan la LGS es va sobreexpressar concomitantment amb la HK I l'acumulació de glicogen en resposta a glucosa no es va produir (Fig. 3A). A més a més, la LGS era activada de manera molt eficient per la Glu 6-P de manera dosi dependent quan hi havia present la GK, mentre que quan la font de Glu 6-P era la HK I sobreexpressada, aquesta activació no era significativament diferent respecte al control (Fig. 5B).

Quan es va coexpressar la MGS amb la GK o la HK I, la síntesi de glicogen es veia molt potenciada respecte les cèl·lules que només sobreexpressaven la MGS. En ambdós casos, l'acumulació de glicogen augmentava en resposta a glucosa (Fig. 3B) i els nivells de GS activa (Fig. 5C) s'incrementaven en funció de la concentració de Glu 6-P, amb independència de quina activitat hexoquinasa hi havia en les cèl·lules. A diferència del que succeïa amb la LGS, ambdues hexoquinases, HK I i GK, eren igual d'efectives en la mediació de l'activació de la MGS en resposta a la glucosa. Les diferències que es van observar en els nivells d'acumulació de glicogen i de GS activa, obtinguts en el cas de les cèl·lules que sobreexpressaven MGS més HK I respecte les que expressaven la MGS més la GK, es podien atribuir a l'activació simultània de la LGS endògena que probablement es donava en l'últim cas.

Figura 5 Correlació entre l'activació de la GS i la concentració intracel·lular de Glu 6-P en cèl·lules FTO-2B.

B) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (quadrats blancs), AdCMV-LGS (quadrats negres) o AdCMV-MGS (cercles negres). C) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (quadrats blancs), AdCMV-LGS més AdCMV-HK I (triangles negres) o AdCMV-LGS més AdCMV-GK (cercles negres). D) Les cèl·lules van ser tractades amb AdCMV-GFP (quadrats blancs), AdCMV-MGS més AdCMV-HK I (cercles negres) o AdCMV-MGS més AdCMV-GK (quadrats negres), i es van incubar tal i com es descriu en la llegenda de la figura 2. Les cèl·lules es van recollir i es va mesurar l'activitat GS en els homogenats. La GS activa es mesura en absència de Glu 6-P tal i com es descriu als materials i mètodes. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M per de sis a vuit experiments independents.





4.3 DISCUSSIÓ

Utilitzant anticossos específics, es va observar que les FTO-2B expressaven alts nivells de LGS però no presentaven nivells detectables de MGS. Aquestes cèl·lules no expressaven la GK, l'activitat principal fosforiladora de glucosa en hepatòcits. En canvi expressaven HK I, una activitat hexoquinasa ubiqua. Aquestes característiques, feien el sistema ideal per a estudiar la dependència de l'activació de la GS respecte de la font de Glu 6-P.

Tal com s'ha descrit prèviament, les cèl·lules FTO-2B no acumulen glicogen quan s'incuben amb glucosa, però la sobreexpressió de GK restaura aquesta capacitat (Valera *et al* 1994). Aquests autors proposaren que el gran increment en els nivells de Glu 6-P produïts per l'expressió de GK eren els únics responsables d'aquest fenomen. En el present capítol demostrem que la font d'aquest metabòlit també és clau. En el primer conjunt d'experiments mostrats, la sobreexpressió de GK ens portava a l'activació de la LGS endògena present en les FTO-2B i a la consegüent acumulació de glicogen. Per contra, la sobreexpressió de la HK I, tot i que s'assolien els mateixos nivells de Glu 6-P que en el cas anterior, aquests no tenien efecte en l'activació de la GS ni en el contingut de glicogen.

La observació que la GS endògena s'activava en resposta a concentracions creixents de glucosa quan hi havia present la GK però no quan la font de Glu 6-P era la HK I, ens indicava la presència com a mínim de dos poblacions de Glu 6-P en la cèl·lula. Una dels quals es proveïa per acció de la GK i era accessible a la LGS, mentre que la població de molècules de Glu 6-P produïdes per la HK I es localitzaven en un compartiment cel·lular del qual estava exclosa la LGS.

El segon grup d'experiments, en els quals es va sobreexpressar la LGS i la MGS, van corroborar aquesta conclusió. La sobreexpressió de la LGS no tenia cap efecte sobre els nivells de glicogen. La Glu 6-P produïda per la HK I

endògena de les cèl·lules FTO-2B no estimulava la desfosforilació i, per tant, l'activació de la LGS sobreexpressada. En canvi, la MGS exògena s'activava de manera eficient en resposta a la glucosa i les cèl·lules que sobreexpressaven la MGS sintetitzaven grans quantitats de glicogen. Aquests resultats indicaven que, a diferència de la LGS, la MGS tenia accés al compartiment de Glu 6-P produïda per la HK I.

El tercer grup d'experiments, va consistir en infeccions dobles de cadascuna de les dues isoformes de la GS combinades amb cadascun dels dos enzims fosforiladors de glucosa, va confirmar les conclusions descrites prèviament i ens va permetre afegir-ne una altra. La LGS només s'activava per glucosa quan hi havia present la GK, però la Glu 6-P, produïda tant per la GK com per la HK I, era igual d'efectiva per induir l'activació de la MGS. La sobreexpressió simultània de la LGS i la HK I no tenia cap efecte en la acumulació de glicogen, mentre que la coexpressió de la LGS i la GK portaven a una acumulació de glicogen major que no pas en les cèl·lules FTO-2B infectades només amb els virus AdCMV-GS o AdCMV-GK. Per contra l'acumulació de glicogen augmentava en les cèl·lules FTO-2B que sobreexpressaven la MGS, quan l'activitat fosforiladora de glucosa de les cèl·lules estava incrementada, independentment de sí la font de Glu 6-P era la GK o la HK I.

Resultat: Capítol 5

LA DIHIDROXIACETONA INDUEIX L'ACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA I LA SEVA TRANSLOCACIÓ VIA GLU 6-P EN HEPATÒCITS EN CULTIU.

5.1 INTRODUCCIÓ

La dihidroxiacetona (DHA) és un precursor gluconeogènic molt eficient que s'incorpora a la gluconeogènesis a nivell de les trioses fosfat (Azzout *et al* 1984, Burelle *et al* 2000). En aquest capítol es va voler estudiar les característiques del procés de síntesi de glicogen a partir de DHA i com es regulava la GS. En aquests estudis es van sobreexpressar diferents enzims, entre ells la GS, la GK i la G6Pasa, mitjançant adenovirus recombinants per estudiar la seva importància en condicions gluconeogèniques. També, es va voler estudiar el paper de la Glu 6-P en aquestes condicions.

5.2 RESULTATS

5.2.1 Efecte de la DHA en l'acumulació de glicogen.

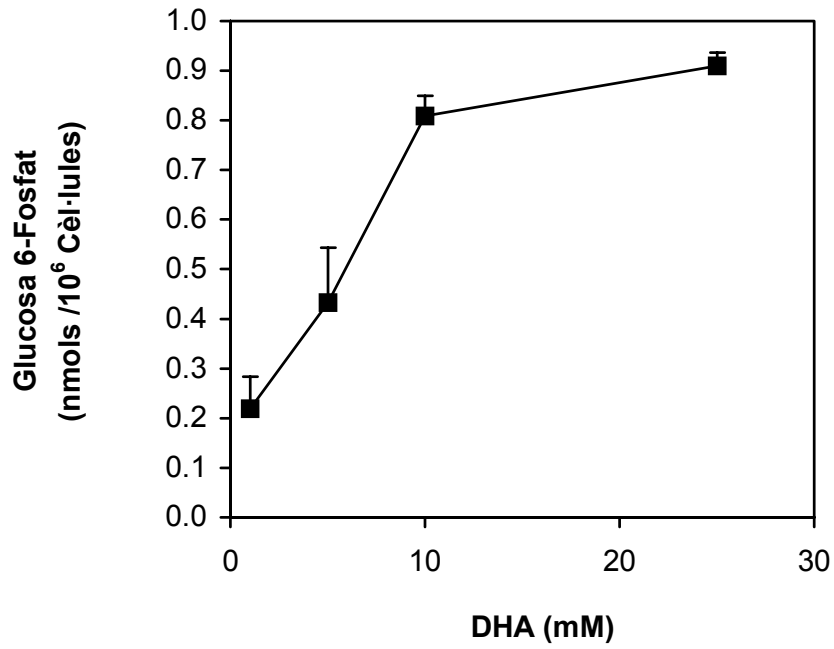
La concentració de Glu 6-P incrementava de manera dependent de la concentració fins a assolir, a l'igual que el glicogen, un *plateau* a 10 mM DHA (Fig. 1A). En aquestes condicions la concentració intracel·lular de Glu 6-P obtinguda en els hepatòcits va ser igual a l'obtinguda amb glucosa 25 mM (Fig. 4A) demostrant l'eficiència de la DHA com a substrat gluconeogènic.

Per avaluar la capacitat de síntesi de glicogen en hepatòcits incubats amb DHA es va determinar el contingut de glicogen, i la concentració de Glu 6-P en cèl·lules incubades amb dosis creixents de DHA. Es va observar que els hepatòcits en cultiu acumulaven quantitats creixents de glicogen al augmentar la dosi de DHA, fins que aquesta arribà a 10 mM. El nivell de glicogen assolit en aquestes condicions ($16 \mu\text{g} / 10^6$ cèl·lules) era inferior al que s'obté al incubar els hepatòcits amb glucosa a 25 mM ($23 \mu\text{g} / 10^6$ cèl·lules) (Fig. 4B).

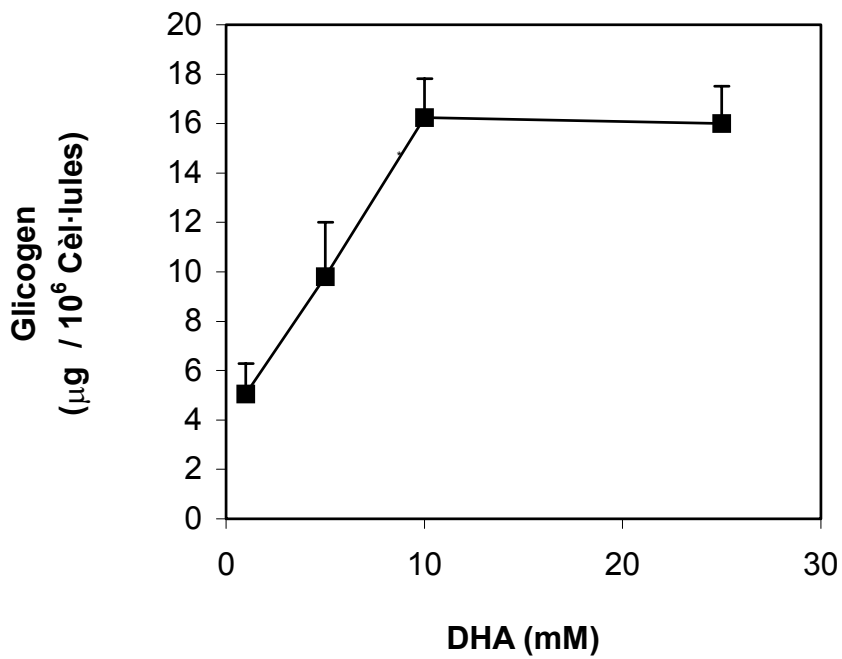
Figura 1 Variacions dels nivells de Glu 6-P i contingut de glicogen en hepatòcits incubats amb dosis creixents de DHA.

Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits es van incubar durant 2 hores amb DMEM amb DHA 1, 5, 10 i 25 mM DHA. Les cèl·lules van ser recollides i es van mesurar els nivells de Glu 6-P intracel·lulars (A), i de glicogen (B) tal i com es descriu en els materials i mètodes. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M. de quatre experiments.

A



B

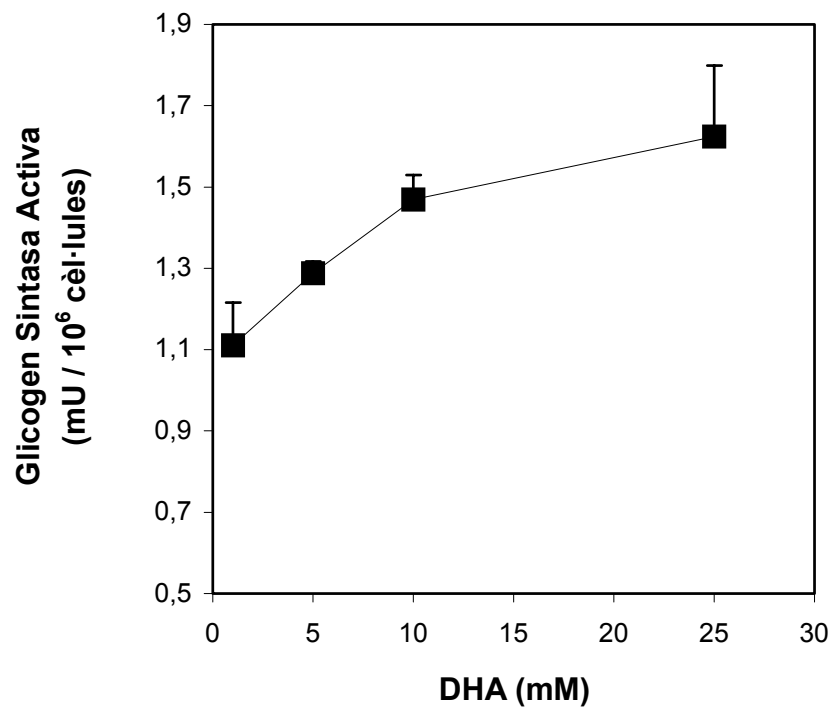


5.2.2 Efecte de la DHA sobre l'estat d'activació de la GS.

Per tal d'estudiar les diferències observades en el contingut de glicogen en hepatòcits incubats amb DHA a 10 mM o bé amb glucosa a 25mM, es va determinar l'activitat de la GS. Per una banda l'activitat total de la GS en els hepatòcits en cultiu tractats amb concentracions creixents de DHA no es va alterar. Per l'altra, els nivells de GS activa van incrementar de manera dependent de la concentració de DHA, fins a assolir uns nivells d'activació de la GS similars a 10 i 25 mM DHA (Fig. 2), tal i com succeïa per a la Glu 6-P i el glicogen. Els nivells de GS activa assolits van mostrar una relació directa amb la concentració de Glu 6-P (Fig. 6 de la conclusió).

Figura 2 Variació en l'estat d'activació de la GS en hepatòcits incubats amb diferents dosis de DHA.

Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb DMEM i DHA a 1, 5, 10 i 25 mM. Les cèl·lules van ser recollides i es va mesurar el nivell l'estat d'activació de la GS mesurades en absència de Glu 6-P tal i com es descriu en els materials i mètodes. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M. de quatre experiments.



5.2.3 Efecte de la DHA en la localització subcel·lular de la GS

En hepatòcits, la glucosa indueix la *translocació* de la GS des d'una distribució citosòlica cap a la perifèria de la cèl·lula (García-Rocha *et al* 2001). Amb l'objectiu de saber si aquest fenomen es produïa amb DHA es van incubar hepatòcits en cultiu en presència de DHA a 10 mM, glucosa a 10 mM, glucosa a 25 mM o bé en DMEM durant 2 hores. La incubació amb DHA va produir l'acumulació de l'enzim a la perifèria cel·lular, de la mateixa manera que passava amb la glucosa. Pels hepatòcits tractats amb un medi lliure de DHA o glucosa, la GS seguia distribuïda per tot el citoplasma (Fig. 3A). La incubació amb glucosa a 10 mM va ser suficient per produir un nivell de *translocació* similar al que s'aconsegueix amb una concentració de 10 mM DHA, tot i que els nivells de Glu 6-P en aquest últim cas eren més baixos. La tinció del glicogen en els hepatòcits incubats amb DHA a 10 mM va ser similar a la que es va observar quan es van incubar amb glucosa 10 mM (Fig. 3B).

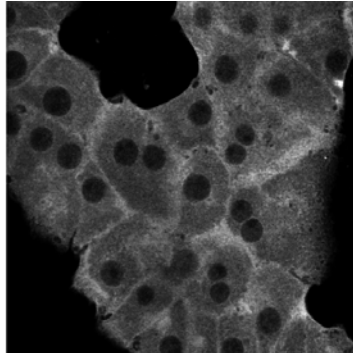
Figura 3 Canvis en la distribució subcel·lular de la GS induïts per la DHA.

Imatges de microscopia confocal d'hepatòcits en cultiu. Aquests hepatòcits han estat incubats amb glucosa o DHA durant 2 hores a les concentracions que s'indica en les figures. Al final de la incubació les cèl·lules van ser processades per analitzar-les per immunofluorescència amb l'anticòs L1 contra la GS hepàtica (A) o amb un anticòs contra la molècula de glicogen i, alhora, una tinció amb *phalloïdina* conjugada a texas red per marcar l'actina (B) tal i com s'indica en els materials i mètodes. Les cèl·lules control van ser incubades en un medi DMEM lliure de glucosa o DHA.

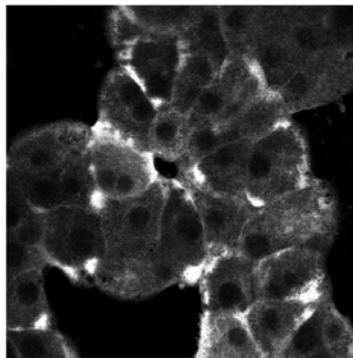
Barra d'escala = 10 μ m.

A

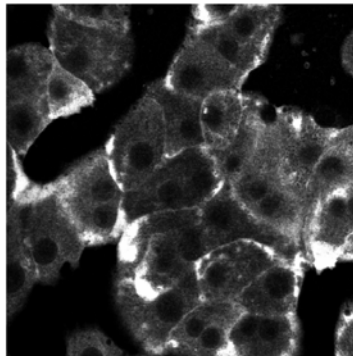
Control



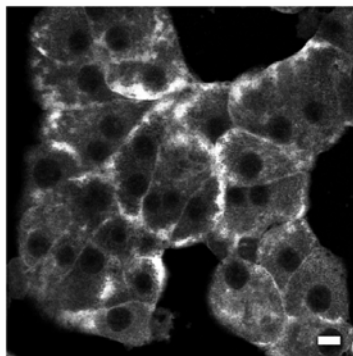
Glucosa 10mM

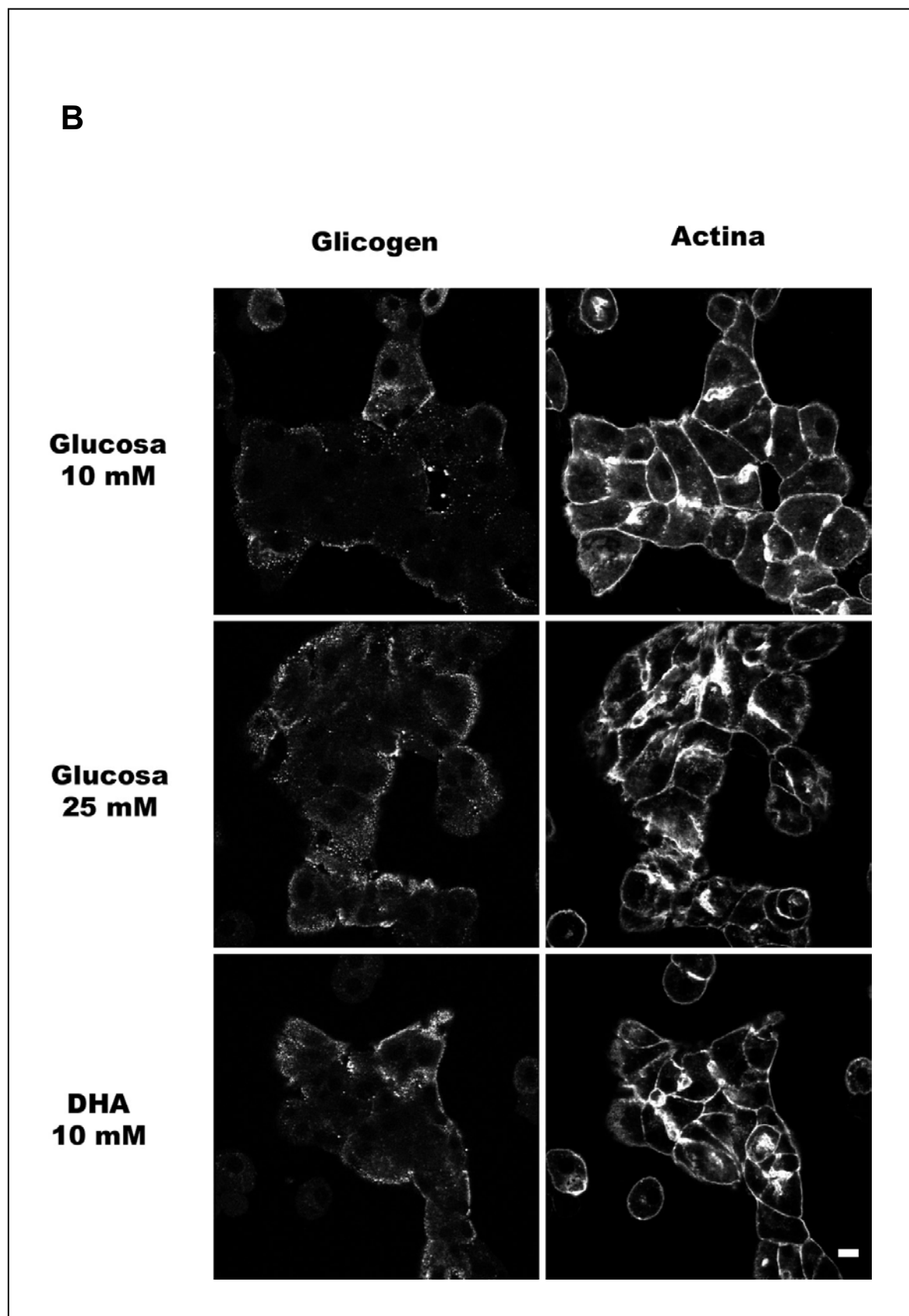


Glucosa 25mM



DHA 10mM





5.2.4 Efecte de la sobreexpressió de la GS en hepatòcits incubats amb DHA o glucosa.

Per tal d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió de la GS en hepatòcits incubats amb DHA, els nivells de GS total es van incrementar 3 vegades mitjançant l'ús d'adenovirus. La capacitat d'acumular glicogen en condicions gluconeogèniques incrementava en els hepatòcits tractats amb l'AdCMV-RLGS (Fig.4B). En absència de DHA, tant els hepatòcits tractats com els no tractats van acumular nivells molt baixos de glicogen. Després d'incubar els hepatòcits amb 10 mM DHA durant 2 hores, el contingut de glicogen a les cèl·lules tractades incrementava un 40 % respecte els hepatòcits control (Fig. 4B). Quan les cèl·lules van ser incubades amb glucosa, 5 o 25 mM, l'acumulació de glicogen va augmentar fins a un 100% comparat amb les cèl·lules no tractades, arribant a nivells de 80 $\mu\text{g}/10^6$ cèl·lules, amb glucosa a 25 mM.

L'activitat GS total en hepatòcits control era al voltant de $4,40 \pm 0,40$ mU/ 10^6 cèl·lules, i aquesta es va incrementar fins a tres vegades al fer el tractament amb l'AdCMV-RLGS (Taula 1). La incubació dels hepatòcits amb glucosa o DHA va activar la GS endògena. La GS sobreexpressada també es va activar en resposta a un increment a la concentració de glucosa o de DHA (Fig. 4C). Els nivells de GS activa que es van assolir en els hepatòcits que sobreexpressaven la GS en presència de DHA van ser el doble en comparació amb les cèl·lules no tractades (3,0 mU/ 10^6 cèl·lules).

La sobreexpressió de la GS no va provocar canvis significatius en els nivells de Glu 6-P en comparació amb els hepatòcits no infectats, amb independència del substrat amb el que es van incubar (Fig. 4A). L'increment de glicogen acumulat en cèl·lules que sobreexpressaven la GS i incubades amb DHA, va anar acompanyat d'una disminució de glucosa alliberada al medi en comparació amb els hepatòcits no tractats (Fig. 5).

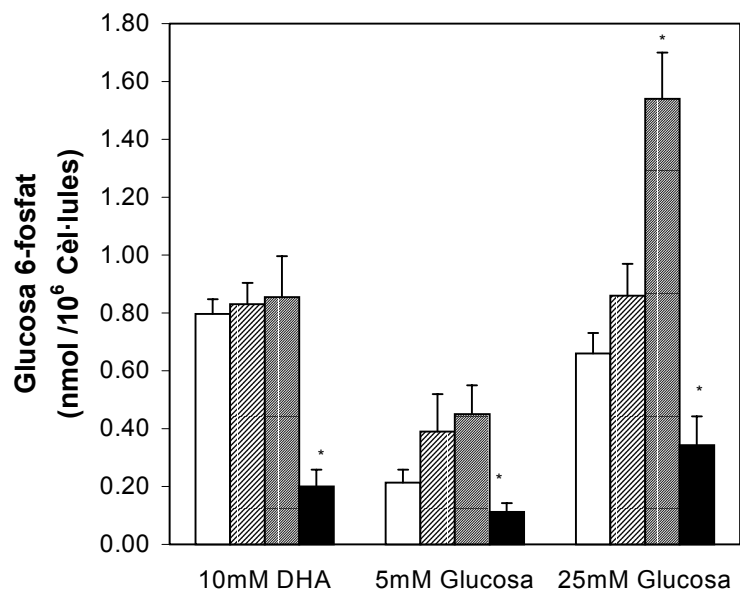
Figura 4 Efectes de la sobreexpressió de la GS, la GK i la G6Pasa sobre la concentració de Glu 6-P, el contingut de glicogen, i els nivells de GS activa en hepatòcits en cultiu.

Els hepatòcits van ser tractats amb l' AdCMV-RLGS (barres amb ratlles amples), l'AdCMV-GK (barres amb ratlles estretes), l'AdCMV-G6Pasa (barres negres), o es van deixar sense tractar (barres blanques) tal i com s'ha descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatocits van ser incubats durant 2 hores amb glucosa a 5 i 25 mM i amb DHA a 10 mM. Les cèl·lules van ser recollides i es va mesurar els nivells de Glu 6-P (A), el contingut de glicogen (B), i els nivells de GS activa, mesurats en absència de Glu 6-P (C) tal i com es descriu en els materials i mètodes. Les dades representen la mitja \pm S.E.M. de quatre experiments.

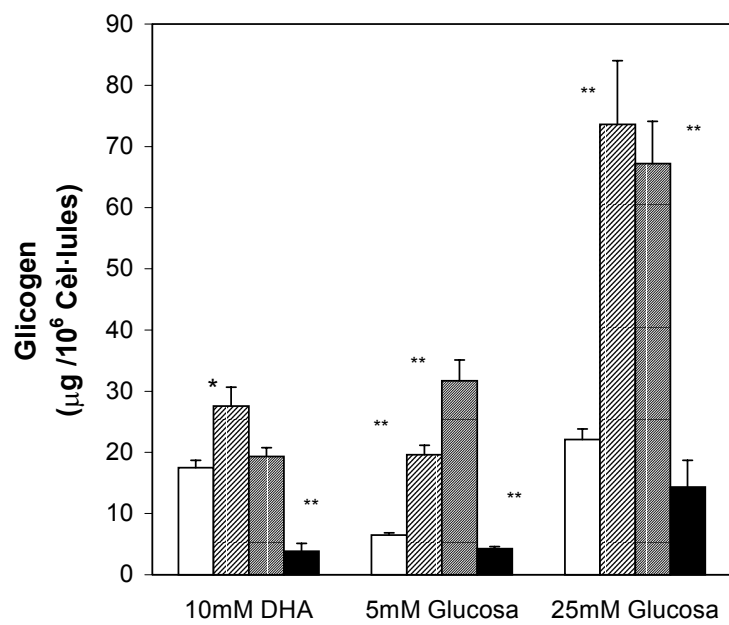
* $p < 0,05$ vs. El respectiu control no tractat.

** $p < 0,01$ vs. El respectiu control no tractat.

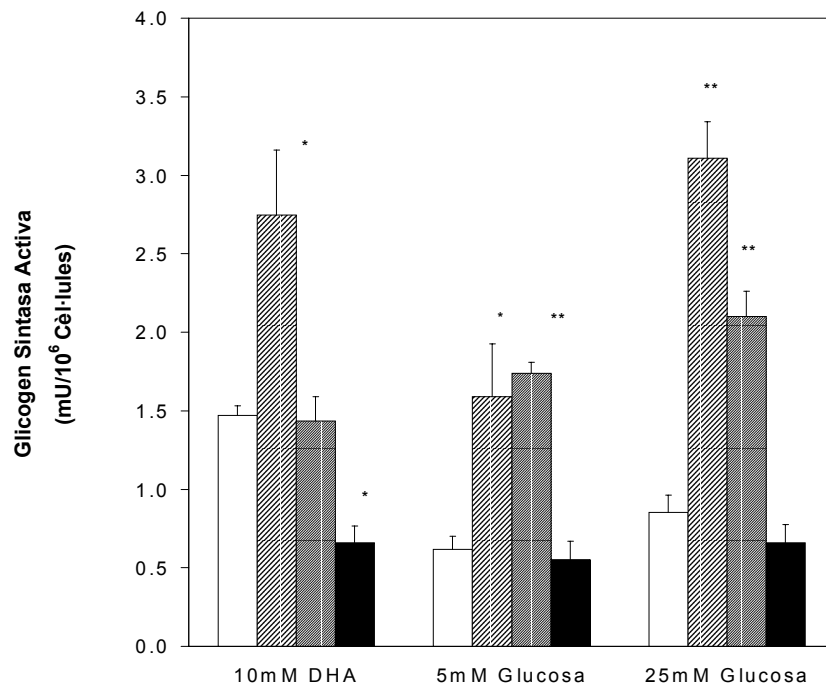
A



B



C



Taula 1 Activitat fosforiladora de glucosa, glucosa 6-fosfatasa i activitat total glicogen sintasa en hepatòcits que sobreexpressen la RLGS, la GK I la G6Pasa.

Els hepatòcits de rata van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS, AdCMV-GK o AdCMV-G6Pasa, o no tractats. Es van incubar durant 16 hores amb DMEM sense glucosa. Després, les cèl·lules van ser incubades durant 2 hores a un medi amb glucosa a 25 mM i es van recuperar per mesurar l'activitat GK i HK, i l'activitat G6Pasa o GS tal i com es descriu en els materials i mètodes. Les activitats s'expressen en mU/10⁶ cèl·lules i com a percentatge dels valors controls. Les dades representen les mitjanes ± S.E.M. de quatre experiments independents.

a, $p < 0,05$ hi ha diferències significatives respecte els hepatòcits no tractats.

	GK (mU/10 ⁶ Cèl·lules)	HK (mU/10 ⁶ Cèl·lules)	G6Pase (mU/10 ⁶ Cèl·lules)	GS + 6,6mM Glu 6-P (mU/10 ⁶ Cèl·lules)
No tractats	9,3±2,6	3,2±0,8	9,8±0,2	4,4±0,4
AdCMV-GK	27,7±4,8 ^a	4,3±0,7	10,1±0,4	4,2±0,5
AdCMV-RLGS	8,1±3,6	3,8±0,6	10,6±0,8	18,5±1,9 ^a
AdCMV-G6Pase	9,7±1,8	4,1±1,2	25,2±1,00 ^a	4,3±04

5.2.5 Efecte de la sobreexpressió de la G6Pasa en hepatòcits incubats amb glucosa o DHA.

La capacitat dels hepatòcits en cultiu d'acumular glicogen quan se sobreexpressa la G6Pasa és molt baixa (Fig. 4B). Quan els hepatòcits infectats amb l'AdCMV-G6Pasa van ser incubats amb DHA a 10 mM o glucosa a 5 mM, el contingut de glicogen va disminuir un 80 o un 35 % respecte els hepatòcits no tractats.

La sobreexpressió de la G6Pasa en hepatòcits tractats amb DHA a 10 mM va produir un increment significatiu en la producció de glucosa (Fig. 5). D'altra banda, la sobreexpressió de G6Pasa també va produir una caiguda en els nivells intracel·lulars de Glu 6-P, en totes les condicions mesurades (Fig. 4A). El tractament dels hepatòcits amb l'AdCMV-G6Pasa i la incubació amb DHA va fer que s'assolissin valors de 0,2 nmol Glu 6-P/ 10^6 cèl·lules, essent tan sols un 25 % dels obtinguts en cèl·lules no tractades. Aquesta disminució va ser més intensa del que s'observava quan les cèl·lules s'incubaven amb glucosa. Probablement, en aquest últim cas, a 25 mM glucosa l'activitat fosforiladora de glucosa augmentava (hi ha més GK lliure) i minimitzava l'efecte de la sobreexpressió de la G6Pasa al crear un cicle fútil glucosa i Glu 6-P.

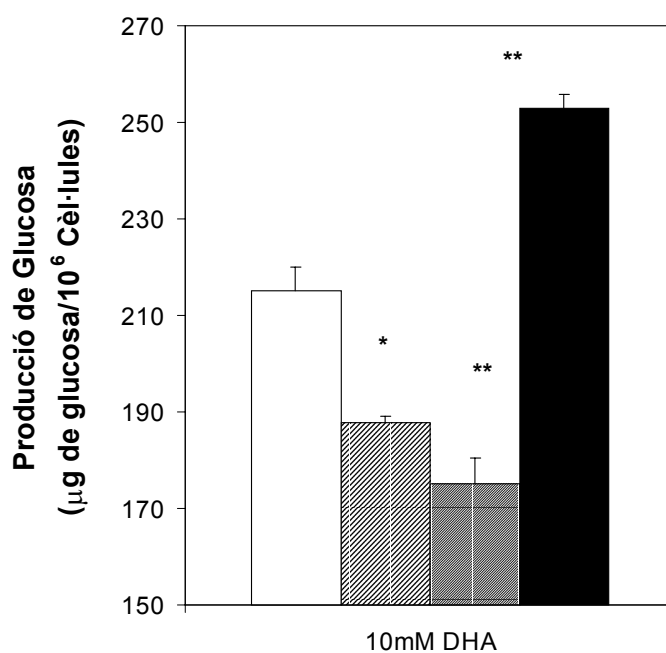
Quan es van estudiar els efectes de la sobreexpressió de la G6Pasa sobre els nivells de GS activa es va observar que només en els cas de les cèl·lules incubades amb DHA a 10 mM hi havia una disminució en els nivells dels mateixos. Els nivells de GS activa van ser, en aquest cas, un 55 % inferiors que en els hepatòcits control (0,66 vs 1,44 mU de GS activa/ 10^6 cèl·lules, respectivament)(Fig. 4C).

Figura 5 Efectes de la sobreexpressió de la GS, GK i G6Pasa sobre la producció de glucosa en hepatòcits incubats amb DHA.

Els hepatòcits van ser tractats amb l' AdCMV-RLGS (barres amb ratlles amples), l'AdCMV-GK (barres amb ratlles estretes), l'AdCMV-G6Pasa (barres negres), o es van deixar sense tractar (barres blanques) tal i com s'ha descrit en els materials i mètodes. Després de 16 hores en DMEM sense glucosa, els hepatòcits van ser incubats durant 2 hores amb DHA a 10 mM. El medi amb el què es van incubar les cèl·lules es va recollir i s'hi va mesurar la producció de glucosa. Les dades representen les mitjanes \pm S.E.M. de quatre experiments.

* $p < 0,05$ vs. El respectiu control no tractat.

** $p < 0,01$ vs. El respectiu control no tractat.



5.2.6 Efecte de la sobreexpressió de la GK en hepatòcits incubats amb DHA o glucosa.

Quan els hepatòcits van ser incubats en presència DHA a 10 mM, aquests acumulaven Glu 6-P. Era interessant estudiar si la sobreexpressió de la GK causava algun efecte sobre la síntesi de glicogen per gluconeogènesi. Els resultats van mostrar com una sobreexpressió de tres vegades els nivells de l'enzim (Taula 1) no produïa cap variació significativa en els valors de Glu 6-P (0,86 vs. 0,80 nmol/10⁶ cèl·lules, en hepatòcits tractats o no tractats amb l'AdCMV-GK en presència de DHA a 10 mM)(Fig. 4B), ni en el contingut de glicogen (19,3 vs 17,5 µg/10⁶ cèl·lules, en hepatòcits tractats o no tractats amb l'AdCMV-GK en presència de DHA a 10 mM)(Fig. 4B). Quan es va analitzar l'activitat GS en hepatòcits que sobreexpressaven GK, la GS activa va augmentar significativament en presència de glucosa de manera dosi dependent, tal i com s'ha descrit prèviament (Gomis *et al* 2000 i capítol 2). Tanmateix, quan els hepatòcits tractats amb l'AdCMV-GK van ser incubats amb DHA a 10 mM, els nivells de GS activa no van variar en comparació amb els controls (Fig. 4C). Tot i que la sobreexpressió de la GK no va alterar el contingut de glicogen en hepatòcits tractats amb DHA, sí que es va reduir l'alliberació de glucosa al medi en un 20% en comparació amb les cèl·lules control.

5.3 DISCUSSIÓ

Els resultats van mostrar com la incubació d'hepatòcits amb DHA va induir un increment en la concentració intracel·lular de Glu 6-P que era dependent de la concentració de DHA al medi. Els nivells de Glu 6-P van incrementar fins arribar a un *plateau* a la concentració de 10 mM DHA. Els nivells de Glu 6-P en cèl·lules incubades amb DHA a 10 mM van ser molt similars als que s'arribava amb incubacions amb 25 mM glucosa. L'acumulació de Glu 6-P, que es produïa en dosis creixents de DHA, va induir un increment en els nivells de GS activa de manera similar als que generava la Glu 6-P originada per fosforilació directa de la glucosa. L'acumulació de Glu 6-P i l'increment de GS activa per DHA van portar a una acumulació de glicogen. Els resultats assenyalaven que la síntesi de glicogen a partir de precursors gluconeogènics seguia un patró similar al que es produïa en presència de la glucosa. Així doncs, els resultats també van confirmar que la concentració de GS activa era el factor determinant de la síntesi de glicogen amb independència de la font de carboni utilitzada.

Emprant tècniques d'immunofluorescència i un anticòs contra la GS hepàtica i contra la partícula de glicogen, es va analitzar la localització de l'enzim i del polisacàrid en funció de l'estat metabòlic de l'hepatòcit. Es va demostrar que el glicogen sintetitzat a partir de DHA s'acumulava a la perifèria de l'hepatòcit. També es va descriure que la DHA disparava la *translocació* de la sintasa cap a la perifèria cel·lular. Així podem concloure que la síntesi de glicogen es realitzava a la perifèria amb independència del substrat utilitzat.

Quan es va sobreexpressar la GS en hepatòcits en cultiu en presència de DHA, s'observà un increment en l'acumulació de glicogen comparat amb els hepatòcits control. La Glu 6-P produïda per la DHA, activava la GS sobreexpressada i feia que les cèl·lules sintetitzessin més glicogen que els hepatòcits control. Aquest efecte positiu en la síntesi de glicogen exercit per l'increment en la concentració de GS activa van reforçar la idea que els nivells

de GS activa eren determinants per a la síntesi de glicogen a partir de precursors gluconeogènics.

Volíem estudiar la dependència que existia entre la síntesi de glicogen i la concentració intracel·lular de Glu 6-P. A tal fi, es va fer una gràfica de correlació entre els valors d'aquests paràmetres en les diferents condicions analitzades (Fig. 6). Queda clar que amb independència dels substrats utilitzats, hi ha una correlació entre el contingut de glicogen i els nivells de Glu 6-P en hepatòcits. Ara bé el pendent de la recta depèn del substrat utilitzat. El pendent més alt correspon a l'ús de glucosa com a substrat, tal i com es pot veure en la Fig. 6. Aquests resultats mostren que la glucosa és un substrat molt més eficient que la DHA per induir l'acumulació de glicogen.

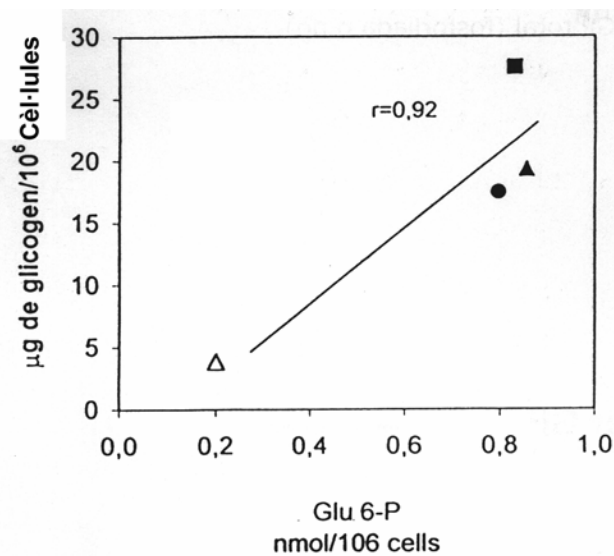
Una possible explicació d'aquestes diferències recau en el fet que la degradació de glicogen sigui diferent en les dues condicions. De fet, la glucosa actua com a potent inhibidor de la GP hepàtica (Massillon *et al* 1995 i Groen *et al* 1986). De tal manera, que el cicle fútil que s'estableix entre la GS i la GP durant el procés de síntesi de glicogen està reduït. Això permet que la GS activa sintetitzi molt més glicogen en presència de glucosa. Per a confirmar aquesta hipòtesis, vàrem estudiar els nivells de GP activa en hepatòcits en presència de glucosa o DHA. Per això vàrem utilitzar un anticòs que reconeix la forma fosforilada (Ser¹⁴) de la glicogen fosforilasa de fetge. Els resultats demostren que els nivells de GP activa eren més alts en els hepatòcits en cultiu incubats amb 10 mM DHA que en 5 o 25 mM Glucosa (Fig. 7).

Per altra banda, la sobreexpressió de la GK va produir un important increment en el contingut de glicogen quan s'utilitzava la glucosa com a substrat. En canvi, els resultats suggerien que en condicions gluconeogèniques, un increment de l'activitat GK no conduïa a un increment de la síntesi de glicogen, sinó que probablement es traduïa en un increment en el flux glucolític i per tant en una disminució en els nivells de glucosa alliberats al medi.

Figura 6 Relació entre els nivells de Glu 6-P i el contingut de glicogen.

Relació entre els valors de Glu 6-P i glicogen de la Fig. 4 del capítol 5. Hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-RLGS (■), l'AdCMV-GK (▲), l'AdCMV-G6Pase (△), o sense tractar(●). La gràfica A ens mostra els valors obtinguts quan es va incubar els hepatòcits amb DHA, el pendent de la corba de regressió és 30,0 unitats arbitràries. La gràfica B mostra els valors del hepatòcits incubats amb glucosa, el valor del pendent en aquest cas és 44,2 en unitats arbitràries. Els coeficients de regressió es troben indicats en els gràfics.

A



B

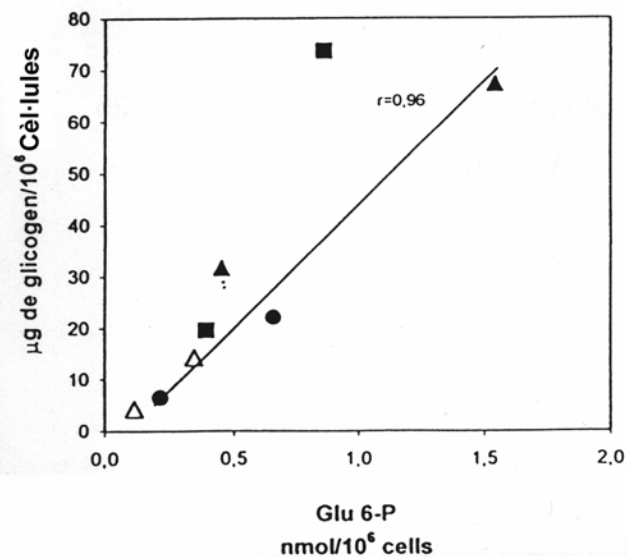
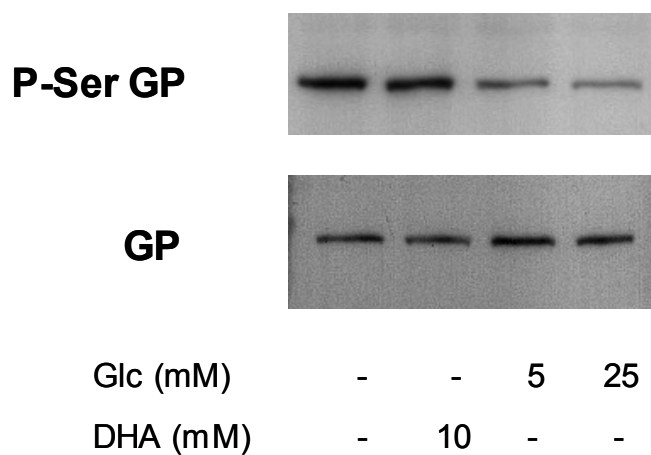


Figura 7 Anàlisi per *Western blot* dels nivells de GP hepàtica totals i GP fosforilada.

La imatge superior mostra un experiment representatiu d'assaig dels nivells de GP fosforilada en hepatòcits en cultiu incubats durant dues hores amb DMEM sense glucosa, o bé amb 5 mM glucosa, o bé 25 mM glucosa, o bé 10 mM DHA. Els assajos per *Western blot* es van fer en homogenats d'hepatòcits tal i com es descriu en els materials i mètodes. La imatge inferior mostra un *Western blot* representatiu per la GP total (fosforilada o no).



La Glu 6-P produïda per gluconeogènesi pot ser repartida entre la producció de glucosa o la síntesi de glicogen. Es va veure que quan es sobreexpressava la G6Pasa en hepatòcits, en presència de DHA, la síntesi de glicogen disminuïa a favor d'un increment de la producció de glucosa. Aquesta disminució era una conseqüència de la disminució en els nivells de GS activa. Els resultats suggerien que la Glu 6-P procedent de la DHA era responsable, indirectament a través de la regulació de la GS activa, del nivell de síntesi de glicogen. Per tant en aquest cas el pas determinant de la síntesi de glicogen requeria en la GS.

Discussió General:

La GS s'ha considerat l'enzim clau en la síntesi de glicogen (Leloir i Cardini 1957). En aquest estudi s'ha aprofundit en dos conceptes, d'una banda s'ha estudiat de forma quantitativa el control de la síntesi de glicogen en hepatòcits i de l'altra el mecanisme d'activació de la GS per glucosa. L'eina principal que s'ha utilitzat en aquests estudis per sobreexpressar diferents proteïnes han estat els adenovirus recombinants.

Generalment s'accepta que la GS és l'enzim limitant de la síntesi de glicogen a partir de glucosa en hepatòcits encara que, també s'ha demostrat que la sobreexpressió de GK facilita l'acumulació de glicogen en hepatòcits tant de rates sanes com de rates diabètiques (O'Doherty *et al* 1996 i Seoane *et al* 1999). Els resultats presentats en aquesta tesi mostren que tant la GK com la GS estan implicades en el control de la biosíntesi de glicogen en hepatòcits, de tal manera que la GK controla l'estat d'activació de la GS via els nivells de Glu 6-P. El mecanisme de control es pot explicar de la següent manera: l'activació covalent de la sintasa és produïda per la desfosforilació de l'enzim; aquesta desfosforilació que està catalitzada per fosfatases es troba potenciada per la Glu 6-P. S'accepta que aquest metabòlit s'uneix a la GS provocant un canvi conformacional que l'activa i, alhora, el fa un millor substrat per les fosfatases (Villar-Palasi i Guinovart 1997 i Guinovart *et al* 1997). Els resultats presentats en aquest estudi reforcen i completen tots aquells resultats previs del nostre grup que suggerien l'efecte senyalitzador de la Glu 6-P en l'activació de la GS i conseqüent inducció de la síntesi de glicogen. Concretament, confirmen que la glucosa ha de ser fosforilada per tal d'induir l'activació de la GS (Carabaza *et al* 1992) i que la síntesi de glicogen estimulada per glucosa requereix de l'activació de la GS induïda per Glu 6-P (Villar-Palasi i Guinovart 1997 i Cadefau *et al* 1997).

Podem concloure que l'acumulació hepàtica de glicogen a partir de glucosa està sotmesa a un sistema de control en el qual el controlador, GS, és alhora

controlat per la GK. Aquest sistema és diferent de les cascades de fosforilació, en el qual l'enzim controla directament l'activitat del que el succeeix en la sèrie. En el nostre sistema, el control de manera indirecta l'exerceixen els nivells de Glu 6-P, que engeguen la desfosforilació de la GS, i per tant l'activen. Per això considerem la Glu 6-P tant un precursor com una molècula de senyalització que dirigeix la incorporació de glucosa a glicogen.

Els nivells de Glu 6-P, en hepatòcits, poden augmentar-se o disminuir-se mitjançant la sobreexpressió de la GK o la G6Pasa, respectivament (O'Doherty *et al* 1996 i Seoane *et al* 1997). S'ha observat que quan se sobreexpressa la GK en hepatòcits, tant la síntesi de glicogen com el flux glucolític estan altament estimulats. En canvi, quan se sobreexpressa la GS hi ha un increment en el flux de síntesi de glicogen però no augmenta la glucòlisi. La GK no es troba inhibida pel seu producte Glu 6-P (Càrdenas 1995), i per tant el flux a través seu només depèn de la concentració de glucosa i no de la demanda de Glu 6-P.

Els metabòlits intermediaris entre la GK i la GS, com és ara la Glu 6-P i l'UDP-Glc, no baixen significativament quan se sobreexpressa la GS. Una possibilitat que explicaria per què no hi ha una disminució en els nivells de Glu 6-P seria que aquests estan tamponats per la G6Pasa (Aiston *et al* 1999). Segons aquesta hipòtesi, quan sobreexpressem la GS, l'increment del flux en la síntesi de glicogen podria ser compensat per una disminució del flux a través de l'enzim G6Pasa.

L'increment del flux a través de la GK, quan se sobreexpressen la GK i la GS alhora, podria ser que estigués acoblat, per efecte del *chanelling* o canalització, a un increment en el flux a través de la GS. D'aquesta manera es podria explicar per què la Glu 6-P no s'acumula en aquestes circumstàncies. L'existència d'un fenomen de canalització o *chanelling* de la Glu 6-P ha estat utilitzat anteriorment per explicar altres observacions. Canvis en el flux a través de la GS en absència de canvis en els nivells de Glu 6-P han estat

prèviament descrits en hepatòcits incubats en presència de glutamina (Lavoinne *et al* 1987).

A més a més, els nivells mesurables de Glu 6-P són els mateixos en hepatòcits que sobreexpressen la GS com en hepatòcits que sobreexpressen la GS i la GK alhora. Encara que en aquest últim cas el contingut de glicogen i, el més sorprenent, els nivells de GS activa són més alts. Aquest fet es podria explicar si existís un fenomen de compartimentalització, així la concentració local de Glu 6-P que percep la GS podria ser més alta en les cèl·lules que simultàniament sobreexpressen ambdós enzims. Hi ha evidències a la literatura especialitzada que també suggereixen una compartimentalització de l'UDP-Glu (Gustafson *et al* 1997).

La compartimentalització i/o canalització de la Glu 6-P és un fenomen que s'ha discutit àmpliament. La canalització és un concepte relacionat amb el flux a través de les vies mentre que la compartimentalització implica diferents reservoris. Molts estudis mostren com durant la incubació amb glucosa o substrats gluconeogènics marcats, la radioactivitat específica de la Glu 6-P incrementa en uns nivells diferents dels d'altres intermediaris de la glucòlisi o la síntesi de glicogen. Aquests resultats es poden interpretar com a conseqüència de diferents reservoris de Glu 6-P o per canalització o *chanelling* de les vies (Agius *et al* 2002). Tanmateix no podem descartar que es produeixin els dos fenòmens al mateix temps: canalització en el flux de la via de síntesi de glicogen i compartimentalització en l'activació de la GS.

Els experiments de sobreexpressió de la GS ens han permès de reflexionar sobre el següent punt: 1) els mecanismes de control fan que l'hepatòcit procuri mantenir constant la relació d'activitats de la GS. O, 2) alternativament, la cèl·lula està programada per mantenir constants els nivells de GS activa. En les condicions habituals en que els nivells de GS totals no varien en un mateix experiment les dues possibilitats són equivalents. La problemàtica apareix quan en un mateix experiment els nivells de GS total varien. El resultat experimental ens permet observar una situació intermèdia

on es produeix un progressiu descens en la relació d'activitats (forma activa vs total) associat a la sobreexpressió de la GS en unes determinades condicions metabòliques.

Si acceptem la primera hipòtesi, els resultats obtinguts es podien explicar per una limitació de les quinases per fosforilar tota la GS i mantenir els nivells de GS activa constants al tenir diferents concentracions de GS total. Tanmateix no tenim evidències que recolzin aquest punt. Si acceptem la segona, un possible mecanisme per explicar aquesta disminució en la relació d'activitats seria per saturació de la maquinària que causa l'activació per desfosforilació de la GS. Estudis recents de Newgard *et al* (2000) demostren que la sobreexpressió de la PTG o la G_L (subunitats reguladores de la proteïna fosfatasa PP-1) en hepatòcits causa un gran increment tant en l'estat d'activació de la GS com en la síntesi de glicogen (Berman *et al* 1998, Gasa *et al* 2000 i O'Doherty *et al* 2000). Això indica que els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes associades a glicogen són un factor limitant per a la desfosforilació de la GS. Per això una explicació pel descens en la relació d'activitats amb la sobreexpressió de la GS és la saturació de l'activitat de les proteïnes associades al glicogen (G_L i PTG) i no de l'activitat de la subunitat catalítica de la fosfatasa (Newgard *et al* 2000). La PTG té un lloc d'unió a la regió C-terminal a la GS, la GP i la fosforilasa quinasa (Printen *et al* 1997). La unió d'aquests enzims és mútuament excloent. També, s'ha suggerit que la unió d'aquests enzims a la PTG pot estar regulat hormonalment (Fong *et al* 2000).

El fet és que les nostres observacions experimentals indiquen que s'assoleix un estat intermedi. Aquest, possiblement, representa el nou punt d'equilibri adaptat a les noves condicions induïdes per la sobreexpressió de la GS. S'ha observat que hi ha un increment en els nivells de GP-a quan s'augmenten molt els nivells de GS. Això suggereix que probablement la cèl·lula estableix un nou equilibri entre les formes actives dels enzims de síntesi i de degradació del glicogen.

Una conclusió pràctica és que només es pot utilitzar la relació d'activitats de la GS com a indicatiu de canvis en la capacitat de la cèl·lula de sintetitzar glicogen quan els nivells de GS total són constants. Quan s'incrementen els nivells de GS total, com en les cèl·lules infectades amb l'adenovirus AdCMV-RLGS, una relació d'activitats GS baixa pot correspondre a uns nivells alts de forma activa de GS. Per això la comparació entre relacions d'activitats entre les cèl·lules que contenen diferent quantitat d'activitat GS total pot portar-nos a equívocs.

Un dels principals objectius que es va plantejar en aquesta tesi va ser quantificar el control de la GS en la síntesi de glicogen determinant el coeficient de control de l'enzim. Estudis previs han demostrat que tant la GK com la GP tenen un coeficient de control molt alt, i de signe contrari, per a la síntesi de glicogen en hepatòcits (de la Iglesia *et al* 2000 i Aiston *et al* 2001). Això contrasta amb la G6Pasa la qual té un coeficient de control sobre la síntesi de glicogen negatiu però menor en comparació amb els anteriors (Aiston *et al* 1999). El càlcul del coeficient de control de la GS ens permet observar un comportament diferent a alta i a baixa glucosa (25 i 7,5 mM glucosa). Independentment de la concentració de glucosa, el coeficient és positiu i molt alt, tot i que, és més gran en aquelles situacions on hi ha elevats nivells de GK lliure, és a dir, a concentracions de glucosa 25 mM o de glucosa 7,5 mM i sorbitol, un monosacàrid que promou la sortida de la GK del nucli (Mukthar *et al* 1999). El control exercit per la GK és també dependent de la concentració de glucosa i és més alt a baixes concentracions del sucre (4,1 a 5 mM glucosa vs 2,8 a 10 mM glucosa)(Agius *et al* 1996). Aquest en part està compensat pel coeficient de control de la GKRP (-1,2)(de la Iglesia *et al* 2000). Això es pot explicar com a conseqüència de la compartimentalització subcel·lular de la GK. L'enzim és segrestat al nucli quan hi ha baixa glucosa i transloca al citoplasma en resposta a un increment en la dosi de glucosa o a baixes concentracions de precursors de la fructosa 1-P.

En conjunt podem dir que en condicions de glucosa 25 mM o de glucosa 7,5 mM i sorbitol, el control de la síntesi de glicogen a partir de glucosa rau

majoritàriament en la GS i la GK té un paper més secundari. En canvi, a concentracions de glucosa de 7,5 mM o inferiors, la GS presenta un coeficient de control menor. En aquestes condicions metabòliques la GK es troba altament regulada per la unió a la GKRP en el nucli, i això fa que es produeixi un canvi en el control de la síntesi de glicogen a partir de glucosa disminuint el paper de la GS i augmentant el de la GK. La quantificació del control exercit per la GK i la GS ens permet concloure que aquesta parella d'enzims comparteixen el control de la síntesi de glicogen repartint-se el rol principal en funció de l'estat metabòlic de la cèl·lula. Així, confereixen una elevada sensibilitat al sistema en totes les possibles circumstàncies.

En aquesta tesi també s'ha aprofundit en el mecanisme d'activació de la LGS per glucosa. Per aprofundir en l'estudi d'aquest mecanisme s'han utilitzat les cèl·lules FTO-2B aprofitant que no expressen la GK. Fins aquest moment, s'acceptava que la glucosa quan era fosforilada per la GK estimulava l'activació de la GS millor que si era fosforilada per la HK I. En aquestes cèl·lules s'ha demostrat de manera definitiva que la glucosa s'ha de fosforilar per a activar la GS i que, a més a més, la GK és absolutament imprescindible per a tal fi.

La LGS endògena s'activa en resposta a concentracions creixents de glucosa quan la GK hi ha estat expressada però no quan la font de Glu 6-P és la HK I endògena o HK I sobreexpressada. Això suggereix la presència de com a mínim dues poblacions de Glu 6-P en la cèl·lula. Una d'aquestes poblacions prové de l'acció de la GK i és accessible a la LGS, mentre que la població de molècules de Glu 6-P produïdes per la HK I es localitzen en un compartiment cel·lular del qual està exclosa la LGS.

Sobre la base de la diferent efectivitat per induir l'activació de la LGS per la Glu 6-P produïda per la GK o la HK I, s'ha especulat una possible *canalització* entre el sucre fosforilat procedent de la GK i la GS. Tanmateix, i a partir de les dades presentades en aquesta tesi la hipòtesi més plausible és la compartimentalització de la Glu 6-P. La GK allibera el seu producte en un compartiment cel·lular, que és accessible a varis enzims que utilitzen la Glu 6-

P, mentre que en el compartiment on es troba la Glu 6-P produïda per la HK I hi ha un accés més restringit. La sobreexpressió de GK també estimula una altra de les rutes alternatives de la Glu 6-P, la glucòlisi (Valera *et al* 1994). En hepatòcits en cultiu (Seoane *et al* 1996) i en cèl·lules en cultiu de múscul humà (Baqué *et al* 1998), la sobreexpressió de GK potencia ambdós processos, la glucòlisi i l'acumulació de glicogen. Per contra, la LGS no és capaç de respondre a la Glu 6-P produïda per la HK I i per això no s'activa, encara que les concentracions d'aquest metabòlit estiguin molt incrementades.

Els resultats presentats en el capítol 4 demostren que la sobreexpressió de la GK en les cèl·lules FTO-2B estimula l'acumulació de glicogen, independentment de quina isoforma de GS hi hagi present. En aquestes s'ha observat que la LGS, però no la MGS, diferencia entre la Glu 6-P produïda per la GK o per la HK I. La MGS és capaç de percebre el producte de la HK I i a diferència de la LGS pot ser activada per aquest i sintetitzar glicogen. Ambdues isoformes de GS depenen dels nivells de Glu 6-P per a la seva activació. Ara bé, la isoforma hepàtica presenta especificitat per l'origen d'aquest metabòlit a diferència de la isoforma muscular, cosa que reforça les diferències en els mecanismes de la síntesi del glicogen en el fetge i el múscul.

Els diferents enzims sobreexpressats en aquest estudi canvien la seva localització subcel·lular en resposta a glucosa. En absència del monosacàrid, la glucoquinasa es localitza al nucli dels hepatòcits i es mou cap al citosol quan incrementen els nivells de glucosa (de la Iglesia *et al* 1999 i Mukhtar *et al* 1999). La MGS també es concentra al nucli a baixes concentracions de glucosa i *transloca* al citosol, on adopta un patró particulat, a altes concentracions de glucosa (Ferrer *et al* 1997 i Cid *et al* 2000). Per contra, la LGS presenta una distribució citosòlica en absència de glucosa i es concentra a la perifèria de l'hepatòcit quan la concentració d'hexoses incrementa (García-Rocha *et al* 2001). Finalment, la HK I s'ha demostrat que s'uneix reversiblement a la membrana mitocondrial externa a través d'una seqüència N-terminal hidrofòbica (Polakis *et al* 1985). Aquesta associació, que en part està controlada pels nivells intracel·lulars de Glu 6-P, juga un paper en la regulació

de l'activitat de la HK I *in vivo*. Baixos nivells de Glu 6-P afavoreixen l'associació amb els mitocondris i estimulen l'activitat HK I, mentre que alts nivells del metabòlit tenen l'efecte oposat (Wilson, 1995). Aquests mecanismes de localització cel·lular poden intervenir també de manera decisiva en el control de la síntesi del glicogen.

La HK I, que representa més d'un 75% de l'activitat hexoquinasa total present en el múscul esquelètic (Wilson, 1998), i la MGS es troben respectivament al principi i al final de la via de síntesi de glicogen en el múscul. Per tant, la capacitat del primer d'actuar com a mitjancer en l'activació induïda per glucosa del segon té un sentit fisiològic clar. L'alta afinitat de la HK I per la glucosa implica que aquest monosacàrid sigui ràpidament convertit en Glu 6-P quan entra a la cèl·lula. Per això, la parella HK I i MGS és sensible a baixes concentracions de glucosa presents en la cèl·lula muscular. Estudis fets en animals transgènics que sobreexpressen la GS de múscul de conill demostren que, en fibres musculars, el control de la síntesis de glicogen està compartit entre el transport de glucosa (GLUT-4) i la GS (Azpiazu *et al* 2000 i Manchester *et al* 1996). En aquests estudis, els autors mostren com la sobreexpressió de la GS de múscul produeix un increment en el contingut de glicogen en varis tipus de fibres musculars. Ara bé, els nivells de UDP-Glu baixen considerablement com a resultat d'aquest increment en l'activitat GS i del transport limitat de glucosa, impeding així l'acumulació de grans quantitats de glicogen. Aquestes observacions indiquen que el control de la acumulació de glicogen en el múscul no recau en la capacitat fosforiladora de glucosa i en canvi si que ho fa en l'import de glucosa estimulat per insulina via el GLUT-4 i en la MGS (Azpiazu *et al* 2000).

En canvi, la situació en el fetge és bastant diferent. En els hepatòcits en cultiu el transport de glucosa a través de la membrana plasmàtica el realitza el GLUT-2, un transportador de gran capacitat (Thorens *et al* 1990 i Bell *et al* 1993). Degut a les propietats cinètiques d'aquest transportador, el GLUT-2 essencialment manté en equilibri la concentració de glucosa entre els espais intra- i extra- cel·lulars. Per això, en el fetge, el transport de glucosa no és

una etapa determinant. Tot i que la GK representa la principal activitat fosforiladora de glucosa de l'hepatòcit, la HK I també s'hi troba en quantitats considerables (Càrdenas *et al* 1998). Quan els nivells de glucosa en sang són baixos (per sota 5 mM) no hi ha flux a través de la GK. Això és degut a la seva alta $S_{0,5}$ per glucosa (Càrdenas *et al* 1998) i a l'acció de la seva proteïna reguladora, la qual encara disminueix més la afinitat aparent de la GK per glucosa en l'hepatòcit (Bontemps *et al* 1974 i de la Iglesia *et al* 2000). Per això, en aquestes condicions de baixa glucosa només la HK I pot fosforilar-la i per tant la Glu 6-P produïda no es pot dirigir cap a la síntesi de glicogen, ja que aquest metabòlit no és capaç d'activar la LGS. Només quan la concentració de glucosa en sang augmenta per sobre un determinat llindar, la GK *transloca* al citosol i comença a produir Glu 6-P. Aquesta actua com a senyal que dispara la síntesi hepàtica de glicogen. En aquest cas el control de la síntesi de glicogen no recau sobre el transport de glucosa sinó en la GK i en la LGS com s'ha descrit en aquesta tesi. Sembla que la incapacitat de la Glu 6-P produïda per la HK I per estimular l'activació de la LGS és una de les vies que té l'hepatòcit per assegurar-se que la síntesi de glicogen hepàtic només es produeixi quan es necessita, és a dir, quan els nivells de glucosa en sang són alts.

La síntesi de glicogen a partir de precursors gluconeogènics juga un paper molt important en l'homeostasi de glucosa en períodes de dejú i en la diabetis. Sabem que els precursors de la gluconeogènesis provoquen un augment en el contingut de glicogen (van Dijk *et al* 2001). Tanmateix es coneix poc el mecanisme pel qual aquest es produeix i el paper que juga la GS en aquest procés. En aquesta tesi, s'ha estudiat la regulació de la síntesi de glicogen a partir de DHA, i s'ha avaluat la capacitat d'aquest substrat per activar i mobilitzar la maquinària de síntesi del glicogen.

La DHA, com la glucosa, dispara un canvi en la localització subcel·lular de la GS, des d'una distribució citosòlica cap a la perifèria de l'hepatòcit, formant agregats al cap de dues hores d'incubació. El glicogen en presència de DHA també es sintetitza a la perifèria cel·lular. Un comportament molt similar al

que s'observa en presència de glucosa (García-Rocha *et al* 2001). Aquests resultats descarten la glucosa com element senyalitzador en aquest procés de localització subcel·lular de la GS. A més a més, els resultats que hem obtingut indiquen que la Glu 6-P procedent de gluconeogènesi no només fa *translocar* la GS sinó que també l'activa.

Resumint, en aquest estudi es mostra clarament que en hepatòcits la Glu 6-P produïda per la HK I no pot ser dirigida cap al glicogen ja que no pot activar la GS de fetge (Gomis *et al* 2002). Aquesta evidència sembla indicar que la GK és l'element que facilita que l'hexosa fosforilada activi la LGS i serveixi per a la síntesi de glicogen en hepatòcits. A més, l'activació de la GS per part de la Glu 6-P de la gluconeogènesi, tal i com s'ha demostrat en els estudis presentats, reforça la idea que la GK no és la única, ni imprescindible per a la funcionalitat de la GS hepàtica, sinó que la HK I n'és l'excepció.

Tots aquests resultats i aquells descrits a la bibliografia amb anterioritat, ens permeten concloure: primer, que la síntesi de glicogen succeeix a la perifèria de l'hepatòcit, i és funció de l'activació de la GS via Glu 6-P. En la perifèria cel·lular és on es probablement es donen les condicions òptimes, com l'accés a substrats, per a la síntesi de glicogen.

Segon, que la font utilitzada per sintetitzar la Glu 6-P es determinant per activar la GS. En el cas que s'utilitza un precursor gluconeogènic per sintetitzar glicogen, la G6Pasa juga un paper clau al decidir en quina direcció (producció de glucosa o síntesi de glicogen) s'utilitzarà la Glu 6-P. En aquest sentit, recentment s'ha descrit que *in vivo* la inhibició de la Glu 6-P translocasa porta a una utilització de la Glu 6-P produïda per gluconeogènesi cap a la síntesi de glicogen (van Dijk *et al* 2001). A més a més, una deficiència de GS de fetge en humans porta a un hipoglicèmia cetòtica degut a la impossibilitat de sintetitzar glucosa per gluconeogènesi (Rutledge *et al* 2001 i Orho *et al* 1998). Aquestes observació suggereixen que la GS és essencial per a la producció de glucosa a partir de gluconeogènesi.

Tercer, quan la Glu 6-P prové de la fosforilació de glucosa per part de la GK, la síntesi de glicogen incrementa en funció dels nivells de glucosa. El glicogen es produeix de manera més eficient gràcies a la inactivació de la GP per glucosa i la conseqüent disminució de la degradació del glicogen. El funcionament tan acurat d'aquesta maquinària esdevé essencial en el balanç entre la producció hepàtica de glucosa i la síntesi de glicogen.

Durant molts anys hi ha hagut molta controvèrsia al voltant del mecanisme pel qual la glucosa era capaç d'activar la GS i estimular la síntesi de glicogen. Alguns autors havien postulat, tal i com ja s'ha explicat, que la glucosa provocava l'activació de la GS per un mecanisme seqüencial (Stalmans *et al* 1974). Aquest mecanisme proposava la unió directa de la glucosa a la GP-a inhibint la seva activitat i fent-la més susceptible de ser inactivada per fosfatases. La GP-a es considerava un potent inhibidor de la fosfatasa, i per tant es considera que la seva inactivació resultava en una activació de la GS. En els últims anys han aparegut resultats que es contradiuen amb aquest mecanisme per altra banda tant elegant. Entre d'altres observacions s'ha demostrat que la glucosa ha de ser fosforilada per induir l'activació per desfosforilació de la GS (Carabaza *et al* 1992 i Cadefau *et al* 1997).

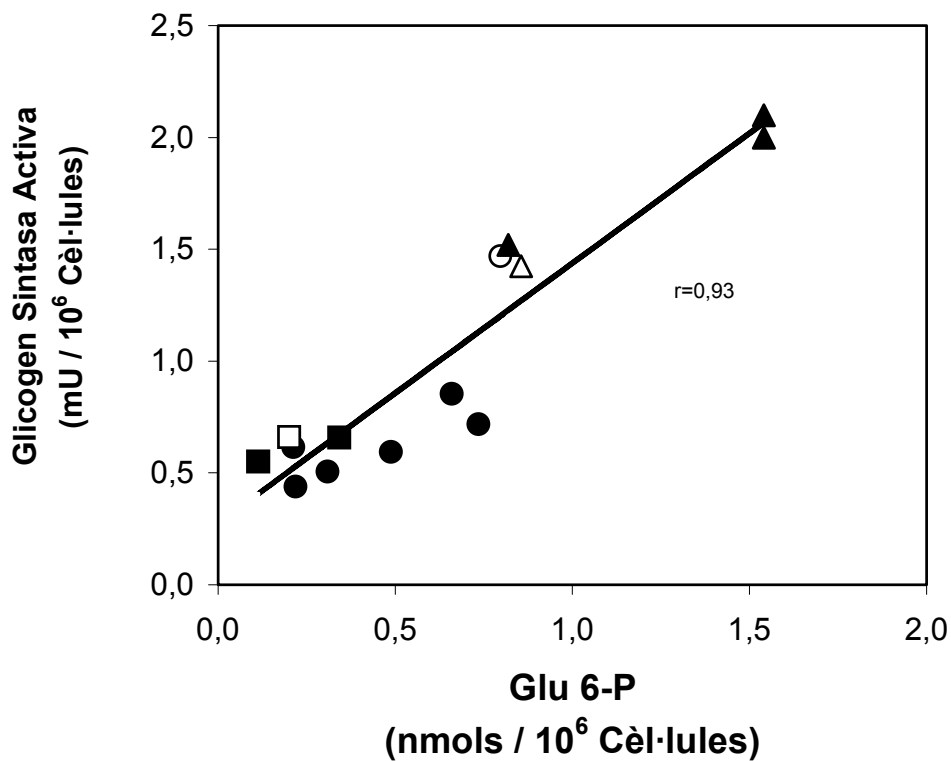
Per altra banda, s'ha suggerit recentment que l'elevat coeficient de control de la GP sobre la síntesi de glicogen es conseqüència de la regulació de l'activitat de la GS més que de la seva capacitat per degradar glicogen (Aiston *et al* 2001), acceptant com a vàlids els arguments proposats en el mecanisme seqüencial d'activació de la GS per glucosa.

En canvi, els nostres resultats mostren que l'activació de la LGS presenta una molt bona correlació amb els nivells de Glu 6-P, independentment de que aquest metabòlit provingui de l'acció de la GK o bé de gluconeogènesi (Fig. 1). Ara bé, en el primer cas, la presència de glucosa fa que la GP-a sigui inactivada, mentre que en el segon aquest enzim resta actiu, tal i com s'ha descrit en el capítol 5. Tot i que, en ambdós casos els nivells de GS activa són els mateixos per una mateixa concentració intracel·lular de Glu 6-P, el menor

estat d'activació de la GP s'explicaria per què els nivells de glicogen són superiors quan s'incuba amb glucosa.

Figura 1 Relació entre els nivells de Glu 6-P i els nivells de GS activa.

Relació entre els valors de concentració de Glu 6-P intracel·lulars i GS activa del diferents experiments realitzats en aquesta tesi en les següents condicions: Hepatòcits van ser tractats amb l'AdCMV-GK (▲), l'AdCMV-G6Pasa (■), o sense tractar(●) durant dues hores, incubats durant 16 hores amb DMEM sense glucosa, i posteriorment incubats amb DMEM amb diferents dosis de glucosa (figures negres) o DHA (figures blanques) durant dues hores. Els coeficient de regressió es troba indicat en el gràfic.



En resum, els resultats presentats en aquest treball clarament han demostrat la importància de la fosforilació de la glucosa per la GK i com aquest metabòlit té un paper crucial com a molècula senyalitzadora en l'activació de la GS i la síntesi de glicogen a partir de glucosa. A més a més, en situacions on la principal font de Glu 6-P és la gluconeogènesi, l'activació de la GS és independent de l'inactivació de la GP-a.

Conclusions:

- 1.** La sobreexpressió de la GS en hepatòcits provoca un increment en la síntesi de glicogen però no augmenta la glicòlisi. A més a més, la concentració dels metabòlits intermedis entre la GK i la GS, com és ara la Glu 6-P i l'UDP-Glc, no baixen significativament quan es sobreexpressa la GS.
- 2.** El control de la síntesi de glicogen en hepatòcits està compartit per la GK i la GS a diferència del múscul on està compartit pel transportador de glucosa (GLUT-4) i la GS.
- 3.** L'acumulació de glicogen, en hepatòcits, a partir de glucosa està sotmesa a un sistema de control en el qual el *controlador*, GS és, alhora, controlat per la GK. Aquest control és indirecte i es exercit a través dels nivells de Glu 6-P, els quals promouen la desfosforilació de la GS, i per tant l'activen.
- 4.** El coeficient de control de la GS en la síntesi de glicogen a partir de glucosa en hepatòcits és positiu i superior a la unitat i depèn de la concentració glucosa a la qual s'han incubat les cèl·lules.
- 5.** La sobreexpressió de la GS implica un augment en els nivells de GP fosforilada a una determinada dosi de glucosa. Això suggereix que la cèl·lula busca un possible equilibri entre les formes actives d'ambdós enzims.

6. Els resultats suggereixen la compartimentalització de la Glu 6-P. En cèl·lules de FTO-2B, hi ha com a mínim dues poblacions de Glu 6-P. La GK serveix el seu producte en un compartiment cel·lular, aquest és accessible a la LGS i la MGS, mentre que la població de molècules de Glu 6-P produïdes per la HK I es localitzen en un compartiment cel·lular del qual està exclosa la LGS.

7. Aquesta diferent capacitat de resposta a la Glu 6-P de diferents fonts entre la LGS i la MGS té, probablement, un sentit fisiològic. L'alta afinitat de la HK I per la glucosa implica que aquest sucre sigui ràpidament convertit en Glu 6-P quan entra a la cèl·lula. Per això, la parella HK I i MGS és sensible a baixes concentracions de glucosa presents en la cèl·lula muscular. Això explicaria per què el control de la acumulació de glicogen en el múscul no rau en la capacitat fosforiladora de glucosa i en canvi si que ho fa en el import de glucosa estimulat per insulina via el GLUT-4 i en la MGS. En canvi en fetge, la parella GK i LGS es sensible a altes concentracions de glucosa mentre que es manté inactiva a baixes concentracions.

8. La concentració catalítica de GS activa i de GP activa són el factor clau per determinar els nivells de síntesi de glicogen.

9. La DHA dispara un canvi en la localització subcel·lular de la GS des d'una distribució citosòlica cap a la perifèria de l'hepatòcit formant agregats al cap de dues hores d'incubació. A més a més, indueix l'activació de la GS i promou la síntesi de glicogen.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNIQUES ESTÀNDARD DE BIOLOGIA MOLECULAR

1.1. PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al* 1988) es va utilitzar per a amplificar fragments de DNA a partir de plasmidis que ja incloïen el cDNA d'interès. En aquest treball experimental es va utilitzar sempre la *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene), ja que tot i ser menys processiva que la *taq*, la seva taxa d'error era molt més baixa.

1.2. ELECTROFORESI DE DNA

Les molècules de DNA es van separar en funció de la mida, això es va fer mitjançant l'electroforesi en gels d'agarosa, seguint la metodologia descrita per Sambrook *et al* (1989). Com a marcadors dels fragments de DNA es va fer servir una digestió del fag λ , amb els enzims de restricció *EcoRI* i *HindIII* (λ /*EcoRI-HindIII*, *Promega G1731*). Aquest marcador de DNA presenta mides d'entre 21000 i 125 pb. El tampó de càrrega de les mostres contenia glicerol i un colorant, el blau de bromofenol, tal i com descriu Sambrook *et al* (1989). L'electroforesi es va fer a 60-80 V a temperatura ambient. Després de separar els fragments el DNA va ser visualitzat a l'UV, gràcies a la presència de bromur d'etidi en el gel.

Gel d'electroforesi de DNA

Es dissolia l'agarosa 0,8-1,5%(p/v) en la solució de TAE (Tris, acètic, EDTA) 1X escalfant la solució amb un microones, es deixava refredar i s'hi afegia el bromur d'etidi 0,5 μ g/ml, s'agitava i s'abocava la barreja al portagels de la cubeta d'electroforesi.

TAE 50X

Es pesaven 242 g de Tris Base (2 M) i 37,2g de Na₂EDTA.2H₂O (100 mM) i es disolien amb aigua. S'afegien 57,1 ml d'àcid acètic glacial i finalment, s'ajustava el pH a 8 i s'enrasava el volum a 1 litre. Finalment, s'autoclavava abans d'utilitzar-lo.

Tampó d'electroforesi de DNA:

TAE (Tris, acètic, EDTA) 1X

Bromur d'etidi

Es preparava a una concentració de 2mg/ml i es conservava en un recipient opac, protegit per la llum. Cal molta precaució (guants i campana d'extracció) en la seva manipulació ja que es tracta d'una substància carcinògena.

Tampó de càrrega de mostres de DNA (5X)

Es preparava amb glicerol 30% (v/v) i Blau de Bromofenol 0,25% (p/v). Aquest tampó s'afegia en una proporció de 1:5 (v/v) a les mostres de DNA.

1.3 CLONATGE

El clonatge d'un fragment de DNA en un altre implicava diverses etapes destinades a preparar la lligació de les molècules de DNA. Les reaccions de digestió, i obtenció de fragments de DNA amb extrems roms i cohesius es van dur a terme seguint la metodologia descrita per Sambrook *et al* (1989). L'enzim que es va utilitzar per a les lligacions entre fragments de DNA

d'interès (inserts) i plasmidis va ser la *T4* DNA lligasa (*Rapid DNA Ligation kit*, Roche) fent barreges de DNA d'entre 100-500 ng entre els dos fragments. Les reaccions es van fer sempre en presència d'un excés de molècules d'insert en relació a les de plasmidi (relació 1:3 o bé 1:5 en funció del cas). Les lligacions es van dur a terme a temperatura ambient durant 1 hora en el cas de fragments cohesius, o bé unes 3 hores en cas de fragments que presentaven extrems roms.

Sempre que, per l'estratègia de clonatge, va fer falta la conversió dels extrems cohesius d'un fragment de DNA digerit en extrems roms, aquest va ser incubat a 37°C durant 30 min en presència del fragment *Klenow* de la DNA polimerasa I d'*E. Coli*.

Quan els fragments que s'havien de clonar provenien de PCR es va utilitzar el kit comercial *Sure Clone Rapid Ligation Kit* (Pharmacia). Aquest permetia lligar el vector pUC18 digerit amb *SmaI* i desfosforilat amb els productes de PCR amb extrems roms.

1.4 QUANTIFICACIÓ DE DNA

Per quantificar el DNA, es va tenir en compte que 1 unitat d'absorbància a 260 nm, mesurada en cubeta de quars de 1000 µl, equivalia a una concentració de 44 mg/ml:

$$\text{Concentració de DNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260\text{nm}} \times 44 \times 1 / V_{\text{mostra}} (\mu\text{l})$$

La qualitat del DNA es va mesurar com la relació entre l'absorbància a 260 nm i 280 nm. És a dir la relació entre l'absorbància de les molècules de DNA i la de les proteïnes. Es va acceptar una qualitat suficient del DNA quan teníem una relació $r > 1.8$.

Alternativament, es va efectuar la quantificació del DNA lineal per electroforesi d'un determinat volum d'aquest DNA, juntament amb uns

marcadors que inclouïen diferents fragments amb quantitats conegudes de DNA. La concentració problema es va determinar comparativament, il·luminant a l'UV el gel.

1.5 TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

La transformació és una tècnica mitjançant la qual s'introdueix DNA exogen, generalment un plasmidi d'interès, en cèl·lules procariotes.

Hi ha diferents mètodes per transformar cèl·lules, tots ells basats en una alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana de les cèl·lules competents, facilitant-ne l'entrada del DNA. Les transformacions s'han fet pel mètode del xoc tèrmic (Sambrook *et al* 1989).

Per tal fi, es descongelava en gel una alíquota (50 μ l) de cèl·lules competents. Es barrejaven les cèl·lules i el DNA plasmídic en una proporció no major a 10:1 (v/v) i mantenir la barreja 30 min en gel. S'incubava 90 segons a 42°C. Es mantenia la barreja 2-3 min en gel. S'hi Afegien 300-600 ml de medi LB autoclavat i s'incubava 1h, en agitació, a 37°C. (durant aquest interval les cèl·lules transformades tenen temps de sintetitzar les proteïnes de resistència codificades pel plasmidi i recuperar-se del xoc tèrmic). S'escampaven un 200 ml de la suspensió de cèl·lules transformades sobre plaques de LB-Agar que incorporen l'antibiòtic corresponent. S'incubaven a 37°C, durant 14-18 hores (cal vigilar el temps, temps massa llargs faciliten el creixement de colònies satèl·lit al voltant de les colònies de bacteries resistents a causa de la destrucció de l'antibiòtic en aquella zona).

Es van emprar cèl·lules *E.Coli DH5 α* (Life Technologies, INVITROGENE). Els plasmidis utilitzats presentaven resistència a ampil·lina (pUC18, pACCMV, pJM117) o a kanamicina (pEGFP).

El plasmidi pUC18 presentava les dianes de clonatge interrompent el gen lac-z, de manera que permetia la selecció per color de les colònies (Utilitzant

plaques de LB-agar amb IPTG i X-gal). Si s'havia introduït un insert en la regió de clonatge el gen lac-z no es podia expressar i donar coloració blanca a les colònies positives. Les colònies que contenien el plasmidi sense l'insert presentaven un color blavós. A vegades, el color blau no s'apreciava bé i podia donar lloc a la confusió i identificació de falsos positius. Per evitar-ho es deixaven les plaques unes hores a 4°C potenciant el color blau de les colònies negatives.

Medi Luria-Bertani (LB)

Els 3 components es dissolien en H₂O mQ (Tryptona 1%, Extracte de Llevats 0,5% i NaCl 1% (P/V)). S'ajustava el pH a 7 amb NaOH i s'autoclava. S'afegia l'ampicil·lina o kanamicina a una concentració final de 100 µg/ml abans d'inocular la corresponent colònia resistent que es volia créixer.

Ampicil·lina i kanamicina

Es preparava un estoc a 100mg/ml (1000 X) i es conservava aliquidada i congelada a -20°C.

Plaques de LB-agar

Es pesaven la triptona (1%(p/v)), l'extracte de llevats (0,5%(p/v)) i el NaCl (1%(p/v)) i s'hi afegia l'agar (1,5%(p/v)), es dissolien en H₂O mQ i s'autoclavava. Una vegada autoclavat, es deixava refredar la solució fins a 50°C i es preparaven les plaques en una campana; quan l'agar estava solidificat, es mantenien una nit cap per avall en una estufa a 37°C, per comprovar que no estaven contaminades. Després, es guardaven a 4°C fins a ser utilitzades.

Plaques de LB-agar amb antibiòtics

Es preparaven com les anteriors. Ara bé, s'afegia l'antibiòtic a la concentració adequada quan la temperatura de la barreja a disminuït a 50°C per no fer malbé l'antibiòtic. En aquest treball s'han usat els antibiòtics ampil·lina i kanamicina. Per a la selecció per expressió del gen lac-Z o per antibiòtics, es feien servir les següents concentracions

Ampil·lina i kanamicina	100 µg/ml
IPTG	40 µg
X-gal	8 µg/ml

IPTG

Es preparava a una concentració de 100 mM i es guardava aliquotat i protegit de la llum a -20°C.

X-gal

Es preparava a una concentració de 50 mg/ml en DMF (dimetilfluorur) i es guardava aliquotat i protegit de la llum a -20°C.

1.6 OBTENCIÓ DE DNA PLASMÍDIC

S'han descrit diversos protocols per aïllar plasmidis de cultius bacterians. Aquests es basen en un primer pas de ruptura de la paret cel·lular, seguit d'una etapa de purificació del DNA per precipitació o bé utilitzant alguna tècnica cromatogràfica (mitjançant columnes o resines disponibles comercialment). En aquest treball es van utilitzar dues vies d'obtenció de DNA plasmídic, que es diferenciaven pel volum de cultiu: lisi alcalina per cultius de menys de 2 ml o maxipreps en el cas de cultius grans (>200 ml).

a) Mètode de lisi alcalina (miniprep)

Protocol que es basa en una lisi inicial de les parets cel·lulars bacterianes en medi bàsic, seguit d'una precipitació del DNA. El DNA que s'aïllava és poc pur, i és per això que aquest mètode només es va utilitzar per aïllar DNA plasmídic provinent de colònies bacterianes transformades amb productes de lligació.

Per a l'obtenció del DNA, es passava en un tub eppendorf 1 ml del cultiu bacterià (que prèviament havia estat creixent a 37°C en agitació constant, durant 8-15 hores). La resta del cultiu es guardava (1ml) a 4°C. Es centrifugava el cultiu a 10.000 xg durant 30 segons, per sedimentar els bacteris. I s'aspirava el sobrenedant. Es Resuspenia el precipitat de bacteris en 100 μ l de TE i es Deixava 5 min a temperatura ambient. S'afegien 200 μ l de solució de lisi (SDS/NaOH) i s'invertia suaument 3 o 4 vegades i es deixava 5 min a temperatura ambient. Després, s'afegien 150 μ l de solució d'acetat potàssic (KCOOHCH₃). S'invertia suaument 3 o 4 vegades i es deixava 5 min precipitant en gel. Es centrifugar a 10.000 xg , durant 5 min i es passava el sobrenedant a un tub eppendorf net. S'hi afegien 900 μ l d'etanol i es deixava la barreja 5 min a temperatura ambient. Es tornava a centrifugar 5 min a 10.000 xg i s'eliminava el sobrenedant. Es rentava el precipitat amb 1 ml d'etanol (CH₃CH₂OH) al 70% (V/V), i es tornava a centrifugar durant 5 min i per eliminar el sobrenedant. Deixàvem assecar el precipitat a l'aire i el resuspeníem en 20 μ l de la solució d'RNAasa A en TE ph (50 μ g/ml). Finalment, s'incubava 30 min a 37°C, per a digerir l'RNA i fer les anàlisis corresponents dels plasmidis obtinguts, mitjançant digestió o PCR.

TE

Tris HCL pH 8	25 mM
EDTA pH 8	10 mM

Solució de lisi

NaOH 0,2 M

SDS 1%

Es preparava al moment de fer-la servir.

Solució d'acetat potàssic (CH₃COOK)

KAc (CH₃COOK) 3 M

Àcid acètic glacial (CH₃COOH) 5 M

Una vegada realitzades les digestions o la PCR del DNA aïllat per tal d'identificar la colònia positiva, es feia servir la resta del cultiu que s'havia guardat a 4°C per inocular uns 200 ml de medi LB fresc. El cultiu es deixava créixer en agitació constant a 37°C unes 16h, i seguidament es feia una maxiprep per obtenir-ne el DNA a gran escala.

b) Maxiprep

Aquest protocol permet obtenir quantitats importants de plasmidi (100-500 µg). El plasmidi purificat és de gran puresa i pot ser utilitzat tant en reaccions de restricció, lligació, etc... com per seqüenciar o transfectar. El mètode estava basat en una lisi alcalina del cultiu cel·lular amb una posterior purificació del DNA per cromatografia d'intercanvi iònic en columna mitjançant el kit *QIAGEN Plasmid maxi prep* (QIAGEN).

Abans de començar l'aïllament del DNA, calia guardar un petit volum del cultiu bacterià (1 ml) amb el qual es preparava un estoc de bactèries. Per a aquest fi, s'afegia a les cèl·lules un volum de glicerol al 50% estèril per tal que quedés a una concentració final del 15%. Aquest estoc es podia mantenir congelat a -80°C i servia per a créixer més cultiu bacterià sense necessitat de transformar noves bactèries.

Els plasmidis finals es van dissoldre en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8.

1.7 SEQÜENCIACIÓ DE DNA

Les construccions de DNA que s'han realitzat en aquest treball van ser seqüenciades per verificar que en el procés de PCR no s'hi havia introduït cap error. La seqüenciació del DNA plasmídic dels vectors utilitzats en aquest projecte va estat realitzada de manera automatitzada als Serveis Científico-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona.

El protocol utilitzat es basava en dur a terme una reacció de PCR a partir del DNA que es volia seqüenciar, en presència de ddNTP marcats, cada un d'ells, amb un indicador fluorescent de longitud d'ona diferent. Les reaccions de PCR per seqüenciar s'efectuaven a una temperatura d'hibridació de 47°C i es feia servir un kit (*ABI-PRISM DNA sequencing kit*, Amersham).

La reacció de seqüenciació es realitzava en presència d'oli mineral, que podia dificultar la recuperació del volum sencer de la reacció de seqüenciació. Per recuperar les cadenes sintetitzades era convenient pipetejar tot el contingut del tub eppendorf (oli i medi aquós) i dipositar-lo sobre un tall de *parafilm*. A continuació, es feia relliscar inclinant el *parafilm* fins que l'oli se separava de la barreja de seqüenciació. Un cop separada la fase aquosa de l'oli, les cadenes sintetitzades eren precipitades, rentades i assecades segons el protocol indicat pel proveïdor del *kit*.

Posteriorment, aquestes cadenes eren analitzades per electroforesi en un sistema acoblat a un fluorímetre. Aquesta última part és la que es duia a terme al servei de seqüenciació dels SCT amb el seqüenciador *ABI-PRISM 377 automatic DNA sequencer* (Perkin Elmer Applied Biosystems).

2. CONSTRUCCIÓ DELS PLASMIDIS QUE CODIFIQUEN PER A LA RLGS I PER A LA GFP-RLGS

Es van construir els plasmidis que codifiquen per a proteïnes salvatges o bé unides a un marcador fluorescent com la GFP. En els casos de fusionar un marcador de fluorescència, es va fer a l'extrem N-terminal de la proteïna d'interès.

2.1 RLGS I FUSIÓ AMB GFP

La seqüència codificant sencera de la GS de fetge de rata va ser amplificada per RT-PCR a partir de mRNA de fetge de rata utilitzant el *Superscript One-Step RT-PCR System* (Gibco BRL) i oligos degenerats. Tot seguit, es va amplificar usant la Pfu DNA polimerasa i els oligonucleòtids (5'-ATTTCATATgCTCAggggCCgCTCCTTgTCTgTgACg-3') i (5'-gACTCTAgATATgCATCAgggATggACTTgggC-3') els quals introduïen les dianes de restricció *NdeI* i *XbaI* (subratllades), respectivament. El fragment obtingut va ser clonat en el plasmidi pUC18 linealitzat amb *SmaI*, amb extrems roms i desfosforilat (*smaI/BAP*), usant el *SureClone ligation kit* (Pharmacia Biotech).

Des d'aquest vector es va clonar el cDNA de la RLGS en el vector d'expressió en cèl·lules eucariotes pE-GFP de tal manera que els cDNA de les dues proteïnes compartien el mateix marc de lectura. La construcció resultant va ser el plasmidi pEGFP/RLGS. Aquest vector dirigia l'expressió en cèl·lules eucariotes de la RLGS fusionada a la proteïna verda fluorescent (GFP) en el seu extrem N-terminal. D'aquesta manera podíem seguir la seva localització subcel·lular en temps real.

2.2 PREPARACIÓ DE PLASMIDS PER GENERAR ADENOVIRUS RECOMBINANTS

2.2.1 pACCMVpLpA-RLGS

El cDNA de la RLGS es va amplificar per PCR a partir d'un plasmidi pGEM-T que incorporava aquest cDNA (pGEM-T/RLGS). Com a encebadors de la reacció es van utilitzar dos oligonucleòtids que incorporaven: a 5'- del cDNA,

una seqüència KOZACK (Kozack 1987a,b) de posicionament de ribosomes i una diana Kpn I, i a 3'- del cDNA una diana Xba I.

El primer *Sense* va ser el següent:

5'-TTAagggTACCgCCACCATgCTCAggggCCgCTCCTTgTCTgTgAC-3'

5'- gACTCTAgATATgCATCAgggATggACTTgggC -3'

El primer *Antisense* va ser el que segueix:

El producte de l'amplificació per PCR era purificat. Posteriorment era tallat amb HindIII. Amb l'ajut de la *klenow* polimerasa es van fer els extrems roms i es tornava a tallar l'insert amb l'enzim de restricció Kpn I. Aquest producte era el que es va utilitzar per clonar-lo al pACC.

El pACCMVpLpA es va tallar amb Xba I, després es van fer roms els extrems i es van tornar a tallar amb KpnI.

Es va fer la lligació dels dos productes per obtenir el plasmidi pACCMVpLpA-RLGS amb el qual podíem iniciar el procés de generació de l'adenovirus recombinant.

2.2.2. pACCMVpLpA-GFP/RLGS

Es va partir del plasmidi pEGFP/RLGS on teníem el DNA codificant per les dues proteïnes fusionades en pauta de lectura. Es va tallar aquest vector amb Eco47 III. Un enzim de restricció que ens alliberava l'insert de DNA que contenia el gen de la GFP/RLGS. Aquest fragment el es va tallar posteriorment amb l'enzim de restricció Kpn I de tal manera que teníem un fragment amb un extrem rom i l'altre cohesiu.

El plasmidi pACCMVpLpA, necessari per generar l'adenovirus, es va tallar amb l'enzim Eco RI de tal manera que el linialitzavem. Tot seguit reconstituíem els seus extrems per acció de la polimerasa *Klenow*. Finalment, es va tornar a tallar amb l'enzim Kpn I que tallava un dels dos extrems.

Quan es van combinar tots dos fragments de DNA i hi afegíem DNA lligasa, l'insert s'unia al plasmidi i quedava orientat correctament amb la part que codificava per l'amino-terminal darrera del promotor de CMV.

3. PREPARACIÓ D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Es disposava al laboratori de diferents adenovirus recombinants que contenen el cDNA de la glucoquinasa de fetge de rata, AdCMV-GK, l'hexoquinasa I de fetge de rata, AdCMV-HK, la glucosa 6-fosfatasa de fetge de rata, AdCMV-G6Pasa, la β -galactosidasa, AdCMV- β GAL, la *green fluorescent protein* (GFP), AdCMV-GFP, i la glicogen sintasa de múscul, AdCMV-MGS. D'altra banda, es van construir els adenovirus recombinants que contenen el cDNA de la glicogen sintasa de fetge de rata, AdCMV-RLGS, i la glicogen sintasa de fetge de rata fusionada a la GFP, AdCMV-GFP/RLGS.

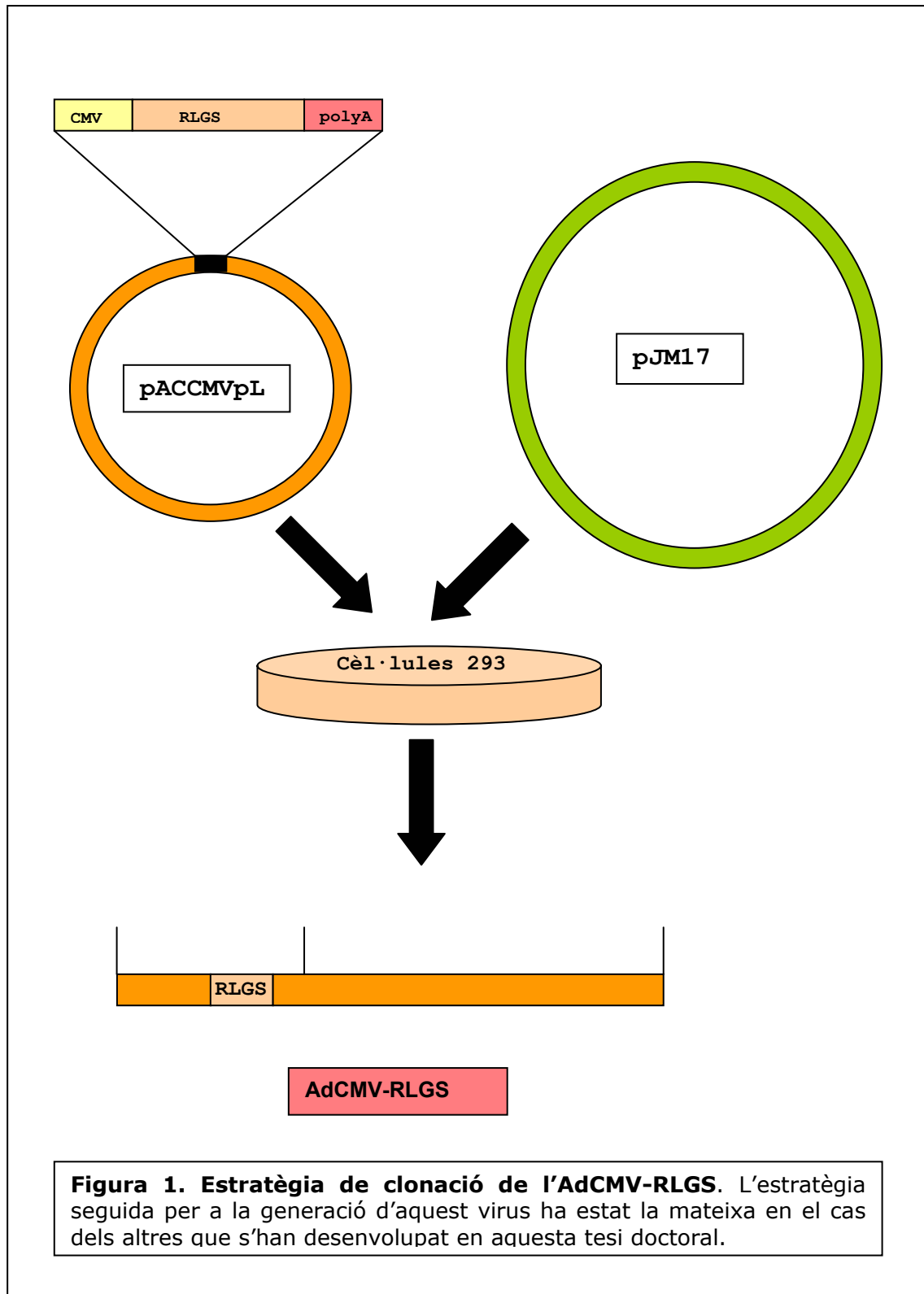
3.1 CONSTRUCCIÓ DE L'ADENOVIRUS ADCMV-RLGS, ADCMV-GFP/RLGS

L'estratègia de construcció dels diferents adenovirus està esquematitzada a la Fig 3 i és una variació del mètode descrit per Becker *et al* (1994). Es disposava del vector pACCMVlpA que derivava d'un plasmidi pAC al que s'hi havia afegit el promotor constitutiu del citomegalovirus (CMV), el lloc de policlonatge (polylinker) del pUC 19 i un fragment del genoma del virus SV40 que contenia l'intró de l'antigen T i el senyal de poliadenilació (Gluzman *et al* 1982). El vector pAC conté el genoma de l'adenovirus 5 des de 0 fins a 1,3 mu (unitats de mapa) i des de 9,1 fins a 17 mu i també un fragment del plasmidi pXF3. El fragment entre les posicions 1,3 i 9,1 mu que manquen en el plasmidi corresponen al gen AdE1A. Posteriorment, es va incloure entre el promotor CMV i el senyal de poliadenilació el cDNA de la proteïna que ens interessava (RLGS, GFP/RLGS).

També es disposava del plasmidi pJM17 (McGrory *et al* 1988) de 40kb, que contenia el genoma complet de l'adenovirus 5 interromput per la inserció del plasmidi bacterià pBRX a la posició 1,3 mu. D'aquesta manera, el plasmidi pJM17 excedeix la longitud màxima de DNA que es capaç d'empaquetar l'adenovirus (38 kb), i per tant, no pot formar partícules víriques infectives.

El pas següent consistia en cotransfectar els dos plasmidis, el pACCMVpLpA amb el cDNA d'interès i el pJM17, en cèl·lules 293 mitjançant la tècnica de transfecció amb fosfat càlcic (**4.1**). El que s'esperava era un fenomen de recombinació homòloga gràcies a les seqüències idèntiques presents en ambdós plasmidis. Per que això es produís calia que els dos plasmidis s'internalitzessin en la mateixa cèl·lula 293. El producte de la recombinació homòloga resultant era un genoma víric recombinant que incloïa el cDNA de la nostra proteïna d'interès i que podia ser encapsidat tot i mancar-li el gen AdE1A necessari per tancar el cicle lític de l'adenovirus. Aquest gen AdE1A el proporcionaven les cèl·lules 293 que el tenien integrat en el seu genoma i el podien subministrar en *trans*, facilitant la formació de les partícules víriques recombinants. Aquestes partícules víriques tenien capacitat d'infecció però eren deficientes pel que fa a la replicació. Només es podien amplificar en cèl·lules 293.

Es va purificar un clon de l'extracte víric de la primera recombinació per a tenir una població homogènia de virus. Aquest procés es feia sobre una monocapa de cèl·lules 293 que s'infectaven i es fixaven amb una matriu d'agar. Es deixava créixer les cèl·lules durant uns 10 dies i quan apareixien les primeres plaques de lisi es seleccionaven amb l'ajut d'una pipeta pasteur. Aquest clon, es va amplificar posteriorment.



3.2 AMPLIFICACIÓ DELS ADENOVIRUS

Per treballar amb un nou adenovirus calia preparar-ne un stock de solució infectiva per a realitzar els experiments desitjats. Per això calí amplificar els virus. El mètode que es va utilitzar és el descrit per Becker *et al* (1994).

L'amplificació dels adenovirus consistia en infectar cèl·lules 293 en grans quantitats. Es preparaven les cèl·lules en plaques de 100 o 150 mm, depenent de la quantitat de solució vírica desitjada. Les plaques havien d'estar a una confluència del 80-90%. S'infectaven amb una petita quantitat de solució vírica en un volum de 3 o 5 ml de medi en funció del tamany de cada placa. Es remenaven les plaques amb suavitat perquè la infecció fos homogènia a tota la monocapa. Després de 2-3 hores s'afegien 10 o 15 ml de medi depenent de si la placa era de 100 o 150 mm de diàmetre. Passats de 5 a 7 dies, es començava a observar la lisis cel·lular. Quan aquesta arribava al 60 % de les cèl·lules es recollia el medi amb restes cel·lulars i es congelava. Per deixar lliures les partícules víriques es seguien 4 cicles de congelació i descongelació. Aquest procés es feia amb l'ajut d'un bany de neu carbònica en etanol i un bany a 37 °C. Acabat el procés es centrifugava l'extracte a 500 rpm durant 5 minuts per eliminar les restes cel·lulars i s'aliquotava el sobrenedant. Aquesta solució de medi amb partícules víriques es podia congelar a - 20°C o a -80°C.

3.3 TITULACIÓ DELS ADENOVIRUS

La quantificació dels estocs virals obtinguts per amplificació es va realitzar pel mètode del blau de tripà. Es van fer diferents dilucions de l'estoc d'adenovirus amb medi de cultiu (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} i 10^{-9}). S'afegien 200 µl de cada dilució en 12 pous d'un multi-well de 96 i es deixaven a l'incubador a 37°C. Al cap d'uns 5-7 dies es va fer una estimació de la mort cel·lular amb l'ajut del colorant blau de tripà. La dosi de virus corresponia a aquella dilució on s'observava mortalitat en més de la meitat dels pous.

4. TRANSDUCCIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES

4.1. CO-PRECIPITACIÓ DEL DNA AMB FOSFAT CÀLCIC

Aquest mètode de transfecció amb fosfat càlcic va ser usat per primera vegada per Graham i Van der Eb (1973) i es basa en la barreja del DNA en un tampó fosfats amb CaCl_2 . En aquesta barreja es formen complexos de DNA i fosfat càlcic que precipiten sobre la monocapa cel·lular, adherint-se a la membrana cel·lular i entrant al citoplasma per endocitosi.

És un procés de baixa reproduïbilitat a causa de la variabilitat en el tamany i forma dels complexos DNA-fosfat càlcic. Aquest procés es va utilitzar per a la co-transfecció de cèl·lules 293 en la construcció d'adenovirus recombinants.

4.2. TRANSFECCIÓ MITJANÇANT LIPOSOMES O DENDRÍMERS ACTIVATS

Per aplicar aquesta tècnica les cèl·lules havien d'estar a una confluència del 60-80% en plaques de 35 mm. Preferentment, havien d'haver estat plaquejades el dia anterior ja que com més vell és el cultiu, pitjor és l'eficiència de transfecció. En el cas dels hepatòcits, la transfecció es va dur a terme unes 3-4 h després del seu aïllament, un cop s'havien adherit a la placa de cultiu.

Es va usar un *Kit* comercial de transfecció: Clonfectin (Clontech, USA). La *Clonfectina* és un liposoma catiònic, que interacciona amb els grups fosfat carregats negativament del DNA. Es creu que aquest complex és introduït a dins de la cèl·lula per endocitosi. Aquest mètode es va utilitzar en hepatòcits tot i que amb baixa eficiència. Aquesta que és funció del plasmidi que es transfecta.

Al cap de 4h de transfecció, es rentaven els hepatòcits amb PBS i eren incubats en DMEM a una concentració de glucosa i hormones adequades a l'experiment, que s'havia de fer l'endemà de la transfecció (per evitar la desdiferenciació).

4.3. INFECCIÓ DE CÈL·LULES EN CULTIU AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Abans de començar la infecció, es preparaven les solucions amb virus a partir dels estocs d'adenovirus en medi DMEM (0mM o 5mM glucosa i 0 o 2% FBS, segons l'experiment) per tal d'aconseguir una multiplicitat d'infecció o m.o.i. (*multiplicity of infection*) adequada. La m.o.i. es defineix com el número d'unitats formadores de plaques (p.f.u., *plaque forming units*) que hi ha per cèl·lula. M.o.i. superiors a 5 asseguren un 95% d'eficiència d'infecció en hepatòcits i en FTO-2B. Era per això que en els estudis metabòlics en hepatòcits es va fer servir una m.o.i. superior a 5. Una excepció va ser el càlcul dels coeficients de control, on es necessiten nivells de sobreexpressió de la proteïna, des de molt baixos a més elevats.

El procés d'infecció de cèl·lules amb adenovirus començava amb un rentat de les mateixes amb PBS. Seguidament, es tractaven les cèl·lules durant 2h amb 1 ml (plaques de 60 mm de diàmetre), 0,5 ml (plaques de 35 mm de diàmetre i multi-wells de 12 pous) o 200 µl (multi-wells de 24 pous) de solució amb virus. Passat el temps d'incubació es retirava el medi, es rentava amb PBS i s'hi afegia medi fresc amb diferents característiques en funció de l'experiment. Abans de qualsevol experiment es van deixar transcórrer entre 14 i 16 hores per a l'expressió de la proteïna recombinant en hepatòcits (no deixar temps massa llargs ja que els hepatòcits comencen a desdiferenciar-se), i unes 36 hores en el cas de línies cel·lulars estables per aconseguir una major expressió.

5. ANIMALS

Per a la obtenció d'hepatòcits en cultiu de rata es va utilitzar rates mascles *wistar* amb un pes de 180-250 g. Els animals eren alimentats amb una dieta equilibrada de laboratori i amb aigua *ab libitum*. Es mantenien a una temperatura constant, entre 22 i 24°C, i en un cicle de llum-fosc de 12 hores (8 del matí a 8 del vespre).

Per a realitzar l'obtenció d'hepatòcits en cultiu, els animals es dejunaven unes 18-24 hores abans. L'obtenció d'aquests hepatòcits sempre es va realitzar entre les 9 i les 11 hores del matí per evitar la variabilitat.

6. CULTIU PRIMARI D'HEPATÒCITS DE RATA

La tècnica emprada per aïllar els hepatòcits del teixit hepàtic i separar-los de la resta de cèl·lules hepàtiques va ser descrita per Berry i Friend (1969) i va ser posteriorment modificada per altres autors (Seglen, 1973). Aquesta tècnica es basava principalment en la perfusió recirculant del fetge amb una solució de col·lagenasa A (Boehringer Mannheim, Sigma, USA) per disgregar i aïllar les cèl·lules hepàtiques.

L'animal era anestesiàt per injecció intraperitoneal de pentobarbital (a una dosi de 200 mg per kg de pes corporal); a continuació es col·locava en una safata i s'immobilitzava. S'obre l'abdomen transversalment, prèviament humitejat amb etanol al 66%, i es retiraven les vísceres per tal de deixar a la vista el fetge i sobretot la vena porta. La vena porta era encanulada amb un tub semirígid de plàstic de 12 mm de diàmetre., després d'haver-hi realitzat un tall longitudinal d'uns 5 mm (uns 2 cm abans de la seva entrada al fetge). Per la cànula s'introduïa a un flux mínim una solució bicarbonatada de Krebs-Ringer, que conté NaCl 118,5 mM, KCl 4,8 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EGTA 0,5 mM i glucosa 5 mM. Inicialment s'atemperava

a 37°C i es gassejava amb carbogen (O₂/CO₂ 19:1) saturat d'aigua de manera que el pH s'ajustà a 7,4.

Després d'introduir la cànula a la vena porta, es seccionava la vena cava inferior per la part baixa de la cavitat abdominal i es col·locava sobre una malla de niló. Tot el perfusat de rentar es rebutjava i a continuació es fa passar a través de la cànula una solució que contenia col·lagenasa 50 mU/ml i CaCl₂ 60mM. Els pas de la col·lagenasa es feia durar entre 12 i 16 minuts en funció de lot de l'enzim. Es submergia el fetge en una solució de Krebs-Ringer sense glucosa en presència de CaCl₂ 2,5 mM i albúmina de sèrum boví 15 mg/ml i es procedia aleshores a extreure la membrana fibrosa que envoltava el fetge amb l'ajut d'unes pinces, per després agitar-lo suaument i així alliberar les cèl·lules. Es filtrava la suspensió cel·lular i es procedia a realitzar dos cicles de rentats de les cèl·lules amb l'esmentat tampó. Finalment es resuspenien les cèl·lules en DMEM suplementat amb 10 mM glucosa, 10% FBS, insulina 100nM, dexametasona 100 nM i antibiòtics (estreptomicina 100U/ml i penicil·lina 0.1 mg/ml).

Un cop obtinguda la suspensió d'hepatòcits, es procedia al comptat cel·lular en una càmera de Neubauer, així com al càlcul de la viabilitat segons el mètode d'exclusió de blau tripà (Howard i Pesch, 1968). La viabilitat solia oscil·lar entre el 80-90%. Tot seguit, es va fer una dilució de la suspensió cel·lular en el mateix medi de cultiu fins a una concentració de $0,58 \times 10^6$ cèl·lules per ml. Els hepatòcits van ser sembrats en plaques revestides de gelatina, la qual en facilitava l'adhesió i el procés de diferenciació cel·lular. Es sembraven els hepatòcits a una densitat cel·lular final de 6×10^6 cèl·lules per cm². Les plaques es mantenien a l'incubador en les condicions establertes (37°C, 90% d'humitat i 5% de CO₂) durant un període de 3-4 hores.

En aquest temps les cèl·lules viables s'unien a la placa i iniciaven el seu procés de diferenciació. A continuació es rentava la monocapa cel·lular per

tal d'eliminar les cèl·lules mortes no adherides. Aleshores s'afegia el medi convenient per a l'experiment o bé es procedia a la infecció amb adenovirus.

7. CULTIU CEL·LULAR DE LÍNIES ESTABLES

7.1. CÈL·LULES 293

Per la preparació i l'amplificació dels adenovirus recombinants es va utilitzar la línia cel·lular 293 (ATCC CRL 1573). Aquestes cèl·lules procedien de ronyó d'embrió humà (Graham *et al* 1977) i havien estat transformades de manera estable amb el gen AdE1A de l'adenovirus tipus 5 (gen necessari per a la replicació vírica). Les cèl·lules es van fer créixer i es mantenien en un incubador a 37°C, al 5% de CO₂ i 95% d'humitat.

7.2. CÈL·LULES FTO-2B

Línia cel·lular caracteritzada per no expressar el gen de la hexoquinasa IV o glucoquinasa i tenir la isoforma hepàtica de la glicogen sintasa. És una línia cel·lular d'hepatoma de rata. Les cèl·lules es fan créixer i es mantenen en un incubador a 37°C, al 5% de CO₂ i 95% d'humitat.

7.3. METODOLOGIA DE CULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS

El medi emprat per al creixement d'aquestes cèl·lules va ser DMEM amb 4.5 g/l (25 mM) de glucosa, amb el suplement d'un 10% de FBS i antibiòtics (penicil·lina 0.1 mg/ml i estreptomicina 100 U/ml). En aquest medi es van créixer i es van subcultivar en plaques de cultiu de 150, 100 o 60 mm de diàmetre segons les necessitats. Per al subcultiu es rentaven les plaques amb PBS i es tractaven amb tripsina al 0,25% i EDTA 1mM (tripsina-EDTA 1x, Biological Industries). Es recollien en suspensió i es centrifugaven a 100 x g durant 5 min. S'eliminava el medi amb tripsina i el precipitat cel·lular es ressuspenia amb el medi de cultiu i s'afegia a noves plaques de cultiu a una densitat de 60.000 cèl·lules/cm².

La congelació de les cèl·lules es realitzava després de la tripsinització i centrifugació cel·lular ($100 \times g$, 5 min), ressuspenent les cèl·lules dissociades en el seu propi medi amb un suplement d'un 10% DMSO com a agent crioprotector, i aliquotant-les en criotubs d'1,8 ml de capacitat (Nunc). Es va fer una congelació progressiva ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), utilitzant un contenidor de cèl·lules per a congelació (Nalgene), el qual es col·locava a -80°C durant unes 12 hores. Finalment els criotubs eren emmagatzemats en un tanc de nitrogen líquid.

8. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

Les activitats enzimàtiques es van determinar a partir d'extractes cel·lulars procedents de cèl·lules en cultiu.

8.1. PREPARACIÓ D'EXTRACTES A PARTIR DE CÈL·LULES EN CULTIU

Els extractes es preparaven a partir de plaques de cèl·lules que es guardaven congelades a -80°C . S'afegia a les plaques el tampó d'homogenització corresponent en funció de l'activitat que es volia mesurar. Les plaques es rascaven amb l'ajuda d'una espàtula de plàstic. El trencament cel·lular es produïa per descongelació en el cas dels hepatòcits i per sonicació en el cas de línies cel·lulars. Aquest procés es realitzava sobre un suport de gel per mantenir la temperatura a 4°C . L'homogenat es centrifugava a $10.000 \times g$ durant 15 min a 4°C i es recollia el sobrenedant i el sediment. Es ressuspenia el sediment amb tampó d'homogenar i es procedia a la determinació de paràmetres del sobrenedant i/o del sediment que interessis. En alguns casos, es determinava l'activitat de l'homogenat sense centrifugar.

8.2 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICOGEN SINTASA

Per a la determinació de l'activitat glicogen sintasa, les cèl·lules eren homogenades amb $100 \mu\text{l}$ de tampó: 10 mM Tris/HCL a pH 7,0; 150 mM KF i

15 mM EDTA suplementat en l'últim moment amb 600 mM sacarosa, 15 mM 2-mercaptoetanol i els inhibidors de proteases: leupeptina 10 µg/ml; benzamidina 1mM i PMSF 1 mM.

La presència de l'ió fluorur en el tampó d'homogenar inhibeix l'activitat proteïna fosfatasa que pogués tenir l'extracte cel·lular. Mentres, l'EDTA s'afegeix com a segrestador dels ions magnesi, necessaris per l'activitat proteïna quinasa responsable de la fosforilació de l'enzim. Així s'eviten canvis en l'estat de fosforilació de l'enzim durant la manipulació de les mostres.

L'activitat glicogen sintasa es mesurava mitjançant un assaig radiomètric consistent en la mesura de la incorporació d'UDP-[¹⁴C]-glucosa a glicogen, seguint la tècnica descrita per Thomas *et al* (1968). Aquest mètode mesurava l'activitat de l'enzim en absència i presència del seu efector al·lostèric, la glucosa 6-fosfat. L'activitat mesurada en absència de glucosa 6-fosfat engloba les formes més desfosforilades de l'enzim, que són les més actives; d'altra banda, l'activitat mesurada en presència de glucosa 6-fosfat engloba les formes més fosforilades de l'enzim, que són les més inactives.

Per determinar l'activitat glicogen sintasa en presència de glucosa 6-fosfat s'utilitzava una solució formada per: UDP-[¹⁴C]-glucosa 1000 cpm/µl, UDP-glucosa 6,7 mM, glicogen 10 mg/ml, KF 25 mM, EDTA 20 mM, glucosa 6-fosfat 6,6 mM i Tris 50 mM ajustat a pH 7,8 amb HCl. La radioactivitat específica de la solució és 150.000 cpm/µmol UDP-glucosa. Per determinar l'activitat en absència de glucosa 6-fosfat, s'utilitzava una solució formada per: UDP-[¹⁴C]-glucosa 2000 cpm/µl, UDP-glucosa 6,7 mM, glicogen 10 mg/ml, KF 25 mM, EDTA 20 mM, glucosa 6-fosfat 6,6 mM i Tris 50 mM ajustat a pH 7,8 amb HCl. La radioactivitat específica de la solució fou de 300.000 cpm/µmol UDP-glucosa.

El paràmetre indicatiu de l'estat d'activació de la glicogen sintasa s'obtenia fent servir la relació d'activitats en absència i presència de glucosa 6-fosfat (-Glu 6-P/+Glu 6-P).

L'assaig radiomètric

Es deixaven atemperar 40 μl de la solució d'assaig en un bany termostatitzat a 30°C durant 5 minuts. Tot seguit, s'hi afegien 20 μl de mostra i la barreja es deixava incubar 30 minuts a 30 °C. Una vegada passats aquests minuts, s'extreien 50 μl de la barreja de reacció i es dipositaven en un tros de paper 31-ET (Whatman, USA) de 2x2 cm que tot seguit es submergia en etanol 66% fred (-20°C). Aquest canvi sobtat de temperatura provocava la precipitació i fixació al paper del glicogen present en la barreja. Es van fer rentats successius del paper, el primer de 10 minuts i els altres 2 de 20 minuts, amb noves solucions d'etanol 66% a temperatura ambient i poder així eliminar qualsevol metabòlit fixat al paper 31-ET. Després de l'últim rentat se submergiren els papers en acetona durant uns segons per desplaçar l'etanol 66% i poder assecar-los completament. Una vegada secs, els papers s'introduien en vials que contenien líquid de centelleig (Toluè amb PPO (2,5-dimetiloxazol, Merck, USA) al 5%), i la radioactivitat es comptava amb un comptador de centelleig Rack BETA 1217 (LKB, UE).

Quan les cèl·lules d'on es volia mesurar l'activitat glicogen sintasa sobreexpressen l'enzim glucosa 6-fosfatasa la barreja d'assaig es modificava. El problema rau en l'efecte que elevats nivells d'activitat glucosa 6-fosfatasa tenen sobre les condicions d'assaig. La incubació durant un període de 30 minuts, i l'alt nivell de glucosa 6-fosfatasa a l'extracte podia consumir la glucosa 6-fosfat present a la barreja d'assaig, de manera que la glicogen sintasa no es podia activar al·lostèricament per complet i per tant s'infravalorava el nivell d'activitat glicogen sintasa total. El problema es soluciona modificant la barreja de l'assaig en els experiments on es sobreexpressa la glucosa 6-fosfatasa: UDP-[¹⁴C]-glucosa 1000 cpm/ μl , UDP-glucosa 6,7 mM, glicogen 10 mg/ml, KF 25 mM, EDTA 20 mM, glucosa 6-fosfat 100 mM, florhidzina 1mM i Tris 50 mM ajustat a pH 7,8 amb HCl. La radioactivitat específica de la solució és 150.000 cpm/ μmol UDP-glucosa. En conclusió es suplementava el test tradicional amb florhidzina, un inhibidor de

la glucosa 6-fosfatasa, i s'augmentava el nivell de glucosa 6-fosfat present al test.

L'activitat glicogen sintasa s'expressava com a activitat específica (mU/mg proteïna), prèvia determinació de la quantitat de proteïna total, o com (mU/10⁶ Cèl·lules).

8.3. DETERMINACIÓ D'ACTIVITAT GLICOGEN FOSFORILASA

Per a la determinació de l'activitat glicogen fosforilasa, els extractes cel·lulars es preparaven en el mateix tampó i en les mateixes condicions que s'indicaven a l'apartat **8.2** per a la determinació de l'activitat glicogen sintasa.

Assaig espectrofotomètric de glicogen fosforilasa activa.

Aquest assaig consisteix en aprofitar la capacitat de la glicogen fosforilasa de degradar glicogen en presència de fosfat inorgànic. Aquesta reacció s'acobla al cicle conduït per la fosfoglucomutasa i la Glucosa 1,6-fosfatas que manté la glucosa 1-fosfat de la degradació del glicogen en equilibri amb la glucosa 6-fosfat. Finalment aquesta última és captada per la reacció acoblada de l'enzim Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa que transforma la glucosa 6-fosfat en 6-fosfogluconat reduint el cofactor NADP al mateix temps. L'aparició d'NADPH es determina espectrofotomètricament mesurant l'absorció de la barreja de reacció a 340 nm.

Els homogenats en el tampó del apartat **8.2** eren centrifugats 6 min a 13000 x *g*, a 4°C. Es recollien els sobrenedants i es mesurava l'activitat glicogen fosforilasa activa mitjançant l'ús d'un autoanalitzador tipus Cobas.BIO (Roche). Aquest aparell mitjançant un braç robotitzat barrejava 30 µl de la mostra a mesurar amb 5 µl de H₂O, més 145 µl d'una barreja de reacció que estava formada per Imidazole 50 mM ajustat a pH 7,5, NaF 50 mM, MgCl₂ 2 mM, Cafeïna 0,5 mM i glicogen 2mg/ml. Aquesta barreja també

contenia 50 µl NADP, 50 µl de glucosa 1,6-bisfosfat i 1,6 µg/ml glucosa 6-fosfat deshidrogenasa de *leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim) amb una activitat de 30 mU/ml i 0,5 ml/ml de fosfoglucomutasa (Sigma, USA). L'autoanalitzador feia una cinètica d'aparició d'NADPH i determinava l'activitat enzimàtic expressada en mU/ml.

Les activitats glicogen fosforilasa activa s'expressava com activitat específica (mU/mg de prot) després de mesurar la proteïna total (veure apartat **11.1**), o bé com mU/10⁶ cèl·lules.

8.4. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS GLUCOQUINASA I HEXOQUINASA

Per mesurar l'activitat glucoquinasa (hexoquinasa IV) i hexoquinasa, els extractes cel·lulars es van preparar en el mateix tampó i en les mateixes condicions que s'indiquen a l'apartat **8.2** per a la determinació de l'activitat glicogen sintasa.

En línies generals es va seguir el protocol descrit per Kuwajima *et al* (1986) per mesurar les diferents activitats. Aquest mètode està basat en la mesura de l'aparició de glucosa 6-fosfat com a producte de reacció de la glucoquinasa i l'hexoquinasa a partir de glucosa i ATP presents en la barreja de reacció. Mitjançant una segona reacció acoblada es mesuren els nivells de glucosa 6-fosfat. L'enzim glucosa 6-fosfat deshidrogenasa, transforma la glucosa 6-fosfat i NAD⁺ en 6-fosfogluconat i NADH. L'aparició d'NDAH es determina espectrofotomètricament mesurant l'absorció de la barreja de reacció a 340 nm.

El mètode aprofita la gran diferència d'afinitat per la glucosa que hi ha entre la glucoquinasa (hexoquinasa IV) i la resta d'hexoquinases de tal manera que es poden diferenciar les dues activitats. Les hexoquinases, més afins per la glucosa, es determinen incubant la mostra en presència de glucosa 0,5 mM com a substrat de la reacció. Es denomina activitat

hexokinasa la capacitat fosforiladora de la glucosa de la cèl·lula mesurada a 0,5 mM glucosa. Aquesta activitat engloba la de les hexoquinases I, II i III. L'activitat glucoquinasa s'obté per substracció de l'activitat hexoquinasa de l'activitat que s'observa quan la mostra s'incuba amb una concentració saturant de glucosa (100 mM), en la qual es mesuren totes les hexoquinases, incloent-hi la glucoquinasa.

Per fer aquestes mesures ens ajudàvem d'un autoanalitzador tipus Cobas.BIO (Roche). Aquest aparell mitjançant un braç robotitzat barrejava 3 µl de la mostra a mesurar amb 47 µl de H₂O, més 250 µl d'una barreja de reacció ajustada a pH 7,2 que estava formada per Tris/HCl 10 mM, ATP 6 mM, MgCl₂ 18 mM i glucosa 6-fosfat deshidrogenasa de *leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim) amb una activitat de 30 mU/ml, NAD⁺ 1,2 mM i glucosa 100 mM o 0,5 mM com a substrat de reacció. L'autoanalitzador feia una cinètica d'aparició d'NADH i determinava l'activitat enzimàtic expressada en mU/ml.

Les activitats hexoquinasa i glucoquinasa s'expressaven com activitats específiques (mU/mg de prot) després de mesurar la proteïna total (veure apartat **11.1**), o bé com mU/10⁶ cèl·lules.

8.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 6-FOSFATASA

Per determinar l'activitat glucosa 6-fosfatasa es preparaven les mostres en el mateix tampó que s'indica en l'apartat **8.2** per a la glicogen sintasa.

Mitjançant tècniques espectrofotomètriques que consisteixen en la mesura de la producció de glucosa a partir de glucosa 6-fosfat es determina l'activitat glucosa 6-fosfatasa seguint la tècnica descrita per Alegre *et al* (1988). Aquesta mesura enzimàtica es fa a través d'una reacció acoblada que mitjançant la glucosa deshidrogenasa transforma la glucosa produïda i NAD⁺ en gluconat i NADH. De tal manera que es pot fer una cinètica d'aparició

d'NADH mesurant l'absorbància a 340 nm i d'aquesta manera obtenir l'activitat de l'enzim.

L'assaig es realitzava a 30°C amb un autoanalitzador Cobas.BIO (Roche). Consistia en agafar 5 µl de la mostra, barrejar-los amb 80 µl d'una barreja de reacció ajustada a pH 6,5 que conté imidazol 100 mM, EDTA 2 mM, tampó fosfat 160 mM, NaCl 200 mM, glucosa deshidrogenasa 6,9 U/ml, mutarotasa 0,14 U/ml i NAD⁺ 3,93 mM. Es feia una preincubació de 10 minuts per consumir la glucosa present en la mostra i, posteriorment, s'hi afegia glucosa 6-fosfat a una concentració final de 50 mM per tal d'iniciar la reacció. L'autoanalitzador realitzava diverses mesures d'absorbància a 340 nm per determinar la cinètica de variació de NADH i obtenir d'aquesta manera el valor de l'activitat enzimàtica.

La activitat glucosa 6-fosfatasa s'expressava com activitat específica (mU/mg de prot) després de mesurar la proteïna total (veure apartat **11.1**), o bé com mU/10⁶ cèl·lules.

9. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS

Els metabòlits es determinaven a partir d'extractes cel·lulars d'hepatòcits en cultiu. La forma d'obtenir aquests extractes podia variar en funció del metabòlit a estudiar.

9.1 DETERMINACIÓ DE GLICOGEN

Els extractes cel·lulars es preparaven a partir de plaques de cèl·lules que es guardaven congelades a -80°C. S'afegeix 100 µl/per placa (p60) de KOH al 30 % per homogenar les cèl·lules. Les plaques es rascaven amb l'ajut d'una espàtula de plàstic. Tot aquest procés es desenvolupava sobre gel.

Els extractes alcalins es van incubar a 100°C durant 15 minuts i es va quantificar la presència de glicogen mitjançant la tècnica descrita per Chan i

Exton (1976). Els extractes es van aplicar sobre paper 31-ET (Whatman)(2cm x 2,5cm) i submergits en etanol al 66 % prèviament refredat a -20°C . Això afavoreix la precipitació del glicogen de tal manera, que queda retingut al paper. Es van fer tres rentats dels papers, un de 10 minuts i dos de 20 minuts amb etanol 66% a temperatura ambient. Tot seguit es van rentar els papers amb acetona per tal d'extreure'n l'aigua que hi podia quedar i finalment es van assecar a l'aire o bé amb l'ajut d'un microones. Els papers amb el glicogen, una vegada secs, s'introduïen en tubs als quals s'hi afegia 1ml d'una solució d'amiloglucosidasa (Sigma, USA) 25 U/l preparada en una solució tampó d'acetat de sodi 0,4 M a pH 4,8. Els tubs s'incuben a 37°C amb agitació durant 90 minuts. En aquest temps, la amiloglucosidasa hidrolitzava el glicogen donant lloc a molècules de glucosa. Es determinava la glucosa en la solució de reacció mitjançant la tècnica de l'hexoquinasa/glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (Bergmeyer, 1974), disponible en forma d'assaig comercial (*kit GlucoQuant*, Boheringer Mannheim, UE) i adaptat a l'autoanalitzador Cobas.Bio (Roche).

Els resultats s'expressaven com a μg de glicogen mg de proteïna, prèvia determinació de la quantitat de proteïna total, (veure apartat **11.1**), o bé com $\text{mU}/10^6$ cèl·lules. S'utilitza la següent conversió entre glucosa i glicogen: $\mu\text{g Glucosa} \times 0,9 = \mu\text{g Glicogen}$

9.2 DETERMINACIÓ DE GLUCOSA 6-FOSFAT

Els extractes cel·lulars es preparaven a partir de plaques de cèl·lules que es guardaven congelades a -80°C . S'afegia $100 \mu\text{l}$ /per placa (p60) de HClO_4 al 10 % per homogenar les cèl·lules. Les plaques es rascaven amb l'ajut d'una espàtula de plàstic. Tot aquest procés es desenvolupa sobre gel.

Els extractes es centrifugaven a $10.000 \times g$, 15 minuts a 4°C , i es recollia el sobrenedant. El precipitat s'incubava a 100°C durant 15 minuts amb $100 \mu\text{l}$ de KOH 30% i l'extracte resultant s'emprava per determinar la quantitat de proteïna (apartat **11.1**). El sobrenedant s'ajustava a pH 7,0, per

a la qual cosa s'utilitzava K_2CO_3 5 M. S'afegia 10 μ l de líquid indicador universal (Merck) per visualitzar els canvis de pH. La mostra es centrifugava a $10.000 \times g$ durant 15 minuts a $4^\circ C$ per tal d'eliminar el precipitat de $KClO_4$ produït en la neutralització. El sobrenedant s'emprava per determinar els nivells de glucosa 6-fosfat.

La glucosa 6-fosfat es determinava mitjançant un mètode descrit per Lang i Michal (1974), el qual es basava en la formació d'NADH mesurable a 340 nm, a través de la reacció enzimàtica que consisteix en transformar la glucosa 6-fosfat i NAD^+ en 6-fosfogluconat i NADH mitjançant la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa.

El mètode es va adaptar a un autoanalitzador tipus Cobas.Bio (Roche). El procediment agafava 80 μ l de la mostra i els barreja amb 50 μ l d'una barreja d'assaig ajustada a pH 7,4 que contenia Tris/HCl 90 mM, $MgCl_2$ 25 mM i NAD^+ 1,2 mM. La solució de reacció es preincubava 5 minuts i llavors s'afegeixen 4 μ l d'una solució comercial de glucosa 6-fosfat deshidrogenasa aïllada de *Leuconostoc mesenteroides* (Boehringer Mannheim) amb una activitat de 30 U/ml. Seguidament l'aparell mesurava l'absorció a 340 nm i ens donava un valor de concentració de glucosa 6-fosfat a la mostra.

Els resultats s'expressaven com a nmol de glucosa 6-fosfat per mg de proteïna, prèvia determinació de la quantitat de proteïna total, (veure apartat **11.1**), o bé com nmol glucosa 6-fosfat/ 10^6 cèl·lules.

9.3. DETERMINACIÓ D'UDP-GLUCOSA

Els extractes cel·lulars es preparaven a partir de plaques de cèl·lules que es guardaven congelades a $-80^\circ C$. S'afegeix 100 μ l/per placa (p60) de $HClO_4$ al 10 % per homogenar les cèl·lules. Les plaques es rascaven amb l'ajut d'una espàtula de plàstic. Tot aquest procés es desenvolupava sobre gel.

Els extractes es centrifugaven a 10.000 *xg*, 15 minuts a 4°C, i es recollia el sobrenedant. El precipitat s'incubava a 100°C durant 15 minuts amb 100 µl de KOH 30% i l'extracte resultant s'utilitzava per determinar la quantitat de proteïna (apartat **11.1**). El sobrenedant s'ajusta a pH 7,0, per a la qual cosa s'utilitzava K₂CO₃ 5 M. S'afegia 10 µl de líquid indicador universal (Merck) per visualitzar els canvis de pH. La mostra es centrifugava a 10.000 *xg* durant 15 minuts a 4°C per tal d'eliminar el precipitat de KClO₄ produït en la neutralització. El sobrenedant s'emprava per determinar els nivells de UDP-Glucosa.

La determinació d'UDP-glucosa es realitzava fent servir el mètode descrit per Keppler i Decker (1974), el qual es basava en la formació d'NADH mesurable a 340 nm a través de la reacció enzimàtica que consistia a transformar l'UDP-glucosa i NAD⁺ en UDP-gluconat i NADH mitjançant UDP-glucosa deshidrogenasa.

El mètode es va adaptar a un autoanalitzador tipus Cobas.Bio (Roche). El procediment agafava 80 µl de la mostra i els barrejava amb 50 µl d'una barreja d'assaig ajustada a pH 7,4 que contenia Tris/HCl 90 mM, MgCl₂ 25 mM i NAD⁺ 1,2 mM. La solució de reacció es preincubava 5 minuts i llavors s'afegeixen 4 µl d'una solució comercial d'UDP-glucosa deshidrogenasa (Boehringer Mannheim) amb una activitat de 30 U/ml.

Els resultats s'expressaven com a nmol/mg proteïna, la proteïna es determina segons l'apartat **11.1** o bé com a nmol / 10⁶ cèl·lules.

9.4. DETERMINACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE GLUCOSA I LACTAT

La determinació de glucosa es feia com s'ha descrit en l'apartat de determinació de glicogen. En aquest cas les mostres eren medes d'incubació recollits en el moment de finalitzar l'experiment i congelats. Per a la seva mesura les mostres es descongelaven i es procedia a determinar la

concentració del metabòlit sense més tractament. La mesura de lactat es feia a partir de mostres agafades seguint la mateixa metodologia.

Es determinava la glucosa en el medi mitjançant la tècnica de l'hexoquinasa/glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (Bergmeyer, 1974), disponible en forma d'assaig comercial (kit GlucoQuant, Boehringer Mannheim, UE) i adaptat a l'autoanalitzador Cobas.Bio (Roche). En el cas de la determinació de lactat s'usava la tècnica de la lactat deshidrogenasa (Gutmann i Wahlefeld, 1974) adaptada a l'autoanalitzador Cobas.Bio (Roche).

Els resultats s'expressaven com a μg de glucosa o μmol de lactat en el medi per mg de proteïna, prèvia determinació de la quantitat de proteïna total, (veure apartat **11.1**), o bé com $\text{mU}/10^6$ cèl·lules.

10. DETERMINACIÓ DE FLUXES METABÒLICS

10.1. INCORPORACIÓ DE [U-¹⁴C]GLUCOSA A GLICOGEN

Es van incubar els hepatòcits durant 2 hores en presència de l'efector amb [U-¹⁴C]glucosa (2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). Seguidament, es van rentar les cèl·lules amb NaCl 150 mM, i s'hi afegia NaOH 0.1 M. En aquest punt les mostres eren sonicades (es podien guardar a -20 °C amb el NaOH, fins el seu processament). Els extractes es desproteïnitzen amb una solució d'àcid tricloroacètic (10%, p/v) que contenia glicogen. Es feia precipitar el glicogen amb etanol fred sobre paper 31-ET (Whatman) i posteriorment es mesurava la radioactivitat incorporada al polisacàrid ha estat determinada com es descriu en Agius *et al* (1990).

Per a conèixer la radioactivitat específica, es comptava una alíquota del medi de cultiu (10-50 μl).

Els resultats s'expressaven en nmols de glucosa metabolitzats/2h per mg de proteïna.

11. DETERMINACIÓ I SEPARACIÓ DE PROTEÏNES

11.1. VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES. MÈTODE DE BRADFORD.

Aquest mètode esta basat en el canvi de color del blau brillant de Comassie en resposta a diferents concentracions de proteïna (Bradford, 1976). En una solució àcida, el blau brillant de Comassie, quan es lliga a proteïnes, canvia el màxim d'absorbància de 465 nm a 595 nm.

El reactiu que es va utilitzar per l'assaig era una dilució 1:5 del colorant comercialitzat per Bio-Rad (Bio-Rad *protein assay*). Com a patrons s'utilitzaven diferents dilucions de BSA (Albúmina de sèrum boví, fracció V, Sigma, USA), a partir d'una solució mare de 0,5 mg/ml.

Les mostres es diluïen en H₂O, i paral·lelament es preparava una sèrie patró a partir de BSA (0,5 mg/ml), a unes concentracions finals de 5,10,15 i 20 µg/ml. A 50 µl de les dilucions s'hi afegia 1 ml de reactiu de comassie. Després d'una incubació a temperatura ambient de 5-10 minuts es mesurava l'absorbància a 595 nm. Els resultats s'expressaven en mg de proteïna per ml.

11.2. TÈCNICA DEL WESTERN BLOT

11.2.1 Electroforesi en condicions desnaturalitzants

L'electroforesi en gel de poliàcrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és un dels mètodes més pràctics i resolutius per separar barreges de proteïnes. La tècnica fou descrita per Laemmli (1970) i posteriorment modificada per Towbin *et al* (1992), i consisteix en tractar l'extracte proteic amb un tampó

de Laemmli que conté SDS (que dona càrrega negativa a les proteïnes i en manté constant la relació càrrega/massa) i fer córrer les proteïnes en un malla del polímer acrilamida-bisacrilamida per acció d'un camp elèctric. La tècnica es basa en la separació de les proteïnes mitjançant dos tipus de gels, de diferent pH i concentració d'acrilamida, que s'apliquen consecutivament. Un primer gel concentrador de porus grans (*stacking*) i un segon gel separador de porus més petits (*running*). El primer gel facilita que totes les proteïnes de les mostres s'acumulin en una banda discreta abans d'entrar al gel separador.

Les electroforesis es va fer en gels de poliacrilamida de 10x8 cm i de 0.75 mm de gruix al 10% (p/v) d'acrilamida (sempre que no s'indiqui el contrari) emprant l'aparell d'electroforesi *miniprotean* de (Bio-Rad). Un cop homogeneïtzades les mostres, es mesurava la concentració proteica de les mateixes per tal de carregar al gel la mateixa quantitat de proteïna total. S'afegia a la mostra també de càrrega consistent en glicerol 20%(v/v), 2-mercaptoetanol 4% (v/v), blau de bromofenol 60 µg/ml i Tris/HCl 125 mM a pH 7,8, que ja teníem preparat prèviament, i s'escalfaven les mostres a 100°C durant 2 minuts. Després, s'aplicaven les mostres als porus mitjançant l'ús d'una xeringa de 10 µl (Hamilton).

Per separar les proteïnes s'aplicava una diferència de potencial de 200V i l'electroforesi durava uns 45 minuts. El tampó d'electroforesi que s'utilitzava estava format per Tris/HCl 25 mM, glicina 0,192 M, SDS al 0,2% ajustat a pH 8,3.

11.2.2. Transferència

El procés de transferència implica el traspàs i immobilització de les proteïnes presents en el gel d'acrilamida a una membrana sintètica, en aquest cas nitrocel·lulosa. D'aquesta manera es manté la resolució de la separació proteica i permet tractaments posteriors. La tècnica utilitzada va ser descrita per Gershoni i Palade (1983) i s'utilitzava el sistema de

transferència líquida de Bio-Rad. Es posaven en contacte en la membrana de nitrocel·lulosa i el gel d'acrilamida, envoltats de paper Whatman 3MM evitant la formació de bombolles. Es col·locaven en el suport de la cubeta de transferència de tal manera que el gel d'acrilamida quedava en contacte amb la zona del pol negatiu. Es creava una diferència de potencial que afavoria la transferència de les proteïnes del gel a la membrana. El tampó de transferència contenia Tris/HCl 20 mM a pH 7,0, glicina 150 mM i metanol al 20% (v/v). El procés es duia a terme a 100 V durant 30 minuts de tal manera que la intensitat no superava mai els 300 mA.

11.3 TINCIÓ AMB VERMELL DE POINCEAU

Per comprovar que la transferència de les proteïnes a la membrana s'havia fet correctament es feia un marcatge de la membrana amb vermell de Poinceau. Un colorant de proteïnes que podem eliminar fàcilment i seguir amb el tractament posterior de les membranes.

El tractament de les membranes, es va fer submergint-les en vermell de Poinceau 0,2% (v/v) en TCA 3% (p/v) i es rentaven, posteriorment, amb aigua destil·lada fins a visualitzar les bandes corresponents a la proteïna. Per eliminar el colorant, es rentava la membrana amb PBS (Tampó salí amb fosfats: fosfat de sodi 10 mM pH 7,4, i NaCl 140 mM) i Tween-20 0,05%(v/v).

11.4. IMMUNOBLOT

Aquesta era l'etapa final per visualitzar aquelles proteïnes que ens interessaven de la membrana de nitrocel·lulosa procedent d'un *Western blot*. Concretament, mitjançant l'ús d'anticossos específics contra una proteïna. Aquest procés consta de 4 etapes:

a) Bloatge de la membrana: En aquest pas s'intentava eliminar tots els centres d'unió no específics de l'anticòs primari que després utilitzàvem.

Per fer-ho incubava la membrana amb una solució de BSA (albúmina de sèrum boví) al 3%(p/v) en PBS, Tween-20 0.25% (v/v) a pH 7,4. Aquesta incubació es perllongava per espai d'una hora.

b) Incubació amb l'anticòs primari: Es va incubar la membrana amb una solució de BSA al 3%(p/v) en PBS, Tween-20 0.25% (v/v) a pH 7,4 que contenia l'anticòs específic per a la proteïna d'interès a la dilució de treball. Després d'una hora d'incubació es rentava la membrana amb 4 volums de PBS, Tween-20 0.25% (v/v) a pH 7,4 durant 10 minuts cadascun.

c) Incubació amb l'anticòs secundari: En aquesta etapa, es va utilitzar un anticòs secundari que conjugat a algun marcador ens reconeixia específicament l'espècie de l'anticòs primari i, per tant, ens permetia visualitzar on s'havia unit específicament. En aquest cas nosaltres fèiem servir anticossos secundaris conjugats a la peroxidasa de rave (Horseradish peroxidase, HRP). La membrana es va incubar en una solució de BSA 3% i Tween-20 al 0,25% en PBS que contenia l'anticòs secundari a la dilució de treball. Després de 30-45 minuts d'incubació es rentava la membrana amb 4 volums de PBS, Tween-20 0.25% (v/v) a pH 7,4 durant 10 minuts cadascun.

d) La detecció amb un mètode fotomètric: En aquesta etapa es visualitzava mitjançant l'activitat HRP de l'anticòs secundari la localització de les bandes o banda de la proteïna d'interès. S'incubava la membrana durant 2 minuts amb una solució reveladora (ECL, Amersham) i es posava a contactar amb una pel·lícula fotogràfica. Després d'un temps d'exposició es procedia a revelar el film per observar la presència de les bandes corresponents a la proteïna d'interès.

12. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Les cèl·lules sobre els cubreobjectes, després de la incubació pertinent, eren rentades amb PBS, fixades en paraformaldèhid en PBS al 4% durant 20 min, i rentades altre vegada en PBS.

Aquests cubres eren incubats en NaBH_4 (1mg/ml) durant 10 min, i després incubats amb Tritó X-100 en PBS al 0.2% (V/V). Després d'aquests processos, els cubres, eren tractats amb BSA al 3% (p/V) en PBS i tritó X-100 0.2% per bloquejar les unions no específiques.

El pas següent, era la incubació dels cubres amb l'anticòs primari durant 45 min a temperatura ambient. Es van rentar en PBS i després es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat a algun fluoròfor, o bé l'isocianat de fluoresceïna (FITC) o bé el Texas red i/o l'isocianat de tetrametilrodamina (TRITC) segons s'escaigués.

Finalment els cubres eren rentats amb PBS, aigua i etanol, eixugats a l'aire i muntats en un portaobjectes de vidre amb medi de muntatge (Immunofluore Mounting Medium, ICN).

Per tal d'examinar l'autofluorescència de cada tipus cel·lular i per determinar l'especificitat dels anticossos primaris, es van dur a terme controls mitjançant la incubació de les cèl·lules fixades només amb l'anticòs secundari.

13. MICROSCÒPIA CONFOCAL

Les imatges de microscopia confocal fluorescent van ser obtingudes amb un làser d'escaicig per microscòpia confocal Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) adaptat a un microscopi invertit Leitz DMIRBE amb un objectiu Plan-Apo 63 x (NA 1.4 oil) de Leitz. La font de llum provenia d'un làser de kriptó/argó de 75 mW. La fluorescència verda (provinent de la GFP o dels anticossos secundaris conjugats a FITC) i la fluorescència vermella (provinent dels anticossos secundaris conjugats a Texas red) van ser obtingudes amb el làser a 488 i 568 nm, respectivament. Les seccions òptiques van ser d'aproximadament 0,5 μm en tots els casos.

A

Agius, L., i Peak, M. (1993) Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem. J.* **296**: 785-796.

Agius, L., Peak, M., i Alberti, K.G. (1990) Regulation of glycogen synthesis from glucose and gluconeogenic precursors by insulin in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Biochem. J.* **266**: 91-102.

Agius, L., Peak, M., Newgard, C.B., Gómez-Foix, A.M., i Guinovart, J.J. (1996) Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* **271**: 30479-30486

Agius, L., Peak, M., i Van Schaftingen, E. (1995) The regulatory protein of glucokinase binds to the hepatocyte matrix, but, unlike glucokinase, does not translocate during substrate stimulation. *Biochem. J.* **309**: 711-713.

Aiston, S., Hampson, L., Gomez-Foix, A. M., Guinovart, J. J., i Agius, L. (2001) Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J. Biol. Chem.* **276**: 23858-66

Aiston, S., Trinh, K.Y., Lange, A.J., Newgard, C.B., i Agius, L. (1999) Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase. *J. Biol. Chem.* **274**: 24559-24566.

Alegre, M., Ciudad, C. J., Fillat, C., i Guinovart, J. J. (1988) Determination of glucose-6-phosphatase activity using the glucose dehydrogenase-coupled reaction. *Anal. Biochem.* **173**: 185-189

Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., i Whelan, W.J. (1995) A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**: 1126-1137

al-Habori, M., Peak, M., i Agius, L. (1991) Cytochalasins potently inhibit glycogen synthesis in hepatocyte cultures by an indirect mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **19**: 1125-1127.

Antinozzi, P.A., Berman, H.K., O'Doherty, R.M. i Newgard, C.B. (1999) Metabolic engineering with recombinant adenoviruses. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 511-544

Armstrong, C.G., Browne, G.J., Cohen, P., i Cohen, P.T. (1997) PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* **418**: 210-214.

Azpiazu, I., Manchester, J., Skurat, A.V., Roach, P.J. i Lawrence, J.C. (2000) Control of glycogen synthesis is shared between glucose transport and glycogen synthase in skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**: E234-E243

Azzout, B., Chanez, M., Bois-Joyeux, B., i Peret, J. (1984) Gluconeogenesis from dihydroxyacetone in rat hepatocytes during the shift from a low protein, high carbohydrate to a high protein, carbohydrate-free diet. *J. Nutrition* **114**: 2167-2178

B

Bai, G., Zhang, Z.J., Werner, R., Nuttall, F.Q., Tan, A.W. i Lee, E.Y. (1990) The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. Absence of phosphorylation sites 1a and 1b. *J. Biol. Chem.* **265**: 7843-7848

Baqué, S., Guinovart, J.J. i Gómez-Foix, A.M. (1996) Overexpression of muscle glycogen phosphorylase in cultured human muscle fibers causes increased glucose consumption and nonoxidative disposal. *J. Biol. Chem.* **271**: 2594-2598

Baqué, S., Montell, E., Guinovart, J.J., Newgard, C.B., i Gómez-Foix, A.M. (1998) Expression of glucokinase in cultured human muscle cells confers insulin-independent and glucose concentration-dependent increases in glucose disposal and storage. *Diabetes.* **47**: 1392-1398.

Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E., i Hers, H.G. (1983) Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem J.* **214**: 829-837

Barzilai, N., i Rossetti, L. (1993) Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. *J. Biol. Chem.* **268**: 25019-25025

Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gómez-Foix, A.M., Alam, T., Gerard, R.D., i Newgard, C.B. (1994) Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol.* **43**: 161-189

Bell, G.I., Burant, C.F., Takeda, J., i Gould, G.W. (1993) Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* **268**: 19161-19164.

Bergmeyer, H.U. (1974) *Methods of enzymology*, Academic Press, Inc. New York.

Berkner, K.L. (1988) Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques* **6**: 616-629

Berkner, K.L. (1992) Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**: 39-66.

Berman, H.K., O'Doherty, R.M., Anderson, P. i Newgard, C.B. (1998) Overexpression of protein targeting to glycogen (PTG) in rat hepatocytes causes profound activation of glycogen synthesis independent of normal hormone- and substrate-mediated regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **273**: 26421-26425.

Berry, M.N. i Friend, D.S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell: a biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.* **43**: 506-520.

Bollen, M., de Ruyscher, D., i Stalmans, W. (1983) On the mechanism of hepatic glycogenolysis induced by anoxia or cyanide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 1033-1039.

Bibliografia

Bollen, M., Keppens, S., i Stalmans, W. (1998) Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J.* **336**: 19-31.

Bollen, M. (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 426-431.

Bontemps, F., Hue, L. i Hers, H.G. (1974) Phosphorylation of glucose in isolated rat hepatocytes. Sigmoidal kinetics explained by the activity of glucokinase alone. *Biochem. J.* **174**: 603-611.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brady, M.J., Nairn, A.C., i Saltiel, A.R. (1997) The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J. Biol. Chem.* **272**: 29698-29703.

Brady, M.J., Printen, J.A., Mastick, C.C., i Saltiel, A.R. (1997) Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity. *J. Biol. Chem.* **272**: 20198-20204.

Brown, M.S., i Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 11041-11048.

Browner, M.F. i Fletterick, R.J. (1992) Phosphorylase: a biological transducer. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 66-71.

Burelle, Y., Fillipi, C., Peronnet, F., i Lerverve, X. (2000) Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**: E35-E42.

Byrne, M.M., Sturis, J., i Clement, K. (1994) Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J. Clin. Invest.* **93**: 1120-1130.

C

Carabaza, A., Ciudad, C.J., Baqué, S., i Guinovart, J.J. (1992) Glucose has to be phosphorylated to activate glycogen synthase, but not to inactivate glycogen phosphorylase in hepatocytes. *FEBS Lett.* **296**: 211-214.

Calder, P.C. i Geddes, R. (1986) Digestion of the protein associated with muscle and liver glycogens. *Carbohydr. Res.* **148**: 173-177.

Càrdenas, M.L. (1995) Glucokinase: Its Regulation and Role in Liver Metabolism. R.G. Landes Company. Austin.

Càrdenas, M.L., Cornish-Bowden, A., i Ureta, T. (1998) Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1401**: 242-264.

Casado, M., Bosca, L., Martin-Sanz, P. (1995) Differential regulation of the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and pyruvate kinase by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in fetal and adult hepatocytes. *J. Cell Physiol.* **165**: 630-638

Cascante, M., Boros, L.G., Comin-Anduix, B., de Atauri, P., Centelles, J.J., i Lee, P.W. (2002) Metabolic control analysis in drug discovery and disease. *Nat. Biotechnol.* **20**: 243-249.

Chan, T.M., i Exton, J.H. (1976) A rapid method for the determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes. *Anal. Biochem.* **71**: 96-105.

Cid, E., Gomis, R.R., Geremía, R.A., Guinovart, J.J., i Ferrer, J.C. (2000) Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* **275**: 33614-33621.

Ciudad, C.J., Bosch, F., i Guinovart, J.J. (1981) Insulin activation of basal hepatic glycogen synthase. *FEBS Lett.* **129**: 123-126.

Ciudad, C. J., Carabaza, A., i Guinovart, J. J. (1986) Glucose 6-phosphate plays a central role in the activation of glycogen synthase by glucose in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**: 1195-1200.

Ciudad, C.J., Massagué, J., i Guinovart, J.J. (1979) The inactivation of glycogen phosphorylase is not a prerequisite for the activation of liver glycogen synthase. *FEBS Lett.* **99**: 321-324.

Clark, D. i Haynes, D. (1988) The glycogen storage disease (gsd/gsd) rat. *Curr. Top. Cell. Regul.* **29**: 217-263.

Clore, J.N., Glickman, P.S., Nestler, J.E. i Blackard, W.G. (1991) In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA-stimulated gluconeogenesis in normal humans. *Am. J. Physiol.*, **261**: E425-E429.

Clore, J. N., Stillman, J., i Sugeran, H. (2000) Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* **49**: 969-974.

Cornish-Bowden, A. (1995) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press, London and Miami.

D

Decaux, J.F., Antoine, B., i Kahn, A. (1989) Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biol. Chem.* **264**: 11584-11590.

de la Iglesia, N., Mukhtar, M., Seoane, J., Guinovart, J.J., i Agius, L. (2000) The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J. Biol. Chem.* **275**: 10597-10603.

de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart J.J., i Ferrer, J.C. (1999) Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett.* **456**: 332-338.

Doherty, M.J., Cadefau, J., Stalmans, W., Bollen, M., i Cohen, P.T. (1998) Loss of the hepatic glycogen-binding subunit (G_L) of protein phosphatase 1 underlies deficient glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic rats and in adrenalectomized starved rats. *Biochem J.* **15**: 253-257.

F

Fasshauer, M., Klein, J., Kriauciunas, K.M., Ueki, K., Benito, M., i Kahn, C.R. (2001) Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 319-329.

Fell, D.A. (1992) Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem. J.* **286**: 313-330.

Fernàndez-Novell, J.M., Bellido, D., Vilaró, S., i Guinovart, J.J. (1997) Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **321**: 227-231.

Fernàndez-Novell, J.M., Roca, A., Bellido, D., Vilaró, S., i Guinovart, J.J. (1996) Translocation and aggregation of hepatic glycogen synthase during the fasted-to-refed transition in rats. *Eur. J. Biochem.* **238**: 570-575.

Fernàndez-Novell, J.M., Ariño, J., i Guinovart, J.J. (1994) Effects of glucose on the activation and translocation of glycogen synthase in diabetic rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **226**: 665-671.

Fernàndez-Novell, J.M., Ariño, J., Vilaró, S., Bellido, D., i Guinovart, J.J. (1992) Role of glucose 6-phosphate in the translocation of glycogen synthase in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **288**: 497-501.

Ferrannini, E., Bjorkman, O., Reichard, G.A. Jr, Pilo, A., Olsson, M., Wahren, J., i DeFronzo, R.A. (1985) The disposal of an oral glucose load in healthy subjects. A quantitative study. *Diabetes.* **34**: 580-588.

Bibliografia

Ferrer, J.C., Baqué, S., i Guinovart, J.J. (1997) Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose. *FEBS Lett.* **415**: 249-252.

Fong, N.M., Jensen, T.C., Shah, A.S., Parekh, N.N., Saltiel, A.R., i Brady, M.J. (2000) Identification of binding sites on protein targeting to glycogen for enzymes of glycogen metabolism. *J. Biol. Chem.* **275**: 35034-35039.

Froguel, P., Vaxillaire, M., i Sun, F. (1992) Close linkage of glucose kinase locus on chromosome 7p to early-onset noninsulin dependent diabetes mellitus. *Nature* **36**: 162-164.

G

García-Rocha, M., Roca, A., de La Iglesia, N., Baba, O., Fernández-Novell, J.M., Ferrer, J.C., i Guinovart, J.J. (2001) Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* **357**: 17-24.

Gasa, R., Jensen, P.B., Berman, H.K., Brady, M.J., DePaoli-Roach, A.A., i Newgard, C.B. (2000) Distinctive regulatory and metabolic properties of glycogen-targeting subunits of protein phosphatase-1 (PTG, GL, GM/RGI) expressed in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 26396-26403.

Gerin, I., Veiga-da-Cunha, M., Achouri, Y., Collet, J.F., i Van Schaftingen, E. (1997) Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib. *FEBS Lett.* **419**: 235-238.

Gershoni, J.M., i Palade, G.E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**: 1-15.

Gluzman, Y., Reich, H. i Solnick, D. (1982) Helper free adenovirus type 5 vectors, pp 187-192 in *Eukariotic viral vectors*, edited by Y. Gluzman. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Gomez-Foix, A. M., Coats, W. S., Baque, S., Alam, T., Gerard, R. D., i Newgard, C. B. (1992) Adenovirus-mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene

into hepatocytes confers altered regulation of glycogen metabolism. *J. Biol. Chem.* **267**: 25129-25134.

Gomis, R.R., Cid, E., Garcia-Rocha, M., Ferrer, J.C., i Guinovart, J.J. (2002) Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase. *J. Biol. Chem.* n^o Manuscrit: **M111208200**

Gomis, R.R., Ferrer, J.C., i Guinovart, J.J. (2000) Shared control of hepatic glycogen synthesis by glycogen synthase and glucokinase. *Biochem. J.* **351**: 811-816.

Graham, F.L. i Prevec, L. (1995) Methods for construction of adenovirus vectors *Mol Biotechnol.* **3**: 207-220.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., i Nairn, R. (1977) Characteristics of human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**: 59-74.

Graham, F.L. i Van der Erb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenoviruses 5 DNA. *Virology* **52**: 456.

Groen, A. K., van Roermund, C. W., Vervoorn, R. C., i Tager, J. M. (1986) Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochem. J.* **237**: 379-389.

Guinovart J.J., Gomez-Foix A.M., Seoane J., Fernández-Novell J.M., Bellido D., i Vilaró, S. (1997) Bridging the gap between glucose phosphorylation and glycogen synthesis in the liver. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 157-160.

Gustafson, L.A., Jumelle-Laclau, M.N., van Woerkom, G.M., van Kuilenburg, A.B.P., i Meijer, A.J. (1997) Cell swelling and glycogen metabolism in hepatocytes from fasted rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**: 184-190.

Gutmann, I., i Wahlefeld, A.W. (1974) L-(+)-Lactate determination with Lactate Dehydrogenase and NAD. *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed) Vol. 3, pp. 1464-1468, Academic Pres, Inc., New York

H

Howard, R.B., i Pesch, L.A. (1968) Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver. *J. Biol. Chem.* **243**: 3105-3109.

Horwitz, M.S. (1990) pp. 1679-1721 in *Virology*, edited by Fields, B.N. i Knipe, D. M.. Raven, New York.

Hue, L., i Bartrons, R. (1985) In regulation of carbohydrate metabolism. P. Beitner, ed CRC Press, New York. Vol1: pp. 29-44.

I

Iynedjian, P.B., Ucla, C., i Mach, B. (1987) Molecular cloning of glucokinase cDNA. Developmental and dietary regulation of glucokinase mRNA in rat liver. *J. Biol. Chem.* **262**: 6032-6038.

Iynedjian, P. B. (1993) Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem. J.* **293**: 1-13.

J

Jahoor, F., Peters, E.J., i Wolfe, R.R. (1990) The relationship between gluconeogenic substrate supply and glucose production in humans. *Am. J. Physiol.* **258**: E288-E296.

Jitrapakdee, S., i Wallace, J.C. (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **340**: 1-16.

Jurado, L.A., Song, S., Roesler, W.J., i Park, E.A. (2002) Conserved amino acids within CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPalpha and beta) regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression. *J. Biol. Chem.* En premsa. Manuscrit: **M201429200**.

K

Kacser, H., i Burns, J.A. (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**: 65-104.

Kacser, H., i Burns, J.A. (1979) Molecular democracy: who shares the controls? *Biochem. Soc. Trans.* **7**: 1149-1160.

Katz, J., Golden, S., i Wals, P.A. (1979) Glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **180**: 389-402.

Katz, J., i Mc Garry, J. D. (1984) The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism? *J. Clin. Invest.* **74**: 1901-1909.

Keppler, D. i Decker, K. (1974). Uridine-5'-diphosphoglucose. *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed) Vol. 3, pp. 2225-2228, Academic Press, -Inc. New York

Killary, A.M., i Fournier, R.E. (1984) A genetic analysis of extinction: trans-dominant loci regulate expression of liver-specific traits in hepatoma hybrid cells. *Cell.* **38**: 523-534.

Kozack, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8148.

Kozack, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**: 947-950.

Kuwajima, M., Newgard, C.B., Foster, D. W., i McGarry, J.D. (1986) The glucose-phosphorylating capacity of liver as measured by three independent assays. Implications for the mechanism of hepatic glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* **261**: 8849-8853.

L

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

Bibliografia

Lomako, J., Lomako, W.M., i Whelan, W.J. (1988) A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *Faseb J.* **2**:3097-3103.

Lang, G. i Michal, G. (1974) D-Glucose-6-phosphate and D-Fructose-6-phosphate. *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed) Vol. 3, pp. 1238-1242, Academic Press, New York.

Lavoigne, A., Baquet, A. i Hue, L. (1987) Stimulation of glycogen synthesis and lipogenesis by glutamine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **284**: 429-437.

Leloir, L.F., i Cardini, C.E. (1957) Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose¹. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 6340-6341.

Ljungstrom, O., Hjelmquist, G., i Engstrom, L. (1974) Cyclic 3',5'-AMP-stimulated and non-stimulated phosphorylation of protein fractions from rat-liver cell sap on incubation with (γ -³²P)ATP. *Biochem. Biophys. Acta.* **358**: 289-298.

Low, S.Y., Rennie, M.J., i Taylor, P.M. (1997) Involvement of integrins and the cytoskeleton in modulation of skeletal muscle glycogen synthesis by changes in cell volume. *FEBS Lett.* **417**: 101-103.

M

Manchester, J., Skurat, A.V., Roach, P., Hauschka, S.D., i Lawrence, J.C. (1996) Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10707-10711.

Massagué, J., i Guinovart, J.J. (1977) Insulin control of rat hepatocyte glycogen synthase and phosphorylase in the absence of glucose. *FEBS Lett.* **82**: 317-320.

Massillon, D. (2001) Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Differential effect of glucose and xylitol. *J. Biol. Chem.* **276**: 4055-4062.

Massillon, D., Bollen, M., De Wulf, H., Overloop, K., Vanstapel, F., Van Hecke, P., i Stalmans, W. (1995) Demonstration of a glycogen/glucose 1-phosphate cycle in

hepatocytes from fasted rats. Selective inactivation of phosphorylase by 2-deoxy-2-fluoro-alpha-D-glucopyranosyl fluoride. *J. Biol. Chem.* **270**: 19351-19356.

Matschinsky, F.M. (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* **39**: 647-652.

McGrory, W.J., Bautista, D.S., i Graham, F.L. (1988) A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology.* **163**: 614-617.

Meléendez, R., Meléndez-Hevia, E., i Canela, E.I. (1999) The fractal structure of glycogen: A clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys. J.* **77**: 1327-1332.

Mendez, R., Myers, M. G. Jr, White, M. F. i Rhoads, R. E. (1996) Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2857-2864.

Miller, S.P., Gulshan, R.A., Karschina, E.J., Bell, G.I., LaPorte, D.C., i Lange, A.J. (1999) Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2). Different glucokinase defects lead to a commonphenotype. *Diabetes* **48**: 1645-1651.

Minassian, C., Daniele, N., Bordet, J.C., Zitoun, C., i Mithieux, G. (1995) Liver glucose-6 phosphatase activity is inhibited by refeeding in rats. *J. Nutr.* **125**: 2727-2732.

Mithieux, G., Vidal, H., Zitoun, C., Bruni, N., Daniele, N., i Minassian, C. (1996) Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes* **45**: 891-896.

Mourrieras, F., Foufelle, F., Foretz, M., Morin, J., Bouche, S., i Ferre, P. (1997) Induction of fatty acid synthase and S14 gene expression by glucose, xylitol and dihydroxyacetone in cultured rat hepatocytes is closely correlated with glucose 6-phosphate concentrations. *Biochem. J.* **326**: 345-349.

Mukhtar, M., Stubbs, M., i Agius, L. (1999) Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS Lett.* **462**: 453-458.

N

Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., i Accili, D. (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest.* **108**: 1359-1367.

Newgard, C.B., Brady, M.J., O'Doherty, R.M., i Saltiel, A.R. (2000) Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes.* **49**: 1967-1977.

Newgard, C. B., Hirsch, L. J., Foster, D. W., i Mc Garry, J. D. (1984) Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway? *J. Biol. Chem.* **258**: 8046-8042.

Neely, P., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, S.J. i Claus, T.H. (1981) Effect of diabetes, insulin, starvation, and refeeding on the level of rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate. *Diabetes* **30**: 1062-1064.

Newsholme, E.A., i Start, C. (1973) Regulation in Metabolism *J. Wiley & sons, eds.* London, Capítol 3.

Niewoehner, C.B., Gilboe, D.P., i Nuttall, F.Q. (1984) Metabolic effects of oral glucose in the liver of fasted rats. *Am. J. Physiol.* **246**: E89-E94.

Nordlie, R.C., Foster, J.D., i Lange, A.J. (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 379-406.

Nuttall, F.Q., Gannon, M.C., i Larner, J. (1972) Oral glucose effect on glycogen synthetase and phosphorylase in heart. Muscle and liver. *Physiol. Chem. Phys.* **4**: 497-415.

O

O'Doherty, R.M., Jensen, P.B., Anderson, P., Jones, J.G., Berman, H.K., Kearney, D., i Newgard, C.B. (2000) Activation of direct and indirect pathways of glycogen synthesis by hepatic overexpression of protein targeting to glycogen. *J. Clin. Invest.* **105**: 479-488.

O'Doherty, R.M., Lehman, D.L., Seoane, J., Gomez-Foix, A.M., Guinovart, J.J., i Newgard, C.B. (1996) Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 20524-20530.

Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Riera, L., Bartrons, R., i Lange, A.J. (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 30-35.

Orho, M., Bosshard, N.U., Buist, N.R., Gitzelmann, R., Aynsley-Green, A., Blumel, P., Gannon, M.C., Nuttall, F.Q., i Groop, L.C. (1998) Mutations in the liver glycogen synthase gene in children with hypoglycemia due to glycogen storage disease type 0. *J. Clin. Invest.* **102**: 507-515.

P

Pilkis, S.J., i Granner, D.K. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 885-909.

Polakis, P.G., i Wilson, J.E. (1985) An intact hydrophobic N-terminal sequence is critical for binding of rat brain hexokinase to mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **236**: 328-337.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A.D., i Magnuson, M.A. (1999) Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**: 305-315.

Printen, J.A., Brady, M.J., i Saltiel, A.R. (1997) PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science*. **275**: 1475-1478.

R

Radziuk, J. (1982) Source of carbon in hepatic glycogen synthesis during absorption of an oral glucose load in humans. *Fed. Proc.* **41**: 88-90.

Radziuk, J., i Pye, S. (2001) Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **17**: 250-272.

Roach, P.J. (1986) *Enzymes*, 3rd Edition, **17**: 499-539.

Roach, P.J. (1990) Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. *FASEB J.* **4**: 2961-2968.

Roach, P.J., Cao, Y., Corbett, C.A., DePaoli-Roach, A.A., Farkas, I., Fiol, C.J., Flotow, H., Graves, P.R., Hardy, T.A., Hrubey, T.W., *et al* (1991) Glycogen metabolism and signal transduction in mammals and yeast. *Adv. Enzyme Regul.* **31**: 101-120.

Roach, P.J., Cheng, C., Huang, D., Lin, A., Mu, J., Skurat, A.V., Wilson, W., i Zhai, L. (1998) Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **9**:139-151.

Ros-Baro, A., Lopez-Iglesias, C., Peiro, S., Bellido, D., Palacin, M., Zorzano, A., i Camps, M. 2001 Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 12050-12055.

Rutledge, S.L., Atchison, J., Bosshard, N.U., i Steinmann, B. (2001) Case report: liver glycogen synthase deficiency-a cause of ketotic hypoglycemia. *Pediatrics* **108**: 495-497.

S

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., i Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**: 680-685.

Saltiel, A. R. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. **104**: 517-529.

Saltiel, A.R., i Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. **414**: 799-806.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., i Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Seglen, P.O. (1973) Glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver cells. *FEBS Lett*. **30**: 25-28.

Seoane, J., Barberà, A., Telemaque-Potts, S., Newgard, C.B., i Guinovart, J.J. (1999) Glucokinase overexpression restores glucose utilization and storage in cultured hepatocytes from male Zucker diabetic fatty rats. *J. Biol. Chem*. **274**: 31833-31838.

Seoane, J., Gómez-Foix, A.M., O'Doherty, R.M., Gómez-Ara, C., Newgard, C.B., i Guinovart, J.J. (1996) Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *J. Biol. Chem*. **271**: 23756-23760.

Seoane, J., Trinh, K., O'Doherty, R.M., Gómez-Foix, A.M., Lange, A.J., Newgard, C.B., i Guinovart, J.J. (1997) Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J. Biol. Chem*. **272**: 26972-26977.

Shikama, H., i Ui, M. (1978) Glucose load diverts hepatic glucogenic product from glucose to glycogen in vivo. *Am. J. Physiol.* **235**: E354–E360.

Skurat, A.V., Lim, S.S., i Roach, P.J. (1997) Glycogen biogenesis in rat 1 fibroblasts expressing rabbit muscle glycogenin. *Eur. J. Biochem.* **245**: 147-155.

Skurat, A.V., Wang, Y., i Roach, P.J. (1994) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* **269**: 25534-25542.

Skurat, A.V., Dietrich, A.D., Zhai, L., i Roach, P.J. (2002) GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* (En prensa) N°: 11916970.

Smythe, C., i Cohen, P. (1991) The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* **200**: 625–631.

Stalmans, W., Bollen, M., i Mvumbi, L. (1987) Control of glycogen synthesis in health and disease. *Diabetes/metab. Rev.* **3**: 127-161.

Stalmans, W., De Wulf, H., Hue, L., i Hers, H.G. (1974) The sequential inactivation of glycogen phosphorylase and activation of glycogen synthetase in liver after the administration of glucose to mice and rats. The mechanism of the hepatic threshold to glucose. *Eur. J. Biochem.* **41**: 117-134.

Start, C., i Newsholme, E.A. (1970) A switch mechanism in the regulation of glycolysis and gluconeogenesis in rat liver. *FEBS Lett.* **6**: 171-173.

Stoffel, M., i Duncan, S.A. (1997) The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **94**: 13209-13214.

Streeper, R.S., Svitek, C.A., Chapman, S., Greenbaum, L.E., Taub, R., i O'Brien, R. M. (1997) A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* **272**: 11698-11701.

Souza, D.W., i Armentano, D. (1999) Novel cloning method for recombinant adenovirus construction. *Biotechniques* **26**: 502-508.

T

Thomas, J.A., Schlender, K.K., i Lerner, J. (1968) A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. *Anal. Biochem.* **25**: 486-499.

Thorens, B., Cheng, Z.Q., Brown, D., i Lodish, H.F. (1990) Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am. J. Physiol.* **259**: C279-C258.

Trinh, K., Minassian, C., Lange, A. J., O'Doherty, R. M., i Newgard, C. B. (1997) Adenovirus-mediated expression of the catalytic subunit of glucose-6-phosphatase in INS-1 cells. Effects on glucose cycling, glucose usage, and insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **272**: 24837-24842.

Trinh, K. Y., O'Doherty, R. M., Anderson, P., Lange, A. J., i Newgard, C. B. (1998) Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J. Biol. Chem.* **273**: 31615-31620.

Tobwin, H., Staehelin, T., i Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* **24**: 145-149.

Topper, Y.T., i Hastings, A.B. (1949) A study of the chemical origin of glycogen by use of C¹⁴-labeled carbon dioxide, acetate and pyruvate. *J. Biol. Chem.* **179**: 1255-1264.

Towle, H.C. (1995) Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J. Biol. Chem.* **270**: 23235-23238.

V

Valera, A., i Bosch, F. (1994) Glucokinase expression in rat hepatoma cells induces glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization. *Eur. J. Biochem.* **222**, 533-539.

van Dijk, T. H., van Der Sluijs, F. H., Wiegman, C. H., Baller, J. F, Gustafson, L. A., Burger, H. J., Herling, A. W., Kuipers, F., Meijer, A. J., i Reijngoud, D. J. (2001) Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative S4048. *J. Biol. Chem.* **276**, 25727-25735.

Vandercammen, A., i Van Schaftingen, E. (1995) Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase *Biochem. J.* **294**, 551-556.

Van Schaftingen, E. (1989) A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate *Eur. J. Biochem.* **179**: 179-184.

Van Schaftingen, E., Detheux, M., i Veiga da Cunha, M. (1994) Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *Faseb J.* **8**: 414-419.

van de Werve, G., Lange, A., Newgard, C., Mechin, M. C., Li, Y., i Berteloot, A. (2000) New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1533-1549.

Velho, G., Petersen, K.F., Perseghin, G., Hwang, J.H., Rothman, D.L., Pueyo, M.E., Cline, G.W., Froguel, P., i Shulman, G.I. (1996) Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) Subjects. *J. Clin. Invest.* **98**, 1755-1761.

Villar-Palasi, C., i Guinovart, JJ. (1997) The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB J.* **7**, 544-558.

W

Watson, R.T., i Pessin, J.E. (2001) Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp. Cell. Res.* **271**:75-83.

Wilson, J.E. (1995) Hexokinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **126**, 65-198.

Wilson, J.E. (1998) Distinguishing the type I and type II isozymes of hexokinase: the need for a reexamination of past practice. *Diabetes.* **47**, 1544-1548.

Wood, H.G., Lifson, N., i Lorber, V. (1945) The position of fixed carbon in glucose from rat liver glycogen. *J. Biol. Chem.*, **159**, 475-489.

Y

Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., Newgard, C.B., i Spiegelman, B.M. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131-138.

Z

Zvibel, I., Fiorino, A.S., Brill, S., i Reid, L.M. (1998) Phenotypic characterization of rat hepatoma cell lines and lineage-specific regulation of gene expression by differentiation agents. *Differentiation.* **63**, 215-223.

Part dels resultats presentats en aquesta memòria han estat publicats:

- Gomis, R.R., Ferrer, J.C. i Guinovart, J.J. (2000) Shared control of hepatic glycogen synthesis by glycogen synthase and glucokinase. *Biochem J.* **351**: 811-816.
- Gomis, R.R., Cid, E., Garcia-Rocha, M., Ferrer, J.C. i Guinovart, J.J. (2002) Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase. *J. Biol. Chem.* **277**: 23246-52