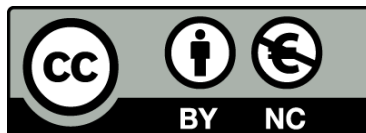




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Metabolisme i funció de la fructosa 2 6-bisfosfat en el teixit cerebral

Francesc Ventura Pujol



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License](#).

Universitat de Barcelona

Metabolisme i funció de la fructosa 2,6-bisfosfat en el
teixit cerebral

Tesi presentada per
Francesc Ventura Pujol
per optar al grau de
Doctor en Ciències Químiques



Aquesta tesi ha estat dirigida pel Dr. Ramon Bartrons Bach a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Octubre 1992.

INDEX

<u>Presentació i objectius</u>	1
<u>Capítol 1: Metabolisme hidrocarbonat cerebral</u>	3
Elements cel·lulars del sistema nerviós	5
Transport a través de la barrera hematoencefàlica	8
Rutes del metabolisme hidrocarbonat cerebral	12
Regulació del metabolisme hidrocarbonat cerebral	17
<u>Capítol 2: Funció de la fructosa 2,6-bisfosfat en la regulació del metabolisme hidrocarbonat cerebral</u>	27
Fructosa 2,6-bisfosfat	29
Metabolisme cerebral durant la isquèmia	32
Funció de la fructosa 2,6-bisfosfat durant la isquèmia	34
Lesions neuronals selectives: hipòtesi excitotòxica	40
Metabolisme cerebral durant la hipoglucèmia	41
Funció de la fructosa 2,6-bisfosfat durant la hipoglucèmia	44
Metabolisme cerebral durant la diabetis i el dejuni	48
Funció de la fructosa 2,6-bisfosfat durant el dejuni i la diabetis	51
Metabolisme cerebral durant el desenvolupament	55
Funció de la fructosa 2,6-bisfosfat durant el desenvolupament	58
<u>Capítol 3: Caracterització de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral</u>	61
Isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2	63
PFK-2/FBPasa-2 cerebral	
Caracterització molecular de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral	68
Fosforil·lacions per PKA i PKC de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral	76
Propietats cinètiques de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral	79

<u>Capítol 4: Clonatge parcial i expressió de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral</u>	81
Expressió dels gens de la PFK-2/FBPasa-2	
Estructura i expressió dels gens de la PFK-2/FBPasa-2	83
Possibles vies evolutives de la PFK-2/FBPasa-2	86
Expressió de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral	87
Clonatge del cDNA de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral	
Aïllament de clons de cDNA	89
Anàlisi de la seqüència del cDNA del clon B82	90
Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids codificada pel cDNA del clon B82	92
<u>Discussió general i perspectives</u>	97
<u>Conclusions</u>	105
<u>Bibliografia</u>	109
<u>Publicacions</u>	129
<u>Abreviatures</u>	157

Presentació i objectius

El cervell representa aproximadament el 3% del pes corporal d'un adult normal i consumeix el 20% del total de glucosa i oxigen que utilitza l'organisme. La glucosa és el substrat energètic més important, aportant un 90% de l'energia total consumida per aquest òrgan (Drewes & Gilboe, 1973; McIlwain & Bachelard, 1985; Siebert *et al.*, 1986; Sokoloff, 1989). Les reserves de carbohidrats en el cervell són relativament baixes i sols poden compensar durant uns minuts les seves necessitats energètiques. El cervell és, per aquest motiu, totalment depenent del subministrament continu de glucosa des del torrent sanguini. En condicions normals, la capacitat de transport de glucosa a través de la barrera hemato-encefàlica, en el sentit de circulació sanguínea cap al cervell, és 3 vegades superior a la velocitat de fosforil·lació de la glucosa per l'hexoquinasa cerebral (Lund-Andersen, 1979). Si l'entrada de glucosa en les cèl·lules del teixit cerebral no és un pas limitant en el metabolisme d'aquest teixit, el control de l'oxidació dels carbohidrats haurà d'efectuar-se en les reaccions enzimàtiques considerades reguladores de la glucolisi (Lowry & Passonneau, 1964; Drewes & Gilboe, 1973; Kintner *et al.*, 1980).

El control de la glucolisi cerebral és exercit fonamentalment a través de la regulació de l'hexoquinasa, la 6-fosfofructo-1-quinasa i la piruvat quinasa, en addició al control del transport de glucosa que, en algunes condicions com l'anòxia i la hipoglucèmia, pot ser un factor limitant (Lund-Andersen, 1979). Diferents autors (Lowry and Passonneau, 1964; Ruderman *et al.*, 1974; Gorell *et al.*, 1977; Kintner *et al.*, 1980; Ogushi *et al.*, 1990) han postulat que el punt limitant i regulador de la glucolisi cerebral és a nivell de la PFK-1. Aquest enzim és modulats per diversos efectors i representa un exemple paradigmàtic d'enzim multimodulat (Sols, 1981).

La fructosa 2,6-bisfosfat és l'activador alostèric més potent de la 6-fosfofructo-1-quinasa i inhibidor de la fructosa 1,6-bisfosfatasa, realitzant un paper important en la regulació de la glucolisi/gluconeogènesi hepàtica (Hue & Barrons, 1985). La seva síntesi i degradació estan catalitzades per la 6-fosfofructo-2-quinasa i la fructosa 2,6-bisfosfatasa respectivament (Van Schaftingen, 1987; Hue & Rider, 1987; Pilkis & El-Maghrabi, 1988). Ambdues activitats estan situades a diferents dominis de la mateixa proteïna. Aquest enzim bifuncional integra senyals metabòlics i hormonals per mitjà de modificadors alostèrics, processos de fosforil·lació/defosforil·lació i diversos factors de transcripció que regulen la seva expressió (Van Schaftingen, 1987; Hue & Rider, 1987; Pilkis & El-Maghrabi, 1988; Colosia *et al.*, 1988; Marker *et al.*, 1988; Wall *et al.*, 1989; Pilkis, 1991; Cifuentes *et al.*, 1991).

El metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat en el cervell i el seu possible paper regulador sobre la glucolisi cerebral no havien estat estudiats fins el moment. Dades prèvies indicaven que la fructosa 2,6-bisfosfat era present en cervell de rata (Kuwajima & Uyeda, 1982) i en astròcits i neurones en cultiu (Pauwels & Trouet, 1984). A més, hi havia dades que demostraven que, d'una forma semblant a d'altres teixits, era un potent activador de la 6-fosfofructo-1-quinasa cerebral (Foe & Kemp, 1985; Vora *et al.*, 1985; Dunaway *et al.*, 1988).

En base a aquestes dades ens vam plantejar un estudi més exhaustiu del possible paper regulador de la fructosa 2,6-bisfosfat sobre el metabolisme energètic cerebral i, al mateix temps, de la propia regulació del metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat en el teixit cerebral. Amb aquesta finalitat ens vam proposar els següents objectius:

- 1.- Estudi del paper de la fructosa 2,6-bisfosfat en el control del flux glucolític cerebral.
 - 1.1 - Paper de la fructosa 2,6-bisfosfat en situacions d'interrupció aguda de l'aport de substrats energètics al cervell.
 - 1.2 - Paper de la fructosa 2,6-bisfosfat en situacions d'aport de substrats energètics alternatius al cervell.
 - 1.3 - Estudi del metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat durant el desenvolupament.

- 2.- Regulació del metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat.
 - 2.1 - Purificació i caracterització de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa cerebral.
 - 2.2 - Clonatge i expressió de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa cerebral.

Capítol 1:

Metabolisme hidrocarbonat cerebral

ELEMENTS CEL·LULARS DEL SISTEMA NERVIÓS

El cervell és, sens dubte, el teixit de l'organisme amb estructura i funcions més complexes. Això fa que molts aspectes de la seva organització, estructura i funció ens siguin en bona part desconeguts fins el moment. Les funcions del cervell no sols s'expressen en comportaments motors com caminar, respirar o somriure sinó que van més enllà en comportaments de tipus cognitiu o afectiu com són l'aprenentatge, la memòria o els sentiments.

El cervell humà és una estructura relativament petita que pesa aproximadament 1.400 grams i constitueix tan sols el 2% del pes corporal total. Aquesta estructura es troba rodejada interna i externament pel líquid cefaloraquídi. Aquest líquid té un paper molt important en la protecció mecànica i en el balanç d'electrolits entre el medi extracel·lular i el torrent sanguini. El cervell es troba dividit en diverses àrees amb estructura i funcions ben diferenciades. En totes elles trobem una varietat de tipus cel·lulars fortament interrelacionats. Els tipus cel·lulars bàsics del sistema nerviós són les neurones i les cèl·lules glials.

Neurones.- Les neurones són les cèl·lules responsables dels processos de processament i transferència d'informació. Tota neurona genera un impuls elèctric en resposta a un estímul químic o mecànic, el condueix al llarg de la seva membrana i, en els seus terminals presinàptics, converteix aquest impuls elèctric o potencial d'acció en un senyal químic. Una neurona típica presenta quatre regions morfològicament diferenciades: el cos cel·lular, les dendrites, l'axó i els terminals presinàptics.

El cos cel·lular és el centre metabòlic de la neurona, conté el nucli i la major part dels orgànuls de síntesi de RNA i proteïnes. Del cos cel·lular emergeixen les dendrites i l'axó. Una neurona té normalment varies dendrites mentre que sols té un axó. Les dendrites, que poden oscil·lar en número entre una i varies dotzenes, es poden bifurcar de forma que poden arribar a cobrir una àrea de 2-3 mm³ per neurona (Schwartz, 1991). Les dendrites i el cos cel·lular representen la zona d'entrada dels senyals, ja siguin de caràcter excitatori o inhibitori. Aquests senyals, un cop processats, seran transmesos elèctricament al llarg de l'únic axó neuronal. L'axó es troba envoltat de varies capes concèntriques de mielina. Les capes de mielina tenen com a funció l'aïllament de la membrana axonal i permetre la conducció dels potencials d'acció a alta velocitat. La capa de mielina està formada per certs tipus de cèl·lules glials que envolten la neurona. Al final de l'axó, aquest es divideix en branques que acaben en uns eixamplaments anomenats

terminals presinàptics. Són els elements de transmissió de la neurona. En ells l'impuls elèctric condueix a l'alliberament d'un transmissor químic, que serà captat, en el sistema nerviós central, en els centres receptius situats en les dendrites i cossos cel·lulars d'altres neurones.

Aquestes unions entre terminals axonals i botons receptius s'anomenen sinapsis. Les sinapsis poden ser de diversos tipus depenent del neurotransmissor implicat: excitadores, inhibidores i moduladores. Les sinapsis són, en termes d'informació, els elements del sistema nerviós. Es calcula que en el cervell hi ha unes 10^{11} neurones. Donat que cada neurona es calcula que té un promig d'uniques 1000 sinapsis tindrem aproximadament unes 10^{14} (cent bilions) de sinapsis (Hubel, 1980).

L'anatomia i compartimentació de funcions en les neurones implica l'existència d'un transport intracel·lular de molècules i orgànuls des del cos neuronal cap als terminals nerviosos (flux anterograd) i a l'inversa (flux retrograd). Aquest transport es diferencia segons la seva velocitat. Els processos lents (1-3 mm/dia) són desplaçaments massius del citoplasma, mentre els processos ràpids (50-500 mm/dia) suposen un transport organitzat. Les molècules nutritives essencials i les proteïnes un cop sintetitzades segueixen un flux anterograd mentre el flux retrograd es utilitza per molècules que, o han de ser degradades o transmeten informació des dels terminals cap al cos cel·lular (Bradford, 1986).

Neuroglia.- Les cèl·lules glials no formen sinapsis ni condueixen potencials d'acció. Malgrat això, el seu nombre supera en un factor de 10 el nombre de neurones presents al cervell (Berne and Levy, 1988) i tenen funcions específiques de suport a les neurones entre les que destaquen: 1) formar una matriu que actua de suport mecànic per a les neurones, 2) producció de l'envoltura de mielina dels axons neuronals, 3) inactivació de neurotransmissors per recaptació del medi extracel·lular, 4) cooperació amb les neurones en activitats metabòliques i nutritives, 5) regulació del transport de les substàncies des del torrent circulatori, 6) control de la composició iònica del medi extracel·lular, 7) eliminació de residus cel·lulars després de situacions de mort cel·lular (Bradford, 1986).

S'han descrit cinc tipus bàsics de cèl·lules glials en el sistema nerviós: astròcits, oligodendròcits, cèl·lules endimàries, cèl·lules microglials i cèl·lules d'Schwann (Figura 1.1).

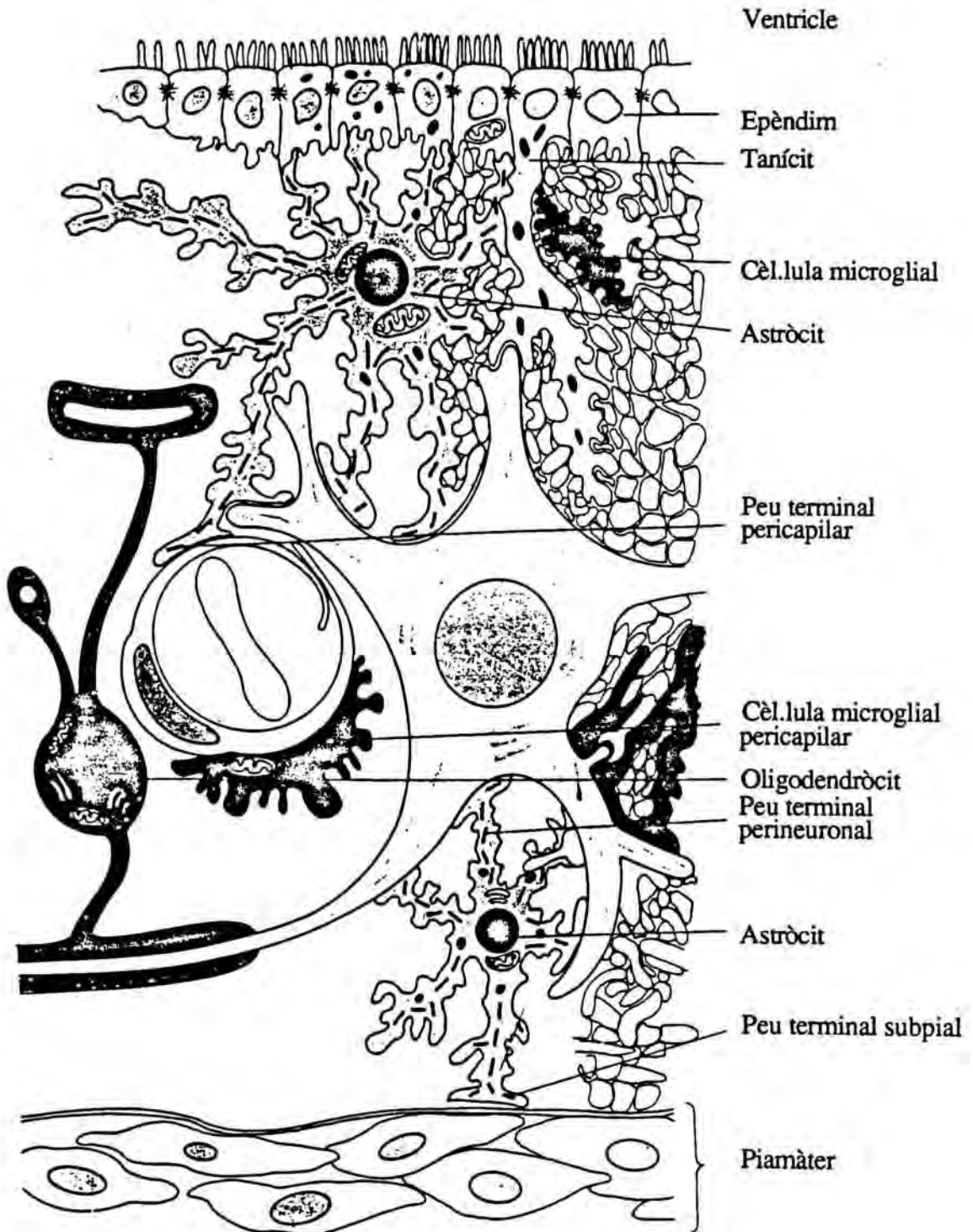


Figura 1.1.- Tipus cel·lulars del sistema nerviós central.

Adaptada de Bradford (1986). Es poden observar les cel·lules glials en gris. S'aprecien dos astròcits dirigits cap un cos neuronal i unes dendrites. L'astròcit superior contacte també amb un cos capilar i l'inferior s'expandeix cap a la piamàter. Un oligodendròcit ofereix una vaina de mielina a un axó. També es poden veure dues cel·lules microgials, una d'elles propera a un capilar.

Astròcits.- El seu nom procedeix de les prolongacions membranoses que presenten. Aquestes prolongacions connecten els vasos sanguinis amb les neurones per la qual cosa se'ls suggereix una funció nodridora i de control del medi extracel.lular. Aquestes prolongacions a més indueixen en les cèl.lules endotelials la formació de la barrera hematoencefàlica.

Oligodendròcits.- Es troben entre els axons mielïnats i són els responsables de la formació de l'envoltura de mielina en les neurones del cervell i la medul.la espinal.

Cèl.lules ependimàries.- Recobreixen la superfície dels ventricles i del canal central de la medul.la espinal. Efectuen una funció de bescanvi de substàncies entre el líquid cefalorraquidi i el medi extracel.lular.

Microglia.- Són les cèl.lules més petites i semblen relacionades amb funcions fagocitàries quan el teixit sofreix algun tipus de lesió.

Cèl.lules d'Schwann.- Realitzen, en el sistema nerviós perifèric, la mateixa funció que els oligodendròcits en el sistema nerviós central.

TRANSPORT A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÀLICA

L'estabilitat de la composició del medi extracel.lular és més important en cervell que en cap altre teixit de l'organisme. Qualsevol canvi en la composició conduiria a una activitat cerebral incontrolada. Per aquest motiu, la barrera hematoencefàlica aïlla les cèl.lules nervioses de les variacions que es presenten en la composició del medi sanguini. En contrast amb altres òrgans, les cèl.lules endotelials dels capil.lars cerebrals formen unions estretes que segellen completament els vasos ja que no presenten cap tipus de fenestracions (Reese and Karnovsky, 1967). El resultat és una doble membrana separades per una capa prima de citoplasma que proporciona una barrera continua entre sang i medi extracel.lular (Brightman, 1973; Muir and Peters; 1962).

L'aigua i certes substàncies apolars poden travessar la barrera hematoencefàlica per simple difusió. Els gasos, com el CO₂, O₂ o anestèsics volàtils difonen ràpidament cap al cervell de forma que la seva concentració en plasma vindrà només limitada per la relació entre el consum cerebral i el flux sanguini cerebral. En canvi, les substàncies hidrofíliques i polars no poden travessar-la. Donat que el cervell és absolutament dependent de l'aportació de substrats metabòlics i de l'eliminació dels productes de degradació, han d'existir mecanismes molt eficients de transport a través d'aquesta barrera. Això s'acompleix amb l'existència d'uns transportadors per a cada un dels diferents tipus de substrats metabòlics essencials per a les cèl.lules nervioses (Pardridge, 1983; Pardridge and Oldendorf, 1977).

S'han descrit set tipus principals de sistemes transportadors (Cornford, 1985; Betz *et al.*, 1989) (Figura 1.2):

Hexoses.- El transportador de glucosa ha estat ampliament estudiat i caracteritzat (veure revisions Lund-Andersen, 1979; Pardridge, 1983; Pardridge and Oldendorf, 1977). Hi ha dades que indiquen que el transport és simètric, existint transportadors a la membrana luminal i antiluminal dels capil·lars. Es un transport que es caracteritza per ser estereoespecífic (Yudilevich and de Rose, 1971; Crone and Thompson, 1973) i per que transporta competitivament carbohidrats relacionats: α -D-glucosa > β -D-glucosa > D-mannosa > D-galactosa > D-xilosa > D-fructosa (LeFerre and Peters, 1966; Betz and Gilboe, 1974; Pardridge and Oldendorf, 1975).

El transportador de glucosa present a la barrera hematoencefàlica és l'anomenat GLUT 1, present també en eritròcits i ronyó (Gould and Bell, 1990). Aquest transportador no és regulable per insulina (Sivitz *et al.*, 1989) i s'ha trobat en altes proporcions en ambdós costats de les cèl·lules endotelials de la barrera hematoencefàlica (Gerhart *et al.*, 1989). Hi ha dades indicatives que el transportador de glucosa GLUT 1 sols es troba a la barrera hematoencefàlica mentre el transportador de membrana de les cèl·lules glials i neurones correspondria a un tipus encara no identificat (Hara, *et al.*, 1989; Boado *et al.*, 1990). Recents resultats demostren que aquest receptor és el tipus GLUT 3 (Nagamatsu *et al.*, 1992) i que presenta regulació de la seva expressió per glucosa (Walker *et al.*, 1988).

El transport pot tenir lloc a la mateixa velocitat en les dos direccions, sang-cervell i cervell-sang (Crone, 1965; Pardridge and Oldendorf, 1975), el transport net progressarà en la direcció del gradient de concentració, que en condicions normals és de sang-cervell. Dels dos sistemes de transport de glucosa, el corresponent a la barrera hematoencefàlica i el de les membranes de les cèl·lules glials i neuronals, només el de la barrera hematoencefàlica podria ser un factor limitant en el transport (Crone, 1978). Malgrat això, la capacitat dels transportadors és aproximadament tres vegades superior a la velocitat d'utilització de glucosa per part del cervell. El transport de glucosa serà funció de la velocitat de la seva metabolització (Crone, 1978; Lund-Andersen, 1979; Cremer *et al.*, 1981).

Àcids monocarboxílics.- Els àcids monocarboxílics, com lactat, acetat, piruvat o cossos cetònics són transportats per un sistema estereoespecífic situat als dos costats de la barrera (Pardridge, 1983; Gjedde and Crone, 1975). En casos de cetosi, les concentracions de cossos cetònics en cervell són massa baixes per ser mesurades mentre

la seva concentració plasmàtica és molt elevada (Cremer and Heath, 1974; Ruderman *et al.*, 1974). Per tant, es pot afirmar que en períodes de cetosi el transport de cossos cetònics a través de la barrera hematoencefàlica és el pas limitant en la seva utilització (Miller *et al.*, 1973). Aquest transport és molt sensible a canvis fisiològics. Hi ha evidències que indiquen que s'incrementa la seva capacitat en situacions com la diabetis (McCall *et al.*, 1982), el dejuni (Cremer *et al.*, 1976) o durant la lactància (Cremer *et al.*, 1979).

Aminoàcids neutres.- Els aminoàcids neutres són transportats per dos mecanismes diferents, el L (preferent per a leucina) i el A (preferent per a alanina) (Christensen, 1973). El transportador d'aminoàcids tipus L transporta 9 aminoàcids amb preferència pels de cadena més llarga (Oldendorf, 1971). Aquest sistema és independent d'insulina i de sodi (Pardridge, 1983). Les afinitats del transportador per a cada un d'aquests aminoàcids és similar a les seves concentracions relatives en plasma. El transportador de tipus A només es troba a la cara antiluminal de la barrera i transporta aminoàcids com alanina, prolina, glicina i GABA. Constitueix un sistema d'eliminació del medi extracel.lular d'aquests aminoàcids no essencials i que actuen com a neurotransmissors (cas del GABA) o neuromoduladors (cas de la glicina).

Aminoàcids acídics.- El sistema de transport d'aminoàcids acídics s'ha proposat com un sistema ATP-depenent d'eliminació i no com un de captació d'aquests des del flux sanguini. (Oldendorf, 1976). Actuarà, doncs, com una bomba d'expulsió de glutamat (neurotransmissor excitatori) i d'aspartat del medi extracel.lular cap al torrent sanguini.

Aminoàcids bàsics.- Aquest sistema s'encarrega del transport dels aminoàcids essencials arginina, lisina i ornitina a unes velocitats comparables a les de síntesi proteica de les cèl.lules nervioses.

Bases púriques.- El transportador de bases púriques transporta adenina i guanina però no bases pirimidíniques, que són sintetitzades en quantitats adients pel propi cervell (Pardridge and Oldendorf, 1977).

Nucleòsids.- Transporta els nucleòsids de purines i uridina. Aquests nucleòsids són immediatament metabolitzats cap a nucleòtids mantenint molt baixos els seus nivells intracerebrals (Wu and Phillis, 1982) com correspon a la funció neuromoduladora de l'adenosina.

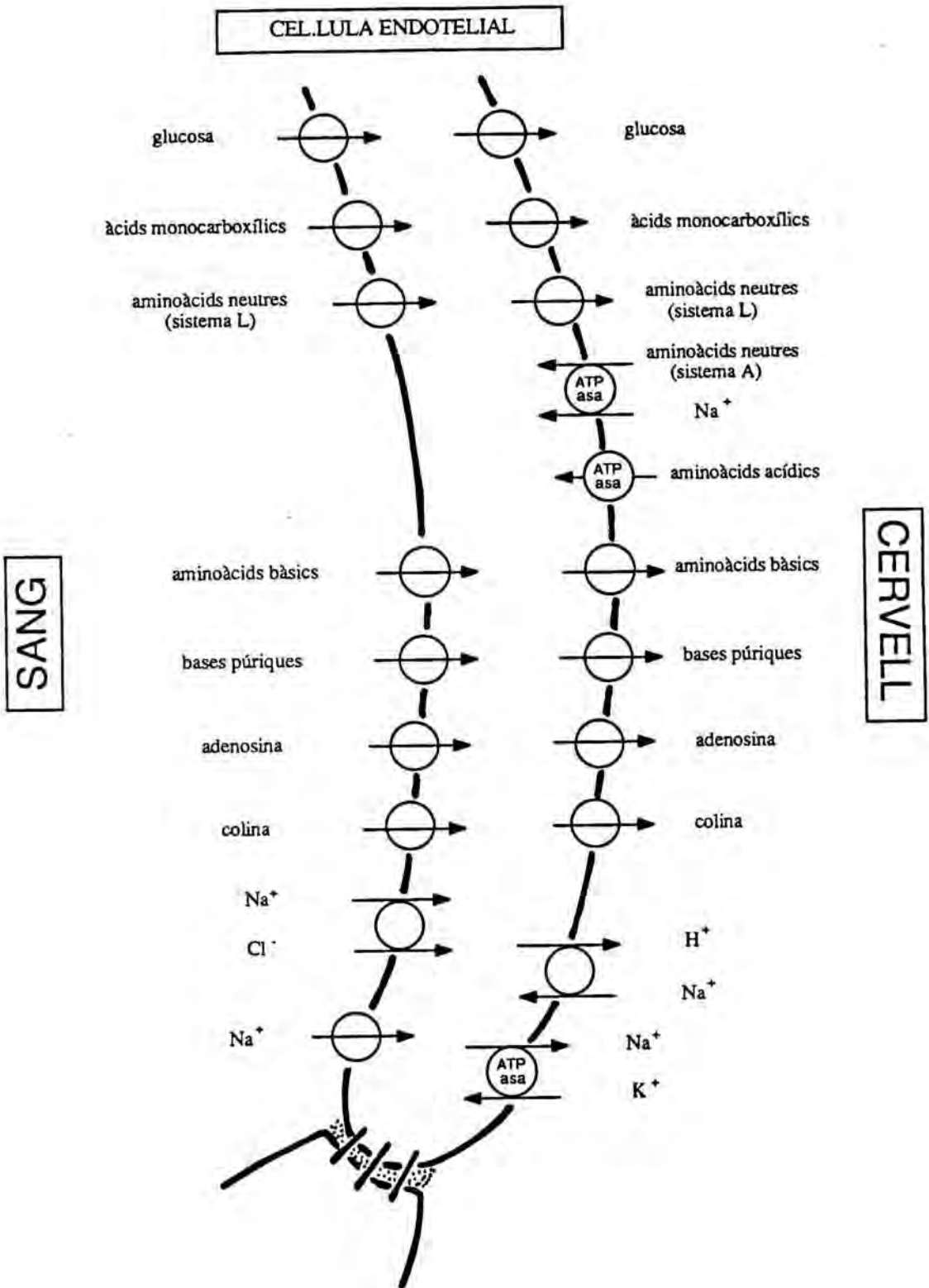


Figura 1.2.- Canals iònics i transportadors específics presents a la barrera hematoencefàlica.

Es pot observar la presència dels transportadors a cada una de les cares de la membrana de les cèl·lules endotelials. La direcció de les fletxes indica la direccionalitat del transport.

Colina.- La colina no es pot sintetitzar al cervell. Això obliga a un aportació exterior per medi d'un transportador específic. Aquest transport controla la formació d'acetilcolina al sistema nerviós central (Cohen and Wurtman, 1976; Cornford *et al.*, 1978). Formes de colina unides a lípids (com la lecitina) no són transportades (Pardridge, 1979).

A més dels mecanismes de transport de metabòlits essencials hi ha diversos sistemes de transport selectiu de ions a través de la barrera hematoencefàlica (Betz, 1986). Aquests sistemes permeten l'eliminació de K^+ del medi extracel·lular generat per les neurones per una Na^+/K^+ ATPasa situada preferentment a la cara antiluminal de les cèl·lules endotelials de la barrera hematoencefàlica (Figura 1.2). Existeix un bescanviador Na^+/H^+ al costat antiluminal de la barrera (Betz, 1983). Igualment hi ha diversos sistemes transportadors de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i oligoelements com Zn^{2+} , Cu^{2+} , etc. (Betz and Goldstein, 1986).

Donat que les concentracions de molts constituents del líquid cefalorraquidi són molt diferents que en plasma es pot deduir que el líquid cefalorraquidi no és senzillament un ultrafiltrat de plasma. El moviment de substàncies des de la sang fins al líquid cefalorraquidi és molt similar a l'observat entre la sang i el medi extracel·lular cerebral. Hi ha lliure moviment per difusió d'aigua, gasos, i compostos apolars mentre els nutrients essencials hidrofílics i els ions són transportats per mecanismes específics. En canvi, l'absència d'unions estretes entre les cèl·lules ependimàries permet que la majoria de molècules (excepte les de tamany elevat com per exemple proteïnes) puguin atravesar aquesta interfase per simple difusió. Aquesta idea es correspon amb els resultats que indiquen que les concentracions de la majoria de components del líquid cefalorraquidi són molt similars a les observades en el medi extracel·lular.

RUTES DEL METABOLISME HIDROCARBONAT CEREBRAL

La glucosa és l'únic substrat oxidat pel cervell en condicions normals, metabolitzant-se bàsicament a través de la via glucolítica. Només en situacions de deficiència de glucosa i durant el desenvolupament s'ha observat la utilització d'altres substrats alternatius a la glucosa. S'ha descrit utilització de cossos cetònics (β -hidroxibutirat i acetoacetat) durant el dejuni perllongat, la diabetis i durant la lactància

(Owen *et al.*, 1967; Ruderman *et al.*, 1974; Dombrowski *et al.*, 1989). El lactat i el glicerol poden ser utilitzats també durant el període perinatal (Arizmendi and Medina, 1983; Fernandez and Medina, 1986; Dombrowski *et al.*, 1989). No obstant, aquesta substitució no té mai lloc en la seva totalitat, confirmant la idea de que les cèl.lules cerebrals són absolutament dependents d'almenys una certa aportació de glucosa per part del torrent sanguini.

Els requeriments energètics del cervell són mantinguts gairebé exclusivament per l'oxidació aeròbica de glucosa. De tot el conjunt de la glucosa captada pel cervell, només un 7% es transformada a lactat. Del restant, aproximadament un 30% és oxidat en el cicle dels àcids tricarboxílics i un 60% es convertit en aminoàcids via α -ketoàcids, principalment glutamat i glutamina (Siebert *et al.*, 1986).

Durant molt temps s'havien efectuat intents de correlacionar el consum de glucosa i l'activitat cerebral. Els mètodes de mesura aplicats, bàsicament les diferències arteriovenoses de glucosa, només oferien resultats globals de tot el cervell i no d'àrees diferenciades de forma que no s'obtenien resultats concluent. Va ser en aparèixer els mètodes d'estudi de consum regional de glucosa, autoradiografies amb ^{14}C -deoxiglucosa (Sokoloff, 1977), la tomografia d'emissió de positrons (PET) (Phelps *et al.*, 1979) i la ressonància magnètica nuclear de protó i de ^{31}P (Ackermann *et al.*, 1980) que es va poder observar estimulació específica del consum de glucosa amb l'activitat de certes àrees cerebrals. Per exemple, l'estimulació lluminosa produeix increments de 10-50% en el metabolisme de la glucosa de l'escorça visual humana (Reivich and Alavi, 1983). De la mateixa forma, en el període de son que no correspon al REM s'observen disminucions del 20-30% en el consum de glucosa de l'escorça respecte als individus desperts, mentre que durant el REM augmenta notablement aquest consum i s'equipara al dels individus desperts (Buchsbaum *et al.*, 1989).

Una de les característiques més notòries de la via glicolítica és que transcorre essencialment de forma aeròbica, amb un coeficient respiratori proper a 1. La formació de lactat és molt reduïda donat que la major part del piruvat s'incorpora al cicle dels àcids tricarboxílics. Només en condicions amb una manca d'oxigen com la isquèmia i la hipòxia, s'observa una alta producció de lactat que correspon a un augment de la glucòlisi anaeròbica (Lowry *et al.*, 1964; Kintner *et al.*, 1980). Aquests nous mètodes d'estudi del consum regional de glucosa indiquen que durant l'estimulació tàctil o visual el metabolisme de la glucosa augmenta un 50% mentre el consum d'oxigen només ho fa en un 5%, indicatiu d'una significativa metabolització anaeròbica (Fox and Raichle, 1986;

Fox *et al.*, 1988). Això suggereix que les cèl.lules nervioses es troben a prop del seu límit oxidatiu en l'estat de repos i una estimulació afegida produirà una activació de la glucòlisi anaeròbicament. Aquesta activació podria estar relacionada amb l'estimulació directa pels productes de la Na^+/K^+ ATPasa (Lear, 1990).

Les rutes del metabolisme de carbohidrats al cervell són similars a les que operen generalment en totes les cèl.lules de mamífer. La glucòlisi és la principal via de degradació de la glucosa al cervell i transcorre a una velocitat elevada, 18-20 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (McIlwain and Bachelard, 1985). Des del punt de vista del control de la via, les reaccions catalitzades per la fosfoglucoisomerasa, aldolasa, fosfoglicerat mutasa i enolasa es troben en situació d'equilibri; aquest fet les exclou de constituir punts de control de la velocitat de la ruta. Els principals punts de regulació d'aquesta via són l'entrada de glucosa per fosforil·lació a glucosa 6-fosfat catalitzada per l'hexoquinasa (HK) i el pas de fructosa 6-fosfat a fructosa 1,6-bisfosfat catalitzat per la 6-fosfofructo 1-quinasa (PFK) (Lowry and Passonneau, 1964). En certes condicions la piruvat quinasa té també comportament regulador.

El piruvat és transformat en acetil-CoA per la piruvat deshidrogenasa. En aquest punt conflueixen les vies de degradació de la glucosa i dels cossos cetònics. Els cossos cetònics són també transformats en acetil-CoA mitjançant tres reaccions que tenen lloc a la mitocondria, catalitzades per la β -hidroxibutirat deshidrogenasa, 3-oxoàcid CoA transferasa i l'acetil-CoA tiolasa. Aquests tres enzims són presents en el cervell adult malgrat que la seva activitat disminueix molt al llarg del desenvolupament (Cremer and Heath, 1974). L'acetil-CoA sintetitzat per les dues rutes s'incorporen al cicle dels àcids tricarbòxil·lics que presenta característiques similars amb els altres teixits.

Com a característiques específiques del metabolisme hidrocarbonat cerebral està la no existència de gluconeogènesi apreciable degut a la inexistència d'activitats glucosa 6-fosfatasa i fructosa 1,6-bisfosfatasa (Dienel *et al.*, 1988). Un altre tret diferencial són les baixes reserves de carbohidrats al cervell. Els nivells de glucogen, 0.1-0.2 $\text{mg} \cdot \text{g} \text{teixit}^{-1}$, (Nahas and Abdul-Ghani, 1989) són molt baixos per mantenir compensades més d'uns minuts les necessitats energètiques cerebrals. Això fa que les cèl.lules nervioses siguin absolutament depenents de l'aportació continua de substrats energètics procedents del flux sanguini i que qualsevol disminució d'aquesta aportació tingui conseqüències irreversibles per la funcionalitat d'aquest teixit.

El cicle de les pentoses contribueix relativament poc al consum global de glucosa (aproximadament el 10%). Els enzims que participen en aquesta via presenten unes

activitats de 10 a 40 vegades més petites que els corresponents a la via glucolítica i, a més, les concentracions de NADP⁺ i NADPH, cofactors d'aquesta via, són també 10-20 vegades més baixes que les de NAD⁺ i NADH, cofactors de la via glucolítica. La funció bàsica d'aquesta ruta metabòlica és l'aportació del NADPH necessari per a la síntesi de lípids, especialment durant el desenvolupament i en les cèl.lules productores de mielina i, per proveir d'esquelets de ribosa per a la biosíntesi de nucleòtids.

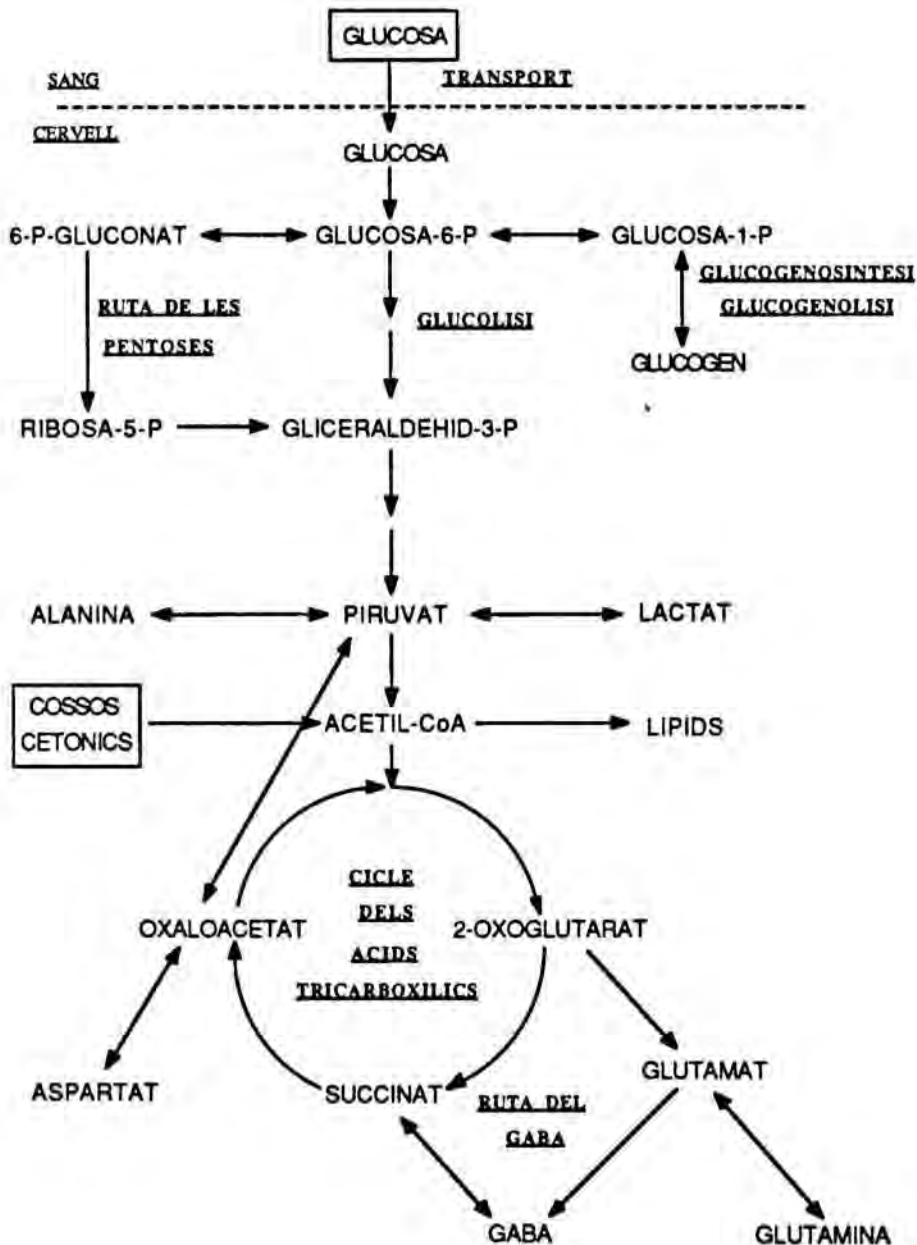


Figura 1.3.- Rutes del metabolisme energètic cerebral.

Una altra característica del metabolisme energètic cerebral és la formació d'àcid γ -aminobutíric (GABA). La producció de GABA es realitza per un curtcircuit en el cicle dels àcids tricarboxílics (Figura 1.3). El curtcircuit és desfavorable energèticament, es produeix el mateix nombre de molècules de NADH però no es produeix el GTP que es dona en el cicle dels àcids tricarboxílics en el pas de succinil-CoA a succinat. D'aquesta forma es genera un ATP menys quan el flux a través del cicle segueix el curtcircuit. La seva funció principal serà la síntesi de GABA, necessari com a neurotransmissor inhibitori. Aquesta idea es corrobora amb les dades que apunten que el curtcircuit no està homogèniament distribuït en el cervell donat que l'enzim clau per a la síntesi del GABA, la glutamat decarboxilasa es troba només en les neurones GABAèrgiques, que l'utilitzen com a neurotransmissor. El GABA alliberat serà recaptat per les cèl.lules glials circumdants que sí disposen de tota la maquinària enzimàtica per transformar el GABA fins a succinat i reintegrar-lo en el cicle dels àcids tricarboxílics.

Unes altres vies molt importants en el teixit cerebral són les de síntesi per transaminació dels aminoàcids dicarboxílics glutamat i aspartat que, com s'havia indicat, no disposen de transportadors per travessar la barrera hematoencefàlica en la direcció sang-cervell. Els nivells de glutamat i aspartat en cervell són molt més elevats que en altres teixits (5-10 mM i 2-3 mM respectivament) (Bradford, 1988). A partir de 2-oxoglutarat i oxaloacetat se sintetitzen per transaminació per l'aspartat aminotransferasa o aminació per la glutamat deshidrogenasa. El glutamat i l'aspartat estan involucrats en biosíntesi de proteïnes i en neurotransmissió. Igualment, la glutamina i l'alanina es troben a altes concentracions i són sintetitzades per la glutamina sintetasa i l'alanina aminotransferasa respectivament.

Un gran nombre de dades experimentals suggereixen que existeix una certa compartimentació i especialització en la utilització de substrats entre neurona i glia. La glucosa sembla ser metabolitzada preferentment per les neurones mentre els altres substrats són captats fonamentalment per les cèl.lules glials. Els oligodendròcits tenen nivells molt escassos de glucogen i un nombre molt alt de mitocondries. El seu metabolisme sembla altament dirigit cap a la síntesi i recanvi de mielina en el sistema nerviós central. Els astròcits són les cèl.lules nervioses amb més dipòsits de glucogen i poden aportar intermediaris del cicle del àcids tricarboxílics a les neurones de forma que es supleix el consum per la utilització d'aquests intermediaris (GABA, glutamat, etc.) com a neurotransmissors o neuromoduladors. Enzims anapleròtics, com la piruvat carboxilasa s'expressen selectivament en astròcits. A més tenen funcions de recaptació i metabolització de substàncies excretades per les neurones durant la seva activitat. Per

exemple, el glutamat alliberat al medi extracel.lular com a neurotransmissor és recaptat per les cèl.lules gials, convertit en glutamina i reciclat cap a succinat. Posteriorment s'exportarà de nou cap a les neurones en forma de malat o 2-oxoglutarat (Lajtha *et al.*, 1979).

REGULACIO DEL METABOLISME HIDROCARBONAT CEREBRAL

La regulació del metabolisme hidrocarbonat és important en relació a la capacitat del cervell d'adaptar-se ràpidament a les alteracions del medi exterior per modificació de la velocitat de reaccions enzimàtiques específiques. Aquestes reaccions enzimàtiques són considerades reguladores quan s'observa que *in vivo* no es troben en una situació d'equilibri entre substrats i productes i si responen a variacions fisiològiques per disminució o augment de la seva velocitat (Krebs and Kornberg, 1957). Analitzarem els principals punts de regulació de les diferents vies metabòliques cerebrals.

Transport de glucosa.- Si el transport de glucosa pot constituir un punt de regulació i restricció del consum per la cèl.lula depen de la relació entre la velocitat del transport a través de la barrera hematoencefàlica i la seva fosforil.lació. Les dades obtingudes *in vitro* i *in vivo* indiquen que la velocitat de transport excedeix almenys 3 cops a la velocitat de fosforil.lació (Lund-Andersen and Kjeldsen, 1977). La relació entre les velocitats de transport i fosforil.lació *in vivo* es poden estimar per la relació entre les concentracions de glucosa plasmàtica i la intracel.lular. Es pot fer l'aproximació que el transport, tan en la direcció sang-cervell com a la inversa, segueix una cinètica de Michaelis-Menten segons l'equació:

$$J = \frac{T_{\max}}{C_p + K_t} C_p - \frac{T_{\max}}{C_p + K_t} C_c$$

on J correspon al flux net, T_{\max} és la velocitat màxima del transport, K_t és la constant d'afinitat del transportador i C_p i C_c són les concentracions plasmàtica i cel.lular de glucosa respectivament (Lund-Andersen, 1979). Si prenem la concentració plasmàtica de glucosa com 6 mM i substituïm els valors de les constants obtinguts *in vivo* es pot calcular que la concentració de glucosa *in vivo* hauria de correspondre a uns 2 mM. Aquests són els valors obtinguts per la concentració de glucosa cel.lular *in vivo* (Veech *et al.*, 1973; Ruderman *et al.*, 1974). Aquests resultats descartaven altres anteriors que indicaven nivells de glucosa molt inferiors, però determinats en condicions on el teixit suportava un procés d'isquèmia perllongada que exhauria les reserves de glucosa lliure (Veech *et al.*, 1973). De tots aquests resultats es pot concloure que, en condicions

normals, el transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica no és un procés limitant en el consum global de glucosa. Malgrat això, en condicions d'isquèmia i de hipoglicèmia, el transport pot ser un factor limitant quan els valors de glucosa plasmàtica arriben a valors inferiors a 2-3 mM (Figura 1.4). En el mateix sentit, s'ha observat una disminució de més de cinc vegades en la quantitat de transportador durant el període neonatal (Sivitz *et al.*, 1989) o a la meitat durant la diabetis experimental (Pardridge *et al.*, 1990) que estaria relacionada amb la utilització de substrats alternatius durant aquesta fase del desenvolupament i durant la diabetis.

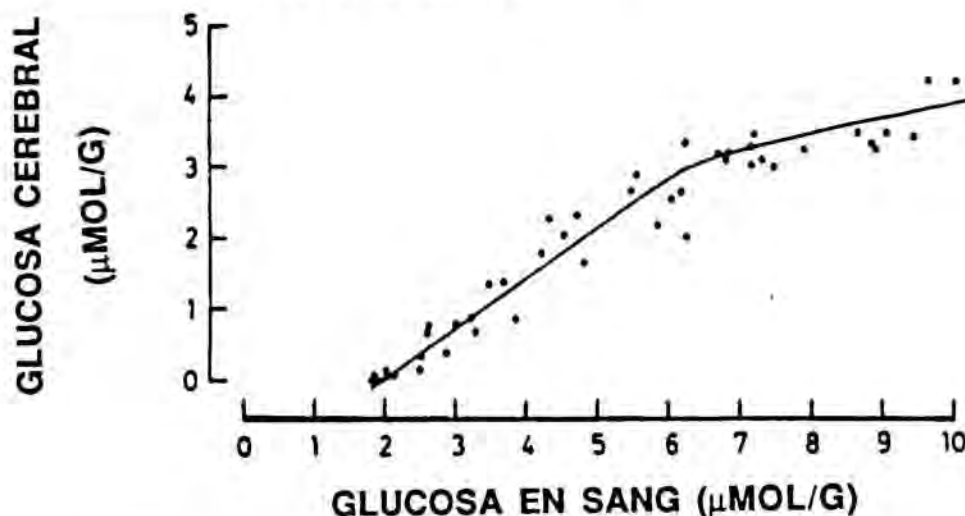


Figura 1.4.- Correlació entre concentració de glucosa cerebral i la seva concentració a sang.

Modificada de Lund-Andersen (1979).

Metabolisme del glucogen.- El glucogen actua com a reserva energètica en el cervell, malgrat que els seus nivells són molt baixos en comparació als nivells existents a múscul o fetge. Aquest glucogen es troba distribuït a totes les àrees cerebrals i en tots els tipus cel·lulars, encara que predominantment en els astròcits (Phelps, 1975; Cataldo and Broadwell, 1986). La concentració de glucogen en cervell sembla remarcàblement constant en una extensa varietat de condicions com el dejuni (Goldberg and O'Toole, 1969) o la diabetis (Nelson *et al.*, 1968). La funció fisiològica atribuïda a les reserves de glucogen és la seva mobilització en resposta a increments locals en l'activitat neuronal (Fox *et al.*, 1988) o en situacions d'estrés i manca de substrats energètics com la isquèmia, l'andòxia, les convulsions o el trauma (Lowry *et al.*, 1964; Watanabe and Passonneau, 1974; Kintner *et al.*, 1980) degut als augments d'AMP i AMP cíclic (Watanabe and Ishii, 1976). Paral·lelament, un increment en els seus nivells estarà associat a una activitat neuronal disminuïda en situacions d'aportació energètica suficient com durant períodes d'anestèsia (Nelson *et al.*, 1968) o hibernació (Ibrahim, 1975).

El metabolisme del glucogen està regulat per les activitats relatives de la glucogen sintasa i la glucogen fosforil.lasa. Aquestes dues activitats es troben regulades en sentit oposat per mecanismes de tipus al·lostèric i per modificació covalent a través de cascades de senyals de fosforil.lació/defosforil.lació. La glucogen fosforil.lasa és activada potentment per l'AMP mentre la glucosa-6-fosfat, descrita com un inhibidor de l'enzim muscular, no té efectes inhibidors sobre la glucogen fosforil.lasa cerebral (Newgard *et al.*, 1989). En canvi, la glucosa 6-fosfat actua com a potent activador de la glucogen sintasa a (activa) (Goldberg and O'Toole, 1969). En astròcits transformats s'ha observat un potent efecte inhibidor de la glucosa sobre la fosforil.lasa a (Cummins *et al.*, 1983). D'aquesta forma en situacions d'alt consum energètic i/o manca de substrats externs es produirà activació de la glucogenolisi per augment de l'AMP i la paral·lela disminució dels nivells de glucosa i de glucosa 6-fosfat.

La regulació covalent de les dues activitats es realitza fonamentalment a través de cascades de fosforil.lació que inclouen la fosforil.lasa kinasa, la PKA i la fosfoproteïna fosfatasa 1 (PP-1). La fosforil.lasa quinasa activa la glucogen fosforil.lasa i inhibeix la sintasa. Aquesta fosforil.lasa quinasa és dependent de Ca^{2+} i alhora, és activada per fosforil.lació per la PKA. La PP-1 catalitza els processos de defosforil.lació. La PP-1 es inhibida per la glucogen fosforil.lasa impedit que defosforil.li (activació) la glucogen sintasa si no defosforil.la (activa) en primer lloc la glucogen fosforil.lasa a. Aquesta regulació produeix caigudes en els nivells de glucogen en resposta a hormones i factors que actuin sobre els receptors α i β -adrenèrgics o en resposta a neurotransmissors o neuromoduladors (Magistretti, 1988).

Glucòlisi.- Les tres vies que divergeixen a partir de la glucosa 6-fosfat tenen activitats molt diferents. La síntesi de glucogen i la ruta de les pentoses tenen lloc a unes velocitats molt inferiors que la glucòlisi, la qual en condicions control utilitza 18-20 μmol glucosa. g teixit⁻¹.h⁻¹ però que pot, en certes condicions, actuar a fluxos molt més elevats. Això ens indica que els enzims glicolítics generalment actuen a velocitats molt inferiors a les seves capacitats màximes. Estudis realitzats mesurant les concentracions de diversos intermediaris metabòlics de la via glucolítica en diferents situacions experimentals (Figura 1.5) han identificat com a punts de control principal les etapes catalitzades per l'hexoquinasa, la 6-fosfofructo 1-quinasa i la piruvat quinasa (Lowry *et al.*, 1964).

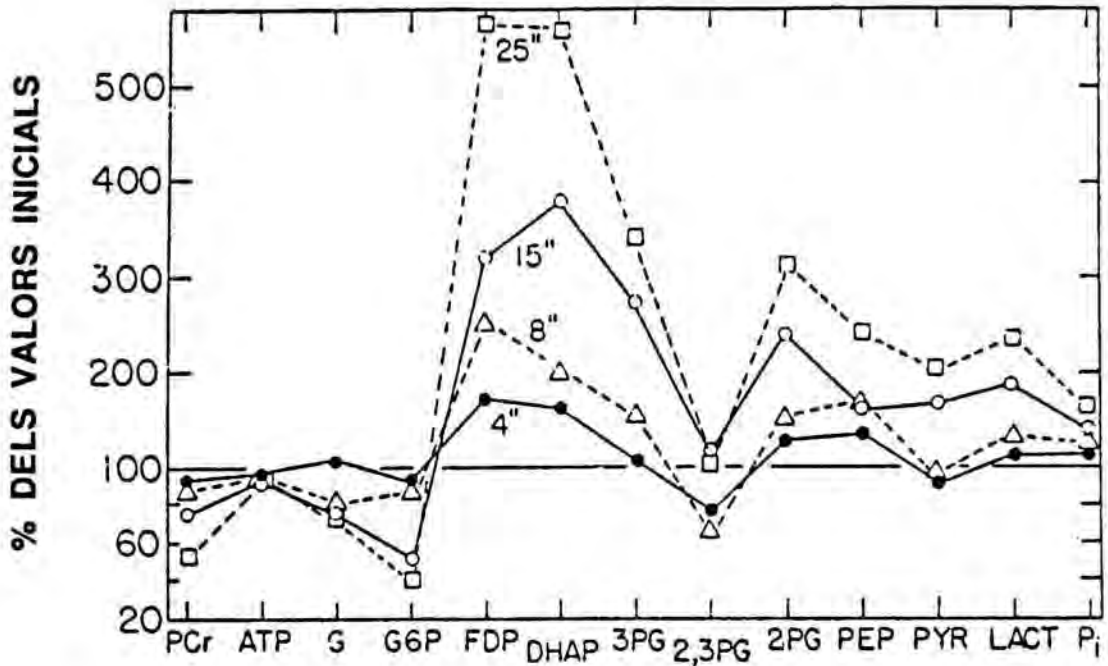


Figura 1.5.- Canvis percentuals respecte el temps zero en la concentració de diversos metabòlits cerebrals durant els primers 25 segons d'isquèmia.

Adaptada de Lowry *et al.*, (1964). Les abreviatures utilitzades són: PCr, fosfocreatina; G, glucosa; G6P, glucosa 6-fosfat; FDP, fructosa 1,6-bisfosfat; DHAP, fosfat de dihidroxiacetona; 3PG, 3-fosfoglicerat; 2,3PG, 2,3-bisfosfoglicerat; 2PG, 2-fosfoglicerat; PEP, fosfo-enol-piruvat; PYR, piruvat; LACT, lactat.

Hexoquinasa. L'hexoquinasa cerebral, corresponent a l'isoenzim tipus I (Wilson, 1980), representa el primer punt de control de l'entrada de glucosa a la cèl.lula nerviosa. La seva activitat màxima és d'aproximadament 10 U.g teixit⁻¹ (McIlwain and Bachelard, 1985), activitat molt més alta que la velocitat de consum de glucosa detectada (Siebert *et al.*, 1986). Aquesta alta activitat es troba inhibida pels seus productes: glucosa 6-fosfat (K_i de 0.4 mM) i ADP (K_i de 0.4 mM). També presenta inhibició per excés de substrat, ATP i glucosa, de forma que en condicions control es troba inhibida en un 97% (Wilson, 1980). La glucosa 1,6-bisfosfat ha estat descrit com un inhibidor de l'hexoquinasa a més d'actuar com un cofactor de la fosfoglucomutasa (Beitner, 1985; Beitner, 1990). Els seus nivells cauen ràpidament durant la isquèmia (Passonneau *et al.*, 1969) probablement degut a l'augment d'IMP, que actua com un potent activador de la glucosa 1,6-bisfosfatasa (Guha and Rose, 1982). El seu paper com a regulador de l'hexoquinasa cerebral ha estat discutit donat que l'isoenzim tipus I, únic isoenzím present en cervell, és set vegades més sensible a la inhibició per glucosa 6-fosfat que per glucosa 1,6-

bisfosfat (Beitner, 1985, Yip *et al.*, 1988) a més, la distribució del metabòlit i dels enzims implicats en el seu metabolisme no es correlacionen amb les dades del consum de glucosa (Yip *et al.*, 1988).

Al contrari que els altres enzims glicolítics, entre un 30% i un 70% de l'hexoquinasa present al cervell es troba unida a membranes d'òrgànuls intracel·lulars a través del seu extrem N-terminal (Xie and Wilson, 1988). Aquesta unió és controlada pels nivells de glucosa 6-fosfat, que indueixen la solubilització de l'enzim. S'ha descrit que aquests dos estats varien la seva proporció relativa en situacions com isquèmia (Knull *et al.*, 1973) o diabetis (Ouchi *et al.*, 1975). En vista a tots aquests resultats s'ha hipotetitzat que l'enzim s'uneix a la membrana mitocondrial i això afavoreix la disponibilitat de l'ATP generat a la mitocondria i que actuaria com a substrat per l'hexoquinasa (Arora and Pedersen, 1988). Malgrat tot, la funció fisiològica d'aquesta unió no està clarificada. S'ha demostrat que aquesta fracció particulada no sols es troba unida a mitocondria sinó també, i de forma preferent, a les membranes de la fracció microsomal (Parry and Pedersen, 1990). A més, donat que els nivells de glucosa 6-fosfat són els qui controlen en major part aquesta unió, aquest sistema sembla ser més un sistema passiu de regulació dependent d'altres mecanismes (en especial modificacions d'activitat PFK que alterarien els nivells de glucosa 6-fosfat) que un veritable mecanisme de control independent (Bessman and Geiger, 1980).

6-Fosfofructo 1-quinasa. - La formació de fructosa 1,6-bisfosfat per part de la fosfofructoquinasa (PFK-1) és considerada com el punt de control principal de la via glucolítica. La PFK-1 a cervell, com als altres teixits, està subjecta a una complexa regulació de la seva activitat, essencialment per modificació alostèrica (Passonneau and Lowry, 1963).

El P_i , l'AMP, l'AMP cíclic i els cations monovalents K^+ i NH_4^+ són activadors de la PFK-1 a l'igual que la fructosa 6-fosfat i el seu producte, la fructosa 1,6-bisfosfat. La glucosa 1,6-bisfosfat, a més del seu efecte inhibitor sobre l'hexoquinasa, és activador de la PFK-1 (Beitner, 1990). La fructosa 2,6-bisfosfat i la ribosa 1,5-bisfosfat actuen com un potents activadors a concentracions molt baixes (Foe and Kemp, 1985; Vora *et al.*, 1985; Staal *et al.*, 1987; Ishikawa *et al.*, 1990) (Figura 1.6), habent-se descrit augment en els seus nivells durant l'activació de la glucòlisi durant els primers moments d'isquèmia *in vivo* (Yamamoto *et al.*, 1990).

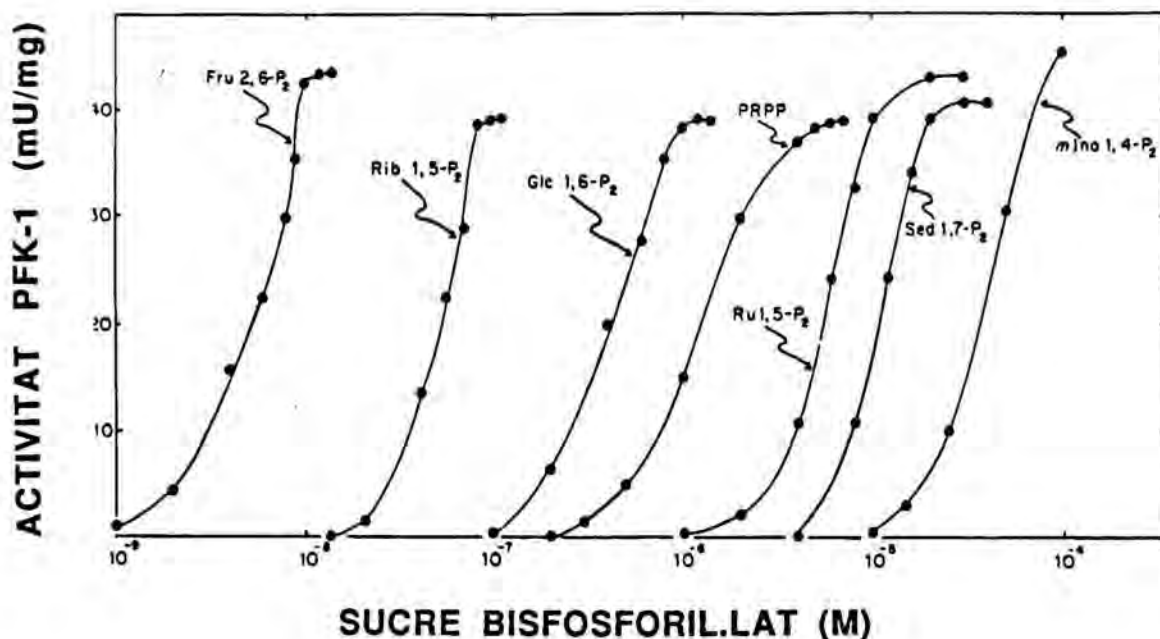


Figura 1.6.- Comparació de l'activació de la PFK-1 per diversos sucres bisfosforil·lats.

Adapatada de Ishikawa et al., (1990). L'activitat PFK-1 va ser determinada en presència de les concentracions indicades de cada sucre bisfosforil·lat. Les abreviatures utilitzades són: Fru 2,6-P₂, fructosa 2,6-bisfosfat; Rib 1,5-P₂, ribosa 1,5-bisfosfat; Glc 1,6-P₂, glucosa 1,6-bisfosfat; PRPP, fosforibosil pirofosfat; Ru 1,5-P₂, ribulosa 1,5-bisfosfat; Sed 1,7-P₂, sedoheptulosa 1,7-bisfosfat; mIno 1,4-P₂, mioinositol 1,4-bisfosfat.

Com a principals inhibidors de la seva activitat es troben l'ATP, substrat de la reacció però també inhibidor a altes concentracions i el citrat. Aquesta inhibició és més alta per l'ATP lliure que per l'ATP-Mg (MacIlwain and Bachelard, 1985). La inhibició per part del citrat garanteix la interregulació entre la via glucolítica i el cicle dels àcids tricarbòxics (Newsholme *et al.*, 1977) de forma que l'acumulació d'un intermediari del cicle dels àcids tricarbòxics disminueix l'entrada de piruvat procedent de la glucòlisi per disminució del flux glicolític. En situació d'isquèmia o hipoglicèmia severa, on es produeix una important caiguda d'ATP amb l'augment consegüent de la concentració d'AMP, es produirà una activació neta del flux per l'efecte inhibidor de l'ATP coordinat amb l'efecte activador de l'AMP i el P_i. L'extensió de la inhibició per citrat i ATP, actuant sinèrgicament, dependrà de la concentració plasmàtica d'aquests donat que els dos són sintetitzats a les mitocondries.

S'ha observat modificació covalent per fosforil·lació per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (PKA) i per proteïna quinasa C (PKC) (Foe and Kemp, 1984; Hofer *et al.*, 1985). La modificació induïda per PKA sembla no alterar significativament cap dels paràmetres cinètics de la PFK-1 (Foe and Kemp, 1984) mentre la fosforil·lació *in vitro* per PKC no altera la V_{max} però augmenta notablement l'afinitat per la fructosa 6-fosfat (Hofer *et al.*, 1985). aquesta fosforil·lació independent d'AMP cíclic no s'ha pogut comprovar *in vivo* en cèl·lules de cervell però sí en cèl·lules procedents de gliomes (Staal *et al.*, 1987).

La PFK-1 es troba en els teixits de mamífer en 3 formes isoenzimàtiques diferents, la tipus M, corresponent a múscul, la tipus L, corresponent a fetge i la tipus C, corresponent a cervell (revisat per Dunaway, 1988). Estudis immunològics amb anticossos específics contra aquests isoenzims demostren que en cervell s'expressen els tres isoenzims. Les proporcions de les diferents subunitats en teixits humans són 50% de tipus M, 15-25% de tipus L i 20-30% de tipus C (Staal *et al.*, 1987, Dunaway *et al.*, 1988), variant aquestes proporcions en gliomes, on augmenta el percentatge corresponent a la forma L (Staal *et al.*, 1987). Aquestes proporcions es mantenen gairebé constants en diverses regions cerebrals estudiades i entre els diferents tipus cel·lulars (Dunaway and Kasten, 1985). Aquests tres isoenzims presenten propietats cinètiques diferenciades entre sí. La sensibilitat a la inhibició per ATP segueix l'ordre $L > C > M$ mentre la sensibilitat a la inhibició per citrat segueix l'ordre $C > M > L$ (Vora *et al.*, 1985). L'isoenzim específic de cervell és el que presenta menys afinitat per la fructosa 6-fosfat i una menor sensibilitat a l'activació per fructosa 2,6-bisfosfat, amb una constant d'activació de 5 μM (Staal *et al.*, 1987; Vora *et al.*, 1985) valor que es troba entorn de la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat trobada a cervell (Pauwels and Trouet, 1984; Yamamoto *et al.*, 1990).

Durant el desenvolupament es produeix una expressió progressiva de la PFK-1, que segueix el mateix perfil que la resta d'enzims implicats en la via glucolítica. Els nivells fetals i durant les dues primeres setmanes en cervell de rata són molt petits, produint-se posteriorment un augment de més de 20 cops arribant als valors d'activitat de cervell adult (revisat a McIlwain and Bachelard, 1985). Durant la diabetis experimental s'ha observat una disminució en l'activitat màxima PFK-1 i en el seu transport axonal que pot ser previngut per gangliòsids. Aquestes variacions observades poden estar degudes a variacions en la síntesi/degradació de l'enzim o bé modificacions en la seva activitat màxima (Calcutt *et al.*, 1988).

La regulació de l'activitat PFK-1 en cervell sembla fortament lligada als efectes inhibitoris produïts pel citrat (Newsholme, 1977) i la càrrega energètica. Dades experimentals obtingudes en situacions de disponibilitat de cossos cetònics per part del cervell, com són la diabetis i el dejuni, semblen confirmar-ho (Ruderman *et al.*, 1974). En el metabolisme energètic del neonat, la PFK-1 també es troba inhibida pel citrat provinent de la degradació de cossos cetònics i lactat, permetent l'estalvi de glucosa que pot ser desviada per la ruta de les pentoses en una situació d'elevada biosíntesi de lípids (Stumpf and Kraus, 1979). En situacions on el consum d'ATP supera la seva biosíntesi, es produirà una davallada en la concentració d'ATP, inhibidor, i un augment en la d'AMP, activador de la PFK-1. El resultat global serà l'augment del flux glicolític i un restabliment de la càrrega energètica cel·lular. Aquestes variacions en l'activitat PFK-1 produiran variacions en els nivells de glucosa 6-fosfat que com veiem era el modulador més important de l'hexoquinasa; d'aquesta forma s'acoblaran les dues activitats i el conjunt de la via.

Piruvat quinasa.- Estudis d'electroenfocament i detecció específica dels diversos isoenzims de la piruvat quinasa indiquen que la forma present a cervell correspon a la forma muscular M₁ (Marie *et al.*, 1976). Aquest isoenzim, al contrari que les altres formes M₂ i L, no es troba modulad per fructosa 1,6-bisfosfat ni per l'ATP. Al contrari que la forma hepàtica que està altament regulada per fosforil·lació depenent d'AMP cíclic, l'isoenzim cerebral no és fosforil·lat per PKA (Denton and Halestrap, 1979). Aquestes dades indiquen que l'activitat piruvat quinasa cerebral està molt menys regulada que en d'altres teixits. La seva activitat dependrà bàsicament de la disponibilitat dels seus substrats ADP i fosfoenolpiruvat, la qual estarà determinada per l'activitat global de la via i en especial per la PFK-1.

Cicle dels àcids tricarboxílics.- El cicle dels àcids tricarboxílics, en general, presenta un tipus de regulació similar a la d'altres teixits. La seva velocitat està control·lada per l'estat redox mitocondrial a través de la inhibició per NADH. El ratio NADH/NAD⁺ està lligat al ratio ATP/ADP mitocondrial que en darrera instància representa el potencial de fosforil·lació general de la cèl·lula (Williamson and Cooper, 1980). Altres paràmetres que influeixen en la velocitat del cicle són les relacions NADPH/NADP⁺, succinil-CoA/CoA i citrat/oxaloacetat. Els punts de regulació del cicle que catalitzen reaccions que no es troben en equilibri són: la formació d'acetil-CoA per la piruvat deshidrogenasa, l'entrada d'acetil-CoA en el cicle catalitzada per la citrat sintasa i en menor grau els processos catalitzats per la isocitrat deshidrogenasa i la 2-oxoglutarat deshidrogenasa.

La piruvat deshidrogenasa és el punt limitant més important, restringint la quantitat total de piruvat que entrarà en el cicle via acetil-CoA. Es de destacar que, en cervell, l'acetil-CoA format és gairebé tot oxidat en el cicle dels àcids tricarboxílics i molt poc és utilitzat per a la biosíntesi de lípids. La piruvat deshidrogenasa es troba en forma d'un complex multienzimàtic que té la seva activitat regulada per mecanismes al·lostèrics i per fosforil·lació/defosforil·lació. Presenta una forta inhibició per part dels seus productes de reacció, l'acetil-CoA i el NADH. La seva activitat serà doncs control·lada per els ratios NADH/NAD^+ i $\text{acetil-CoA}/\text{CoA}$ (revisat a Denton and Halestrap, 1979). A més presenta regulació a través de fosforil·lació per una quinasa no caracteritzada fins al moment. La fosforil·lació (inactivació) de la piruvat deshidrogenasa està afavorida per altes relacions $\text{Acetil-CoA}/\text{CoA}$ i NADH/NAD^+ i inhibida pel piruvat, ADP , Ca^{2+} i K^+ (Denton *et al.*, 1975).

L'entrada de l'acetil-CoA en el cicle per condensació amb l'oxaloacetat és un altre punt de control. L'activitat *in vivo* està molt influïda per la disponibilitat dels seus substrats (Krebs, 1967), i està afectada per àcids di i tricarboxílics, ATP i diversos acil-CoAs (Williamson and Cooper, 1980; Wiegand and Remington, 1986). La demostració de que l'enzim es troba fortament unit a la membrana mitocondrial obra la possibilitat de que variacions en el microambient que envolta a la citrat sintasa influixin fortament en la seva activitat *in vivo* (Wiegand and Remington, 1986). La isocitrat deshidrogenasa presenta activació per ADP-Mg que conjuntament amb la inhibició de la citrat sintasa per l'ATP asseguren la implicació directa del potencial de fosforil·lació marcat per la relació ATP/ADP en el control del cicle.

Cossos cetònics.- La utilització de cossos cetònics és proporcional a la seva concentració plasmàtica. Com els nivells plasmàtics de β -hidroxibutirat són uns 5-6 cops superiors als d'acetoacetat, la proporció en que participa en el metabolisme energètic cerebral és superior en la mateixa proporció (Sokoloff, 1973; Owen *et al.*, 1967). La velocitat de la seva metabolització està limitada per la disponibilitat, marcada per la seva concentració plasmàtica, i per la velocitat de captació a través del transportador dels àcids monocarboxílics de la barrera hematoencefàlica descrit anteriorment (Miller *et al.*, 1973; Ruderman *et al.*, 1974). Corrobora aquesta hipòtesi el fet de trobar concentracions de cossos cetònics gairebé indetectables en cervell en situacions on la seva concentració plasmàtica es troba molt augmentada com la diabetis i el dejuni (Ruderman *et al.*, 1974). Això implica que un cop travessada la barrera hematoencefàlica els cossos cetònics són ràpidament metabolitzats amb l'únic control en l'oxidació del β -hidroxibutirat i del

acetoacetat és la regulació de l'entrada d'acetil-CoA en el cicle dels àcids tricarboxílics (Sokoloff, 1973).

Durant la lactància s'observa una alta metabolització de cossos cetònics, que són aportats a través de la dieta per l'alta proporció de greixos de la llet maternal. S'ha observat, en aquesta situació, un augment en la capacitat del transportador de la barrera hematoencefàlica (Cremer, *et al.* 1979) i paral·lelament els enzims implicats en la degradació dels cossos cetònics presenten, en cervell de rata, un pic d'activitat amb uns nivells quatre vegades superiors als valors adults o fetals (Leong and Clark, 1984). També durant el dejuni s'ha observat un augment en la capacitat del transportador dels àcids monocarboxílics afavorint la metabolització dels mateixos (Cremer *et al.*, 1976).

Aquesta metabolització dels cossos cetònics dona lloc a l'efecte d'estalvi de glucosa quan altres substrats són utilitzats per part del cervell. Aquest efecte s'observa si mesurem la diferència entre les concentracions per aquests metabòlits i per la glucosa entre la sang arterial que irriga el cervell i la venosa (diferència arteriovenosa). Quan es mesura aquesta diferència en animals diabètics s'observa com la diferència arteriovenosa es troba disminuïda per la glucosa i augmentada per als cossos cetònics (Ruderman *et al.*, 1974; Newsholme *et al.*, 1977). El mecanisme d'aquest estalvi de glucosa és l'increment que la oxidació dels cossos cetònics produirà en els nivells d'acetil-CoA. Aquest últim, s'integrarà en el cicle dels àcids tricarboxílics conduint a l'augment dels intermediaris del cicle que produiran un efecte inhibitori de la glucòlisi. Aquest efecte serà mediat especialment per la inhibició del citrat sobre la PFK-1 (Newsholme *et al.*, 1977) i per l'augment en la càrrega energètica cel·lular.

Capítol 2:

Funció de la fructosa 2,6-bisfosfat
en la regulació del metabolisme
hidrocarbonat cerebral

FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT

La fructosa 2,6-bisfosfat (Fru-2,6-P₂) va ser descoberta estudiant l'acció del glucagó en el cicle fructosa-6-P (Fru-6-P)/fructosa 1,6-bisfosfat (Fru-1,6-P₂) catalitzat per la PFK-1 i la FBPasa-1 hepàtiques (Van Schaftingen *et al.*, 1980). La Fru-2,6-P₂ actua com a potent activador de tots els isoenzims coneguts de la PFK-1 i com a inhibidor de la FBPasa-1 (Van Schaftingen, 1987; Hue i Bartrons, 1985; Hue i Rider, 1987; Pilkis i El-Maghrabi, 1988). A concentracions inferiors a 1 μM, la Fru-2,6-P₂ contrarresta l'efecte inhibidor de l'ATP i disminueix la K_m per la Fru 6-P hepàtica. Els efectes de la Fru-2,6-P₂ i l'AMP són fortament sinèrgics, de forma que poden activar la PFK-1 fins i tot a concentracions a les quals individualment no tindrien efecte. La presència de Fru-2,6-P₂ en tots els teixits de mamífer i els seus efectes sobre uns dels principals enzims reguladors de la glicolisi han suggerit la importància del paper que juga aquest metabòlit bisfosforilat en el control del flux glicolític.

En teixit hepàtic, en situacions on la glucòlisi està afavorida sobre la gluconeogènesi com és el cas d'una forta ingesta de carbohidrats (Van Schaftingen *et al.*, 1980) o durant la realimentació després d'un període de dejuni els nivells de Fru-2,6-P₂ tissulars són elevats. Durant la incubació d'hepatòcits amb agonistes α-adrenèrgics (Hue, 1981) la Fru-2,6-P₂ també es troba elevada degut a la mobilització de les reserves de glucogen amb els conseqüents augments en la concentració de la Fru-6-P. En la situació oposada, on el flux gluconeogènic és superior al glicolític els nivells de Fru-2,6-P₂ es mantindran baixos. Aquesta situació s'observa durant el dejuni (Van Schaftingen, 1980), la diabetis (Gil *et al.*, 1986), la regeneració (Rosa *et al.*, 1990), o com a conseqüència de la incubació d'hepatòcits amb glucagó, adrenalina (Hue *et al.*, 1981; Furuya *et al.*, 1982) etanol o substrats gluconeogènics (Hue and Bartrons, 1984; Van Schaftingen *et al.*, 1984). En contraposició a aquestes dades, quan la glucòlisi és estimulada per anòxia no s'observen increments dels nivells hepàtics de Fru-2,6-P₂, suggerint que en aquestes condicions són els nucleòtids i el P_i els principals reguladors glicolítics (Hue, 1982).

A més de en fetge, en tots els altres teixits de mamífer s'ha detectat la presència de Fru-2,6-P₂. En canvi, hi ha menys evidències de com aquest metabòlit bisfosforilat regula el flux glicolític en aquests teixits. En tots els teixits s'han observat increments de Fru-2,6-P₂ en resposta a l'estimulació per glucosa del metabolisme energètic excepte a astròcits en cultiu (Pauwels and Trouet, 1984). En canvi, a l'igual que en fetge, no s'han observat en cap d'ells modificacions que vagin en paral·lel amb l'augment de la velocitat de glucòlisi en condicions anòxiques. S'ha suggerit que la Fru-2,6-P₂ pot jugar un paper important en l'efecte d'estalvi de glucosa degut als àcids grassos, cossos cetònics i altres

substrats alternatius a la glucosa. Aquest efecte s'ha observat a múscul esquelètic i cardíac on es produeix una disminució en els nivells de Fru-2,6-P₂ amb la presència de cossos cetònics i àcids grassos lliures (Rider and Hue, 1987; French et al., 1988). Durant la diabetis s'ha observat disminucions de Fru-2,6-P₂ a cor, teixit adipós i testicles (revisat per Rider and Hue, 1987). En múscul esquelètic, l'estimulació elèctrica a menys de 5 Hz no estimula apreciablement la producció de lactat o la degradació de glucogen però sí augmenta els nivells de Fru-2,6-P₂. En canvi, l'estimulació a freqüències més altes sí estimula la glucòlisi però alhora indueix caigudes en els nivells de Fru-2,6-P₂. D'aquesta forma, sembla que la Fru-2,6-P₂ no jugui un paper transcendent en l'estimulació de la glucosa durant la contracció muscular (Minatogawa and Hue, 1984). La insulina i l'adrenalina incrementen el flux glicolític i la Fru-2,6-P₂ a múscul esquelètic i cor (Rider and Hue, 1987). També es troba implicada en l'alliberament d'insulina per part del pàncreas (Sener et al., 1984) i en l'estimulació per insulina de la glicòlisi en teixit adipós (Sobrinho and Gualberto, 1985). Altres teixits com els eritròcits presenten uns nivells massa baixos i estables per poder suposar que puguin controlar efectivament la glucòlisi (Sobrinho et al., 1987; Gallego and Carreras, 1989). A fibroblastes, limfòcits, macròfags i altres tipus cel·lulars s'han observat increments en els nivells de Fru-2,6-P₂ per exposició a insulina, ésters de forbol i altres mitògens (Farfanaro et al., 1984; Boscà et al., 1985; Boscà et al., 1988; Bustos and Sobrinho, 1989; Taylor et al., 1990; Denis-Pouxviel et al., 1990; Baulida et al., 1992). En línies cel·lulars canceroses, on la glucòlisi es troba augmentada, els nivells de Fru-2,6-P₂ són més elevats que en els corresponents teixits normals (Mojena et al., 1985). Una situació similar s'observa quan fibroblastes d'embrió de pollastre són transformats amb els oncogens *v-src* o *v-fps* (Boscà et al., 1986; Marchand et al., 1992).

La Fru-2,6-P₂ està present a neurones i astròcits cerebrals a uns nivells que es troben dintre del rang de concentracions que es consideren modificadores de l'activitat PFK-1 cerebral, donat que la concentració per obtenir el 50% d'activació s'ha calculat com 4.5 µM (Foe and Kemp, 1985) (Figura 2.1) i la concentració tissular és de l'ordre de 5-6 nmol/g (Pauwels and Trouet, 1984; Yamamoto et al., 1990; Ventura et al., 1991; Ambrosio et al., 1991). Kuwajima i Uyeda (1982), van observar que els seus nivells disminueixen durant la hipoglicèmia aguda per administració d'insulina. Hi ha evidències que indiquen que els nivells de Fru-2,6-P₂ no es modifiquen amb l'estimulació de la glucòlisi per glucosa ni en l'estimulació per andèxia en cèl·lules cerebrals (Pauwels and Trouet, 1984). Ogushi et al. (1990), van obtenir resultats similars *in vivo* suggerint que la regulació del consum de glucosa cerebral en aquestes condicions es devia fonamentalment a l'acció dels nucleòtids, el P_i i la ribosa 1,5-bisfosfat (Rib 1,5-P₂) descrit com un nou activador transitori de la PFK-1 durant la isquèmia completa. En

canvi, Yamamoto *et al.* (1990) han descrit, en un model d'isquèmia *in vivo* per lligació de les artèries carotídiades, augments de Fru-2,6-P₂ paral·lels a l'activació del consum de glucosa i la producció de lactat i anteriors als canvis en els nivells dels nucleòtids o el P_i suggerint que aquest metabòlit sí jugaria un paper en l'activació de la PFK-1 durant els episodis d'isquèmia cerebral.

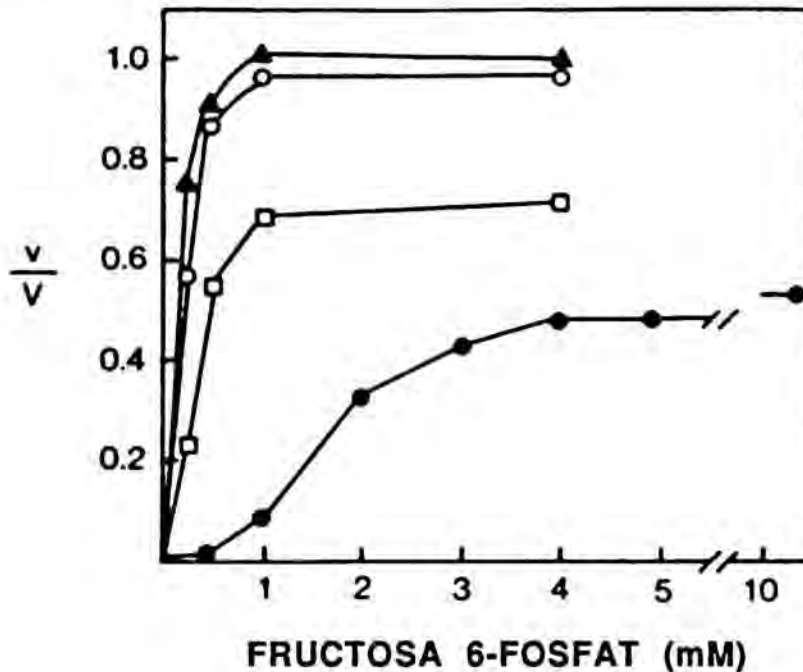


Figura 2.1.- Activació de la PFK-1 cerebral per fructosa 2,6-bisfosfat, AMP i P_i a pH 7.2.

Figura adaptada de Foe and Kemp, (1985). L'activitat va ser mesurada a una concentració d'ATP 0.5 mM. Els símbols utilitzats són: (●), cap addició; (◻), 1mM AMP; (▲), 45mM Fructosa 2,6-bisfosfat; (○), 2mM P_i.

Per identificar les condicions en les que la Fru-2,6-P₂ pugui exercir control sobre la glucòlisi cerebral, l'abordatge més senzill consisteix en la búsqueda de condicions on el consum de glucosa i el nivells de Fru-2,6-P₂ variessin en la mateixa direcció. Per això, i en base a aquestes dades ens vam plantejar l'estudi del paper d'aquest metabòlit bisfosforilat estudiant situacions on variés aquest flux:

1. Situacions d'interrupció aguda de l'aportació de substrats energètics.
2. Situacions d'aportació de substrats energètics alternatius a la glucosa.
3. Variacions durant el desenvolupament.

METABOLISME CEREBRAL DURANT L' ISQUEMIA

L'activitat cerebral depèn per a les seves necessitats del bescanvi de nutrients i productes de rebuig amb l'exterior. Donat que la isquèmia és un procés on s'altera la circulació cerebral, les conseqüències bàsiques seran un tall en el subministrament d'oxigen i altres substrats energètics i una acumulació de productes residuals en el cervell. En aquestes condicions, el cervell actuarà com un sistema biològic tancat.

El metabolisme energètic cerebral és simplificadament l'equilibri entre la utilització de l'ATP i la seva resíntesi per fosforil·lació de l'ADP. Durant l'activitat intensa o manca de substrats externs, els nivells d'ATP poden ser compensats momentàniament per variacions en els equilibris de la creatina quinasa i l'adenilat quinasa i per un augment en la glucòlisi cerebral que compensi el menor rendiment energètic dels substrats obtingut en condicions anòxiques (Siesjö, 1988). Seguint la completa interrupció de la circulació sanguínea cerebral i la caiguda de les reserves energètiques intracel·lulars, els nivells d'ATP s'exhaureixen totalment en un temps entre 5-10 minuts així com la càrrega energètica tissular (Figura 2.2 i 2.3) expressada com:

$$C.E. = \frac{[ATP] + 0.5 [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Les reserves tissulars de fosfocreatina (PCr) són consumides durant el primer minut d'isquèmia en animals no anestesiats o els primers minuts en animals prèviament anestesiats. S'ha observat que l'anestèsia amb anestèsics com el pentobarbital indueixen un enlentiment en els processos metabòlics cerebrals que es tradueixen en una menor velocitat de consum dels substrats endògens en situacions d'anòxia o isquèmia (Lowry *et al.*, 1964). Aquesta ràpida caiguda de PCr es pot explicar pel fet que les concentracions d'ADP i H⁺ són ràpidament incrementades i desplacen l'equilibri de la reacció que catalitza la creatin-quinasa ($PCr + ADP + H^+ \rightleftharpoons Cr + ATP$) (Siesjö *et al.*, 1972).

Com s'observa a la figura 2.2, la concentració de lactat arriba a un valor màxim als 2-3 minuts d'isquèmia. Aquest resultat és coherent amb el fet que durant la isquèmia completa la producció de lactat està limitada per les reserves tissulars (Lowry *et al.*, 1964). En paral·lel amb aquest increment de lactat es produeix una disminució del pH intracel·lular fins arribar a un valor *plateau* proper a 6.5 (Brooks *et al.*, 1989). En contrast, la degradació de fosfolípids de membrana amb la conseqüent aparició d'àcids grassos lliures no arriba a un valor *plateau* sinó que augmenta al llarg del temps d'isquèmia (Ljunggren *et al.*, 1974).

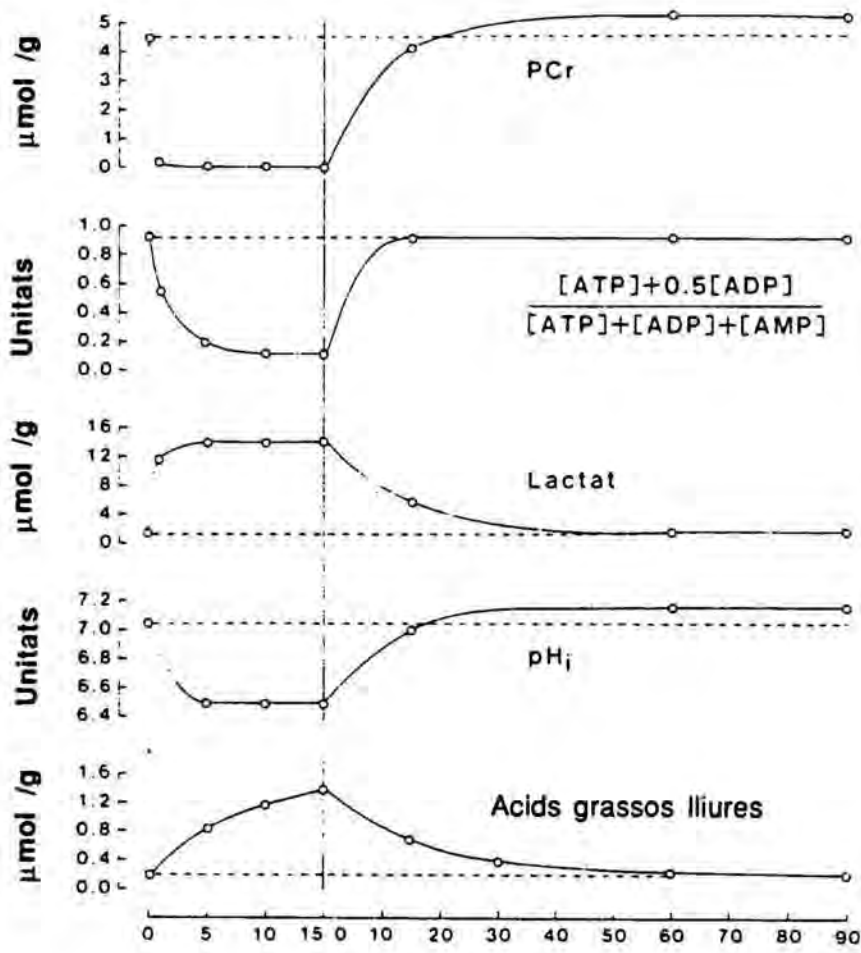


Figura 2.2.- Canvis en el pH_i, càrrega energètica i concentracions cerebrals de fosfocreatina, lactat i àcids grassos lliures durant la isquèmia completa i posterior recircul.lació.

Adaptada de Siesjö, (1984).

La caiguda en la càrrega energètica i el bloqueig dels transportadors iònics de membrana permet la sortida de K⁺ de l'interior cel.lular que alhora conduïx a l'entrada de Ca²⁺ al citoplasma. A més la degradació dels nucleòtids fosforil.lats produeix l'acumulació d'adenosina lliure i l'alliberament de neurotransmissors. Donat que la noradrenalina i l'adenosina són coneguts activadors de receptors amb activitat adenilat ciclase, el resultat serà una acumulació de fins a 8 vegades els valors control de AMP cíclic (AMPC) (Watanabe and Ishii, 1976). Neurotransmissors com el glutamat o l'aspartat, que actuen activant canals de Ca²⁺, produiran també entrada d'aquest iò a l'interior cel.lular. L'acumulació de Ca²⁺ i AMPC provocarà, entre altres efectes, l'immediata mobilització de les reserves del glucogen present en astròcits i neurones per

activació de la glucogen fosforil.lasa. Els astròcits, amb un contingut de glucogen més elevat, poden utilitzar-lo produint un estalvi de glucosa del qual es beneficien les neurones del seu entorn. L'ordre d'utilització dels substrats endògens per part del cervell és PCr, glucosa, glucogen i ATP respectivament .

La mobilització dels substrats endògens es produeix amb una activació de 4 a 7 vegades en el flux glicolític. Estudis de cross-over amb les variacions en les concentracions dels metabòlits intermediaris de la glucòlisi donen evidències que l'únic punt important de control és el pas que catalitza la PFK-1 (Lowry *et al.*, 1964). Altres punts de control coneguts com l'hexoquinasa i la piruvat quinasa no s'han identificat com a punts de control especialment importants en aquests processos. En un model d'isquèmia completa per decapitació aquesta activació té lloc en els primers 30 segons mentre posteriorment es produeix una inoperativitat de tota la via en un moment on els intermediaris glicolítics es troben gairebé exhaurits. Resultats similars s'han trobat en models d'isquèmia per lligació de les artèries carotídees o durant la perfusió hipòxica o anòxica (Kintner *et al.*, 1980; Yamamoto *et al.*, 1990). Interessantment, en aquests models s'observa que la reperfusió normòxica després d'un període isquèmic o anòxic produeix, en primer terme, una acumulació d'hexoses 6-fosfat, indicant un bloqueig del metabolisme energètic a nivell de la PFK-1 reversible amb el temps (Kintner, 1980).

FUNCIO DE LA FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT DURANT L' ISQUEMIA

Tots els models d'isquèmia completa plantegen el problema metodològic d'establir sense error el temps zero d'isquèmia. En els mètodes clàssics de congelació per immersió en nitrogen líquid existeix un marge de temps important fins que el teixit adquireix una temperatura on es bloquegen les reaccions metabòliques. Aquest problema és més important en estructures molt protegides de l'exterior i de dissecció relativament lenta com en el cas del cervell. El temps de congelació per immersió en nitrogen líquid estimat per mesura de la temperatura amb termoparells introduïts a diferent profunditat en les capes corticals era aproximadament de 30 segons per a capes situades a 5 mm de profunditat (Obrenovitch *et al.*, 1988). Per eliminar aquesta incertesa en el temps de congelació en els anys 60 es van desenvolupar tècniques de congelació ràpida com l'aparell de "freeze-blown" dissenyat per Veech *et al.* (1973).

Per obtenir mostres carents de isquèmia artefactual post-mortem vam utilitzar en el nostre model de rata mascle Sprague-Dawley el mètode de sacrifici per radiació de microones (Ventura *et al.*, 1990; Ambrosio *et al.*, 1990). En aquest mètode els animals rebien una radiació de microones, focalitzada al crani, de 4.5 kW durant 0.8 segons de

forma que es produeix instantàneament la desnaturalització de les proteïnes cerebrals. Aquesta tècnica permet obtenir dades de metabòlits termoestables molt properes al temps zero d'isquèmia. Per a les determinacions d'activitats enzimàtiques vam utilitzar el mètode clàssic de decapitació en nitrogen líquid. A la Figura 2.3 pot observar-se la comparació en els nivells de nucleòtids d'adenina en el cervell de rates sacrificades per els dos mètodes. Clarament es pot deduir que, en consonància amb les dades anteriors, el temps necessari per aturar els processos metabòlics per congelació és d'aproximadament 30 segons (Veech *et al.*, 1973; Obrenovitch *et al.*, 1988). Com havia estat descrit, en el nostre model s'apreciava una forta caiguda en els nivells d'ATP, gairebé exhaurits als 10 minuts, mentre augmentaven els nivells d'AMP en primer terme, i posteriorment els d'adenosina lliure (Figura 2.3).

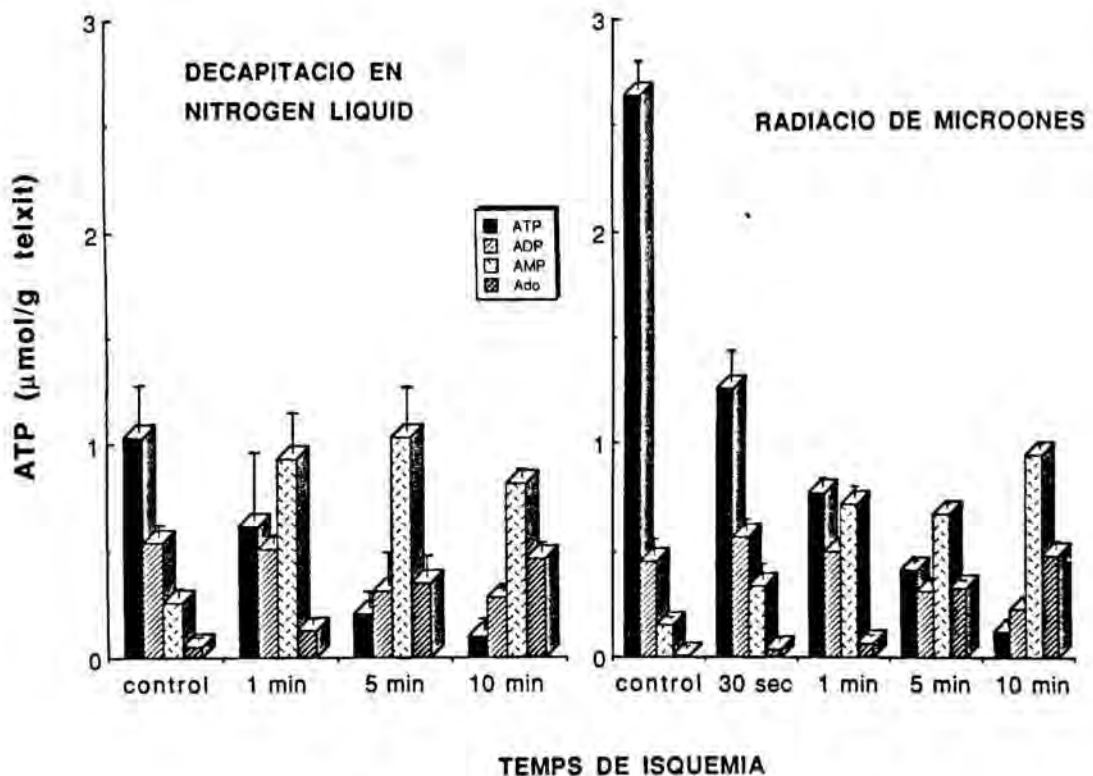


Figura 2.3.- Concentracions cerebrals de nucleòtids d'adenina durant la isquèmia completa.

En aquesta figura es poden comparar els valors obtinguts utilitzant els dos mètodes de sacrifici descrits: radiació de microones i decapitació en nitrogen líquid. Es pot apreciar l'existència d'un desfàs de 30 segons entre les dues gràfiques que correspon al temps d'isquèmia artefactual inherent al temps de congelació en el mètode de decapitació en nitrogen líquid. Les mesures van ser efectuades per HPLC. Cada barra representa el valor promig de 5-7 animals \pm S.E.M..

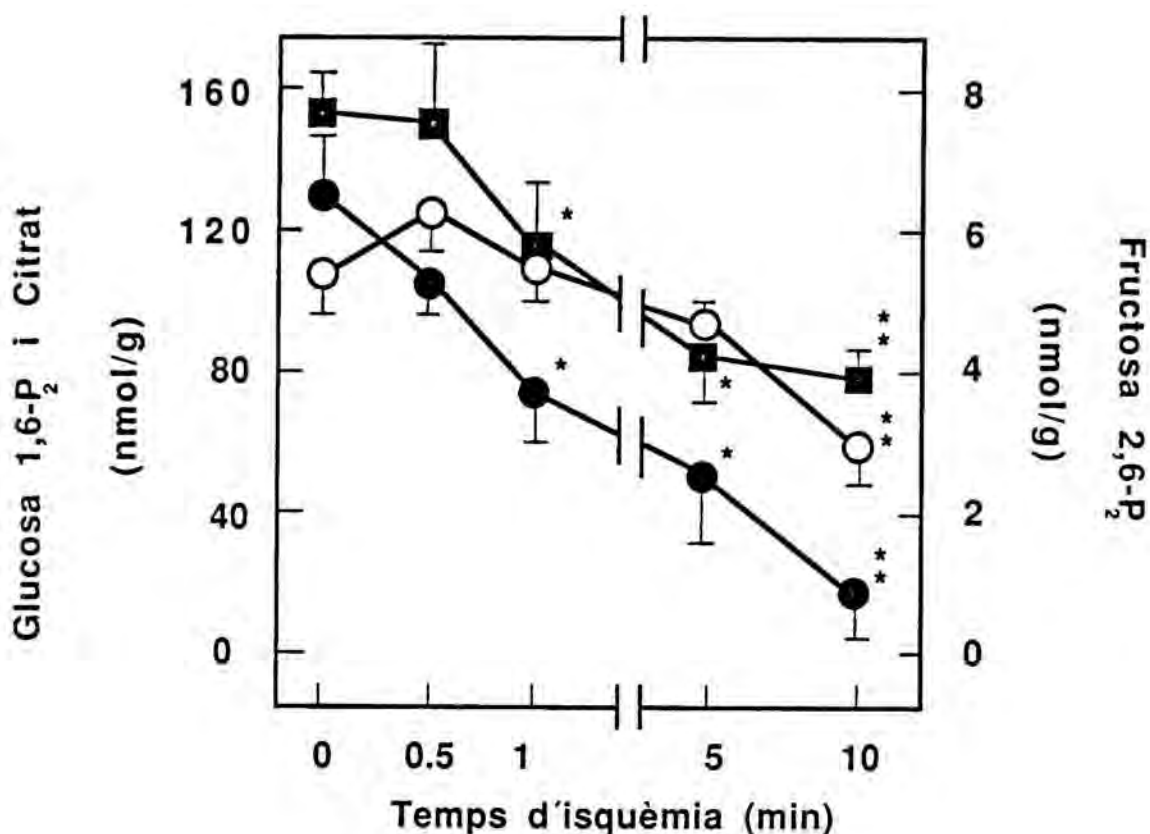


Figura 2.4.- Concentracions de fructosa 2,6-bisfosfat, glucosa 1,6-bisfosfat i citrat en cervell de rata durant l'isquèmia completa.

Les mesures de fructosa 2,6-bisfosfat (○), glucosa 1,6-bisfosfat (●), i citrat (■) van ser efectuades utilitzant els mètodes descrits a Ventura *et al.*, (1991a) en cervells d'animals sacrificats per radiació de microones. Els punts representen els valors promig de 5-6 animals \pm S.E.M.. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En base a les dades que indicaven que eren les modificacions en l'activitat PFK-1 les que controlaven el metabolisme hidrocarbonat en aquestes condicions experimentals vam mesurar els nivells de tres coneguts modificadors d'aquesta activitat: Fru 2,6-P₂, Glu 1,6-P₂ i el citrat. Com s'observa a la figura 2.4 els nivells de Fru 2,6-P₂ es mantenen a nivells similars als control durant el primer minut d'isquèmia, fins i tot amb un lleuger increment no significatiu als 30 segons per posteriorment disminuir significativament fins un valor mínim als 10 minuts d'isquèmia. Un perfil similar segueixen les concentracions de citrat mentre la Glu 1,6-P₂, com havia estat prèviament descrit per Passonneau *et al.* (1969), cau notablement des dels primers segons d'isquèmia per gairebé desaparèixer als 10 minuts. La caiguda en els nivells de Fru 6-P (Lowry *et*

al., 1964; Kintner *et al.*, 1980; Yamamoto *et al.*, 1990) i en els nivells d'ATP explicarien la baixada en els nivells de Fru 2,6-P₂ obtinguda durant la progressió de la isquèmia malgrat aquesta no sigui tan acusada com la dels seus substrats. Aquesta afirmació es reforça per la bona correlació obtinguda entre les concentracions de Fru 2,6-P₂ i els d'ATP per sota 1 μM ($r=0.82$ $P<0.0001$) (Fig 2.5). En aquesta mateixa figura també s'aprecia com a concentracions d'ATP intermitges (1-2 μM) i que corresponen a un temps d'isquèmia de 30 segons, els nivells de Fru 2,6-P₂ augmenten lleugerament.

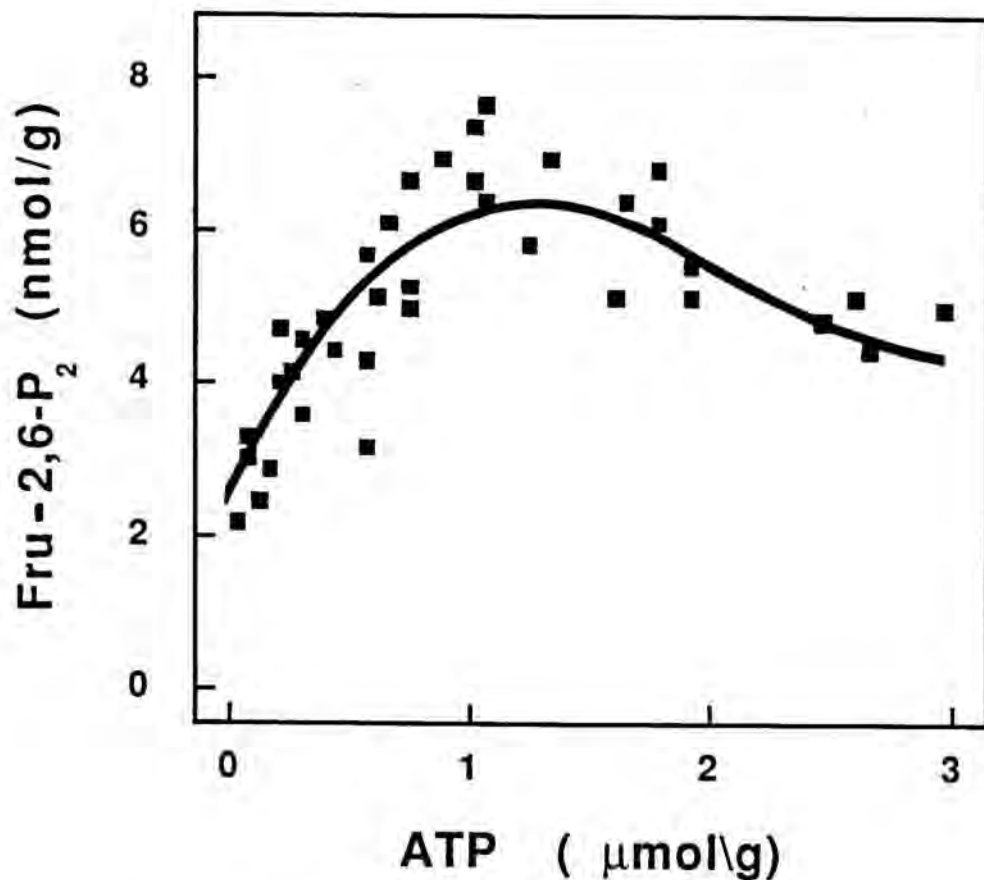


Figura 2.5.- Correlació entre els nivells cerebrals de fructosa 2,6-bisfosfat i els d'ATP.

Cada punt representa un animal. Per valors d'ATP inferiors a 1 nmol/g la correlació és lineal ($r=0.82$ $p<0.0001$).

Les activitats dels enzims implicats en el metabolisme de la Fru 2,6-P₂ es van determinar (Figura 2.6). L'activitat 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK-2) present a cervell és aproximadament 10 vegades inferior a l'obtinguda a fetge (Van Schaftingen, 1987; Hue & Rider, 1987). El fet de no obtenir variacions en l'activitat quinasa ni en la fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2) al llarg del temps d'isquèmia i el no haver-se trobat fins el moment variacions de les seves activitats per modificacions covalents (Ventura *et al.*,

1991, Ventura *et al.*, 1992) suggereix que les variacions de Fru 2,6-P₂ es deuen a modificacions en la disponibilitat dels seus substrats i possibles modificadors al·lostèrics. El lleuger increment en els nivells durant els primers instants podria estar lligat a la mobilització de les reserves de glucogen amb el consegüent augment puntual de les concentracions d'hexoses 6-fosfat i la caiguda posterior seguiria també la caiguda d'aquests metabòlits i els altres intermediaris de la via. És interessant assenyalar que l'alta relació d'activitats quinasa/bisfosfatasa d'aproximadament 11 permet mantenir els relativament alts nivells de metabòlit, comparat amb l'activitat quinasa hepàtica, malgrat la baixa activitat quinasa cerebral. A més, la baixíssima activitat FBPassa-2 explicaria la relativament suau caiguda dels nivells de Fru 2,6-P₂ quan, en aquestes condicions, els nivells de Fru 6-P i ATP estan pràcticament exhaurits.

Per la seva part, l'activitat PFK-1, mesurada en condicions de V_{max}, es manté constant durant els primers minuts d'isquèmia, per disminuir posteriorment en un 30% als 10 minuts. Donat que no hi ha evidències clares de modificacions d'activitat per modificació covalent per fosforil·lació de l'activitat de la PFK-1 (Foe and Kemp, 1984), aquesta disminució d'activitat podria estar lligada a l'entrada de Ca²⁺ a l'interior cel·lular i que activaria proteases específiques Ca²⁺-depenents juntament amb el blocatge de la síntesi proteica.

Condicció Experimental		Fru 2,6-P ₂ (nmol/g)	PFK-1 (U/g)	PFK-2 (mU/g)	FBPassa-2 (mU/g)	Ratio PFK-2/FBPassa-2
CONTROL	(6)	5.8 ± 0.4	32.8 ± 1.0	0.50 ± 0.05	0.05 ± 0.01	11.7 ± 0.6
ISQUEMIA 1 min	(5)	5.7 ± 0.4	34.1 ± 2.3	0.55 ± 0.07	N.D.	N.D.
ISQUEMIA 5 min	(4)	4.7 ± 0.3 *	30.5 ± 0.7	0.46 ± 0.05	N.D.	N.D.
ISQUEMIA 10 min	(4)	3.1 ± 0.5 **	21.7 ± 1.8 **	0.43 ± 0.11	0.04 ± 0.01	11.0 ± 2.6

Figura 2.6.- Activitats enzimàtiques dels enzims relacionats amb el metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat durant la isquèmia.

Les mesures van ser efectuades segons els mètodes descrits a Ventura *et al.*, (1991a). Els valors representen el promig ± S.E.M. de 4-6 animals. Les diferències estadísticament significatives s'indiquen com: * p<0.05; ** p<0.01.

La caiguda dels nivells de Glu 1,6-P₂ seria probablement conseqüència de, a més de la caiguda dels seus substrats, l'increment de IMP i Ca²⁺ que actuen com activadors de la glucosa 1,6-bisfosfatasa (Wakelam et al., 1982; Guha and Rose, 1983). La Glu 1,6-P₂ no explicaria l'activació de la PFK-1 que s'observa durant el primer minut d'isquèmia completa, donat que en aquest període està disminuint la seva concentració. Encara que diversos punts de control de la glucòlisi cerebral són activats o inhibits per la Glu 1,6-P₂ aquests efectes són obtinguts d'una forma més sensible per altres metabòlits. L'isoenzim de l'hexoquinasa present a teixit cerebral és inhibit per la Glu 1,6-P₂ però aquesta inhibició és set vegades menys sensible que l'efectuada per la pròpia Glu 6-P (Rose *et al.*, 1975). L'activació induïda per la Glu 1,6-P₂ sobre la PFK-1 és 10 i 100 vegades menys sensible que les induïdes per la Rib 1,5-P₂ i la Fru 2,6-P₂ respectivament (Yip *et al.*, 1988; Ogushi *et al.*, 1990; Ishikawa *et al.*, 1990).

Recentment, Ogushi *et al.* (1990) han descrit augments transitoris de Rib 1,5-P₂ durant els primers 5 segons d'isquèmia suggerint que actuaria com a desencadenant de l'activació del metabolisme hidrocarbonat observada durant la isquèmia. Malgrat això, els nivells de Rib 1,5-P₂ disminueixen a partir dels 5 segons quan la PFK-1 es troba encara activant-se (Lowry et al., 1964). Els autors expliquen aquest fet per l'augment que aquesta primera activació produiria en els nivells de Fru 1,6-P₂ i que mantindrien activada la PFK-1 d'una forma autocatalítica. Mentre els nivells de Rib 1,5-P₂ màxims són del mateix ordre que els de Fru 2,6-P₂, l'afinitat de la PFK-1 per la Rib 1,5-P₂ és aproximadament 9 vegades menor de forma que el paper d'activador postulat per aquest metabòlit encara és un interrogant i manquen més evidències que ho confirmin.

En una situació similar es troba la Fru 2,6-P₂, tot i sent el més potent activador de la PFK-1 cerebral descrit fins el moment. Malgrat la PFK-1 cerebral és molt sensible a petites modificacions en els nivells de Fru 2,6-P₂ els augments en els nivells del metabòlit observats durant els primers moments d'isquèmia (Fig 2.4; Yamamoto *et al.*, 1990) són molt petits per explicar una forta acceleració del flux glicolític. La forta activació inicial observada sembla més lligada als augments d'AMP, el P_i i la disminució de l'ATP que a l'efecte dels metabòlits bisfosforilats. Això no exclou la necessitat cel.lular de mantenir els elevats nivells del metabòlit per tal d'actuar sinèrgicament amb els augments d'AMP i la disminució d'ATP i aconseguir la màxima activació de la PFK-1. En aquest sentit el perfil dels nivells de Fru 2,6-P₂ correspon al d'activació del flux glicolític. A més, durant la recirculació després d'un episodi isquèmic, quan els nivells d'AMP, P_i, NH₄⁺ i K⁺, coneguts activadors de la PFK-1, són alts i els d'ATP, citrat, coneguts inhibidors, són baixos, s'obté un acúmul d'hexoses 6-fosfat que indicaria un estat de baixa activació de la PFK-1 (Kintner, 1980). Aquest estat d'inhibició post-isquèmic, juntament amb la

baixada a la V_{max} de la PFK-1 i la baixada del pH intracel·lular, sí podria estar relacionat amb els baixos nivells de metabòlits bisfosforilats, i en especial de la Fru 2,6-P₂ com a activador més sensible. Tots aquests resultats suggereixen que el paper desenvolupat per aquest metabòlit sigui el manteniment de la PFK-1 en una situació d'activació permissiva essencial que mantingui permanentment activat el flux glicolític però no el d'induir l'activació ràpida de la glucòlisi en condicions d'isquèmia o anòxia.

LESIONS NEURONALS SELECTIVES: HIPOTESI EXCITOTOXICA

Malgrat la hipoglicèmia i la isquèmia són trastorns cerebrals clarament diferenciats, les lesions neuronals que produeixen són molt similars. A més, les dues condicions són bàsicament trastorns del metabolisme energètic cerebral on es produeix impediment en la producció cel·lular d'energia per disminució en el subministrament de glucosa (hipoglicèmia) o de glucosa i oxigen (isquèmia).

En les dues condicions s'ha observat alliberament dels aminoàcids neurotransmissors excitadors glutamat i aspartat (Beneviste *et al.*, 1984; Wieloch, 1985). Aquestes dades recolzen la hipòtesi, introduïda per Olney (1971) de la mort neuronal selectiva induïda per la neurotoxicitat del glutamat i aminoàcids excitadors estructuralment relacionats. Aquesta hipòtesi prediu que la mort neuronal és deguda a l'alliberament de compostos excitadors endògens que s'uniran als seus receptors neuronals específics causant la mort cel·lular per hiperexcitació. Les cèl·lules glials no són afectades en primer terme degut a la manca de receptors excitatoris en la seva membrana plasmàtica.

La mort neuronal primària és atribuïble a una entrada de Na⁺, Cl⁻ i H₂O que produeix osmolisi cel·lular. Aquesta entrada es produeix per una despolarització de la membrana neuronal donada la incapacitat de la bomba de Na⁺/K⁺ ATP-depenent de restablir l'equilibri iònic (Meyer, 1989). Aquesta incapacitat vindrà donada per la disminució en els nivells d'ATP característica d'aquestes situacions (Siesjö, 1981). En canvi, la mort neuronal retardada és induïda per un influx de Ca²⁺, inicialment a través del receptor de NMDA que constitueix en sí mateix un canal de Ca²⁺. Aquesta teoria no exclou tampoc l'entrada de Ca²⁺ en les neurones a través de canals de Ca²⁺ voltage-depenents un cop la neurona es troba despolaritzada.

Aquesta hipòtesi probablement explica el fenomen de la vulnerabilitat neuronal selectiva (Wieloch, 1985). Breus períodes d'isquèmia produeixen lesions selectives a les

regions CA1 i CA4 de l'hipocamp. Isquèmies més prolongades provoquen, a més, lesions a la regio CA3 de l'hipocamp i al caudat i el putamen (Pulsinelli, 1985). Estudis autoradiogràfics d'unió d'agonistes han demostrat que el receptor de NMDA està concentrat a les neurones de les regions CA1 i CA4 mentre el receptor de kainat (un altre tipus de receptor de glutamat que actua com un bescanviador de Na^+/K^+) està localitzat a les terminacions de les fibres de les neurones de la regió CA3 i en el caudat i putamen. D'aquesta forma la distribució dels receptors d'aquests aminoàcids correspon a les regions amb una major sensibilitat a la hipoglicèmia i la isquèmia. Confirmant aquests resultats s'ha observat que els antagonistes d'aquests receptors milloren la resposta neuronal a les lesions induïdes per la hipoglicèmia (Wieloch, 1985) i la isquèmia (Simon *et al.*, 1984).

METABOLISME CEREBRAL DURANT L' HIPOGLICEMIA

Tal i com s'havia comentat anteriorment a la introducció, el transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica no és un procés limitant del consum de glucosa per part del cervell en condicions normals (Lund-Andersen and Kjeldsen, 1977). Però, en condicions on es produeix una disminució en la concentració plasmàtica de glucosa, la velocitat d'entrada pot esdevenir limitant en aquest consum a concentracions plasmàtiques inferiors a 2 mM (revisat a Siesjö, 1988).

En aquestes condicions on l'influx s'igualava amb el consum es produeix la metabolització de les reserves de glucosa lliure intracel·lulars. Mesures del consum cerebral de glucosa amb tècniques radioactives indiquen que una hipoglicèmia moderada ja disminueix significativament (aproximadament un 10%) aquest consum, mentre a concentracions de glucosa plasmàtica entre 1 i 2 mM aquest descens es situa, depenent de les àrees, entre un 15 i un 36% (Bryan *et al.*, 1986). Donat que la hipoglicèmia s'aconsegueix experimentalment per administració d'insulina calia estudiar si aquestes variacions no eren degudes artefactualment a la hiperinsulinèmia. Duckow (1988) va demostrar la manca de variacions en el consum de glucosa en animals hiperinsulinèmics en condicions de normoglicèmia de forma que les variacions no són atribuïbles a l'increment d'insulina. A més, durant la hipoglicèmia hi ha una reducció superior en el consum de glucosa que en el consum cerebral d'oxigen indicant que en aquest estat es produeix oxidació d'altres substrats a més de la glucosa exògena (Siesjö, 1988). Hi ha evidències que indiquen que la hipoglicèmia pronunciada produeix el consum de les reserves tissulars, primer de glucosa lliure en el període d'estupor i després de glucogen i altres substrats endògens quan s'arriba a l'estat de coma (Lewis *et al.*, 1974; Ghajar *et al.*, 1982). És interessant el fet que, donat que les reserves de glucogen es troben

fonamentalment a les cèl.lules glials, sembla que es produeix la metabolització de la glucosa a la glia i des d'aquesta es produeix un aport de carbohidrats i substrats energètics cap a les neurones confirmant la idea d'una funció nutritiva de les cèl.lules glials vers les neurones (Tsacopoulos *et al.*, 1988).

Aquesta oxidació de glucogen i altres substrats permet que la caiguda de la càrrega energètica cerebral sigui moderada. Durant els primers estadis de la hipoglucèmia les concentracions de PCr, ATP, ADP i AMP es mantenen inalterades i és només durant els primers minuts de coma hipoglucèmic quan els nivells d'ATP cauen un 25-30%, amb els conseqüents augments de AMP (Figura 2.7). Posteriorment els nivells d'ATP es mantenen relativament estables i es produeix una degradació de l'AMP amb increment de l'adenosina, IMP, inosina i hipoxantina (Chapman *et al.*, 1981).

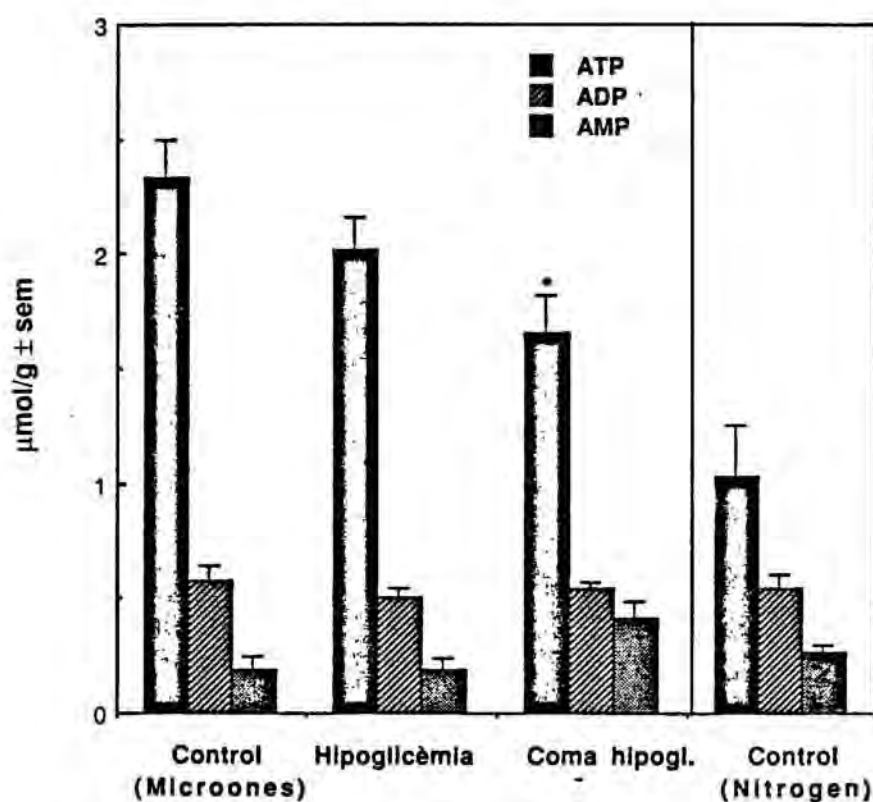


Figura 2.7.- Concentracions cerebrals de nucleòtids d'adenina durant la hipoglucèmia experimental.

Les mesures van ser efectuades per HPLC en cervells d'animals sacrificats per radiació de microones. Els animals s'han agrupat segons el seu grau d'hipoglucèmia i resposta a estímuls: hipoglucèmia lleugera (2-3 mM de glucosa plasmàtica); coma hipoglucèmic (1-2 mM de glucosa plasmàtica). Cada barra representa el valor promig de la concentració de cada nucleòtid per 5-7 animals \pm S.E.M.. Les diferències estadísticament significatives s'indiquen com: * $p < 0.05$.

Curiosament també es produeix ràpidament una caiguda dels nivells de piruvat i lactat de forma que la hipoglucèmia no està acompanyada d'acidosi i les variacions de pH intracel·lular només es produeixen de forma poc important en estadis molt avançats (Pelligrino *et al.*, 1981; Brooks *et al.*, 1989). Un cop exhaurits els nivells de glucosa i glucogen es produeix una caiguda general en tots els intermediaris glicolítics i del cicle dels àcids tricarboxílics (Figura 2.8) (Lewis *et al.*, 1974; Norberg and Siesjö, 1976; Gorell *et al.*, 1977). Amb la caiguda dels intermediaris del metabolisme energètic es produeix la utilització dels aminoàcids lliures per medi de les reaccions anapleròtiques del cicle dels àcids tricarboxílics, principalment glutamina, glutamat, alanina i GABA amb els corresponents augments dels nivells intracel·lulars d'amoni (Tews *et al.*, 1965).

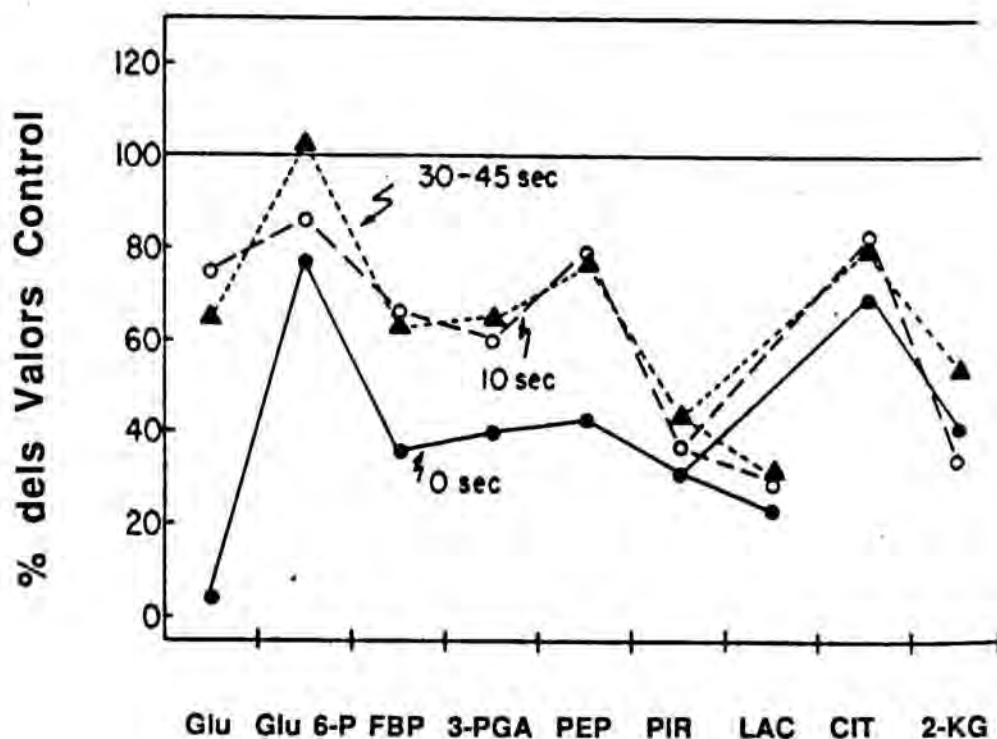


Figura 2.8.- Canvis percentuals en la concentració de diversos intermediaris del metabolisme energètic durant la hipoglucèmia i la seva recuperació.

Adaptada de Gorell *et al.* (1977). A la figura s'observen les variacions percentuals, respecte a controls normoglucèmics, de la concentració de diversos intermediaris del metabolisme energètic cerebral durant el coma hipoglucèmic i també 10 i 30-45 segons després de la injecció intravenosa de glucosa. Les abreviatures utilitzades són: Glu, glucosa; Glu 6-P, glucosa 6-fosfat; FBP, fructosa 1,6-bisfosfat; 3-PGA, 3-fosfoglicerat; PEP fosfo-enol-piruvat; PIR, piruvat; Lac, lactat; CIT, citrat i 2-KG, 2-oxoglutarat.

La hipoglicèmia severa condueix també a una degradació neta de fosfolípids de membrana amb una acumulació d'àcids grassos lliures (Agardh et al., 1981; Wieloch et al., 1984). Durant el coma, el contingut de fosfolípids en l'escorça cerebral disminueix entre un 5 i un 10% (Agardh et al., 1981). Malgrat no hi ha dades que evidencin un augment de la degradació de proteïnes sí s'ha observat un gairebé complet aturament en la seva síntesi en l'escorça i en el hipocamp (Kießling et al., 1984).

S'havia suggerit a partir d'estudis de cross-over que la disminució del consum de glucosa durant la hipoglicèmia podria estar mediat per inhibició de la PFK-1 a més de la disminució en la captació de glucosa. Aquesta afirmació es pot despèndre de l'observació que les hexoses 6-fosfat caiguin menys que la Fru 1,6-P₂ o qualsevol altre intermediari posterior de la via i que després de l'administració de glucosa es produeixi una acumulació d'hexoses 6-fosfat sense modificar-se en la mateixa magnitud els intermediaris de la glucòlisi posteriors a la PFK-1 (Gorell et al., 1977). La recuperació en els nivells de glucogen s'ha descrit que es produeix posteriorment a la recuperació del intermediaris de la via i un cop el flux glicolític ja està normalitzat (revisat a Siesjö and Agardh, 1982)

FUNCIO DE LA FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT DURANT L'HIPOGLICEMIA

Amb tota aquesta informació vam hipotetitzar que la Fru 2,6-P₂ podria tenir una funció important en els processos de disminució del consum de glucosa observats durant la hipoglicèmia. Dades anteriors indicaven que durant la hipoglicèmia experimental es produïa una disminució en els nivells d'aquest metabòlit (Kuwajima and Uyeda, 1982). Ens vam plantejar un model experimental de rates mascles Sprague-Dawley no anestesiades. La hipoglicèmia era induïda per injecció subcutànea de 40 UI/Kg d'insulina. Vam estudiar grups d'animals a diversos temps després de la injecció d'insulina quan els animals presentaven diferents estats de consciència. Els animals eren sacrificats per congelació en nitrogen líquid i per radiació de microones on es minimitzen els efectes d'isquèmia post-sacrifici (Ventura et al., 1991; Ambrosio et al., 1991).

Un grup va ser sacrificat una hora després de la injecció d'insulina presentant un quadre d'hipoglicèmia lleugera amb nivells plasmàtics de glucosa de 2.6 ± 0.1 mM i un comportament normal o lleugers símptomes d'estupor. Al cap de 3-4 hores els animals presentaven estat d'inconsciència sense cap resposta a estímuls externs. En aquest estat, definit com a coma hipoglicèmic segons Gorell et al. (1977) els valors de glucosa plasmàtica disminueixen fins a 1.1 ± 0.3 mM. Un tercer grup corresponia a animals en

estat de coma que eren recuperats per administració oral i subcutànea d'una solució de glucosa al 25%. Aquests animals recuperaven la consciència i un comportament normal en el breu espai de 30 minuts, recuperant també els nivells de glucosa plasmàtica (4.0 ± 0.5 mM).

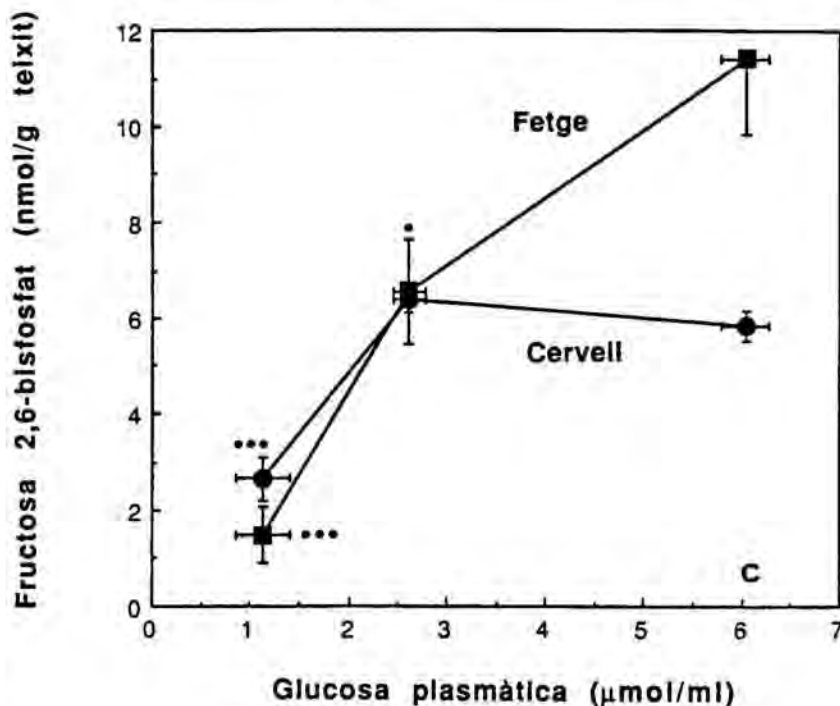


Figura 2.9.- Concentracions cerebral i hepàtica de fructosa 2,6-bisfosfat a diferents nivells de glucosa sanguínea.

Figura obtinguda de Ambrosio *et al.*, (1991). Les dades són el promig \pm S.E.M. de 8-10 animals agrupats com control, hipoglucèmia suau i coma hipoglucèmic. Els resultats significantment diferents dels control s'expressen: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Com es mostra a la figura 2.9 els nivells de Fru 2,6-P₂ cerebrals no s'alteren significativament durant la hipoglicèmia suau mentre els nivells hepàtics dels mateixos animals disminueixen gairebé un 50% per disminuir en un 60 i un 90% respectivament a concentracions de glucosa plasmàtica entre 1 i 2 mM. Aquest resultat demostra que existeix una resposta diferenciada en els dos teixits i que probablement, la Fru 2,6-P₂ té una funció específica en cada un d'aquests dos teixits tan diferentment especialitzats. En situacions d'hipoglicèmia aguda, amb uns nivells de glucosa plasmàtica inferiors a 2 mM, els nivells de Fru 2,6-P₂ cerebrals disminueixen en paral·lel amb la utilització de les reserves d'intermediaris glucolítics, un cop s'han esgotat les reserves de glucosa i

glucogen i quan els nivells d'ATP estan reduïts en un 25-30%. Per tal de correlacionar modificacions del metabòlit amb àrees cerebrals especialment sensibles a la hipoglicèmia (Lewis *et al.*, 1974; Siesjö, 1981; Auer *et al.*, 1984; Meyer, 1988) vam fer un anàlisi dels nivells de Fru 2,6-P₂ en diverses àrees cerebrals (Figura 2.10). Els resultats obtinguts mostren que les concentracions del metabòlit bisfosforilat són molt similars a totes les àrees estudiades al llarg de totes les condicions d'hipoglicèmia suggerint que no hi ha variacions específiques a diferents àrees que poguessin estar relacionades amb una més alta vulnerabilitat a la hipoglicèmia. Igualment, s'observa que la concentració de Fru 2,6-P₂ es normalitza amb l'administració de glucosa a totes les àrees amb el breu espai de 30 minuts. Mesures efectuades una setmana després de l'episodi hipoglicèmic, quan es pot apreciar necrosi específica de les àrees CA1 i CA4 deguda a la mort neuronal retardada, tampoc indicaven cap evidència clara de lligam entre la Fru 2,6-P₂ i la mort neuronal selectiva.

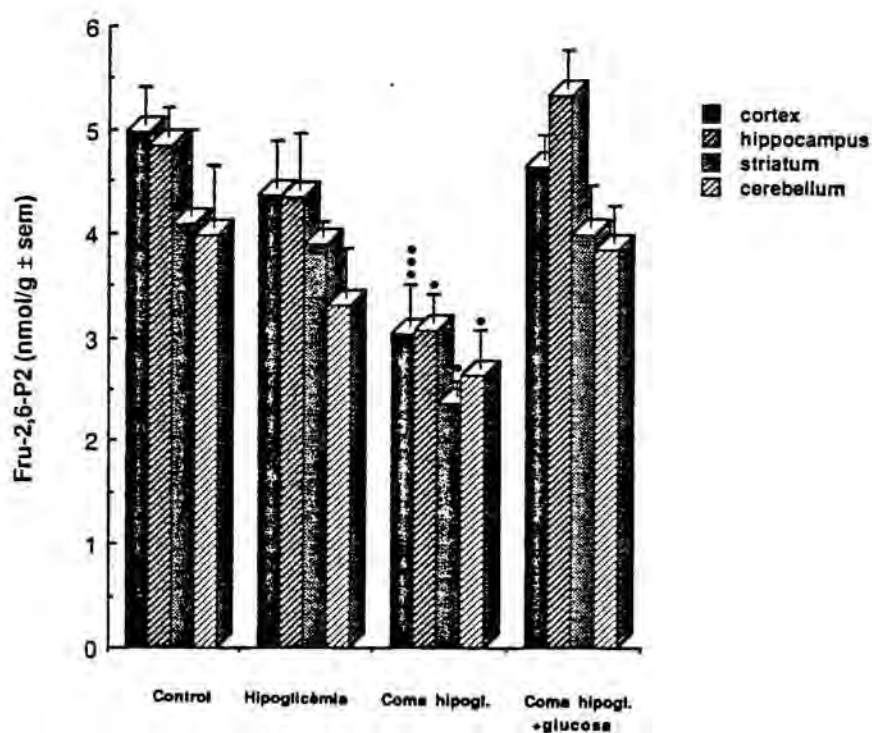


Figura 2.10.- Nivells de fructosa 2,6-bisfosfat en àrees cerebrals durant la hipoglicèmia i la seva recuperació.

Les dades corresponen a animals control (6), hipoglicèmics (5), amb coma hipoglicèmic (7) i una setmana després del coma hipoglicèmic (4). Les dades estan expressades com el valor promig \pm S.E.M. pel nombre d'animals indicat entre parèntesis. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

L'estudi de les activitats responsables de la síntesi i degradació de la Fru 2,6-P₂, PFK-2 i FBPassa-2, respectivament (Figura 2.11) ens mostra que no presenten variacions importants a l'igual que l'activitat PFK-1. Només l'activitat quinasa sembla disminuir lleugerament amb el coma hipoglucèmic per recuperar-se posteriorment amb l'administració de glucosa. Malgrat tot, aquestes variacions podrien ser probablement degudes a variacions en la concentració de metabòlits efectors de la PFK-2 en la situació d'hipoglucèmia i presents en l'assaig d'activitat i no a modificacions específiques d'activitat degudes a cap variació en els nivells d'enzim o a una modificació covalent.

Condicció Experimental	Fru 2,6-P ₂ (nmol/g)	PFK-1 (U/g)	PFK-2 (mU/g)	FBPassa-2 (mU/g)
CONTROL (6)	5.8 ± 0.4	21.2 ± 2.1	0.69 ± 0.07	0.04 ± 0.01
COMA HIPOGLICEMIC (5)	3.5 ± 0.4 **	21.0 ± 2.0	0.48 ± 0.08 *	0.04 ± 0.01
COMA HIPOGLICEMIC + GLUCOSA (5)	4.5 ± 0.3	19.0 ± 1.3	0.77 ± 0.06 **	0.04 ± 0.01

Figura 2.11.- Activitats enzimàtiques dels enzims relacionats amb el metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat durant la hipoglucèmia.

Les mesures van ser efectuades segons els mètodes descrits a Ambrosio *et al.*, (1991). La recuperació va ser induïda per administració de glucosa per via oral i subcutànea i els animals sacrificats 30-60 minuts després de l'administració de glucosa. Els valors representen el promig ± S.E.M. de 4-8 animals. Les diferències estadísticament significatives s'indiquen com: * p<0.05 i ** p<0.01 respecte els animals control; ++ p < 0.01 respecte als valors dels animals en coma.

Totes aquestes dades mostren que mentre es manté el flux glicolític per consum de les reserves cerebrals de glucosa i glucogen els nivells es mantenen estables però un cop consumides aquestes reserves, i quan l'animal entra en estat de coma i el consum de glucosa és reduït entre un 15 i un 36% (Bryan *et al.*, 1986), la seva concentració disminueix (Fig 2.9 i 2.10). Amb això es pot suggerir que la concentració de Fru 2,6-P₂, a l'igual que en la isquèmia, segueix la concentració d'hexoses 6-fosfat cerebrals donat que les variacions en la concentració d'ATP tenen poca influència en l'activitat PFK-2

(Ventura *et al.*, 1992). La caiguda en la concentració de Fru 2,6-P₂ és deguda a una insuficient aportació de Fru 6-P juntament amb la lleugera disminució d'activitat PFK-2.

La inhibició de la PFK-1 i del consum de glucosa durant aquest procés estaria relacionada amb la disminució de la cinètica de captació de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica per disminució de la concentració plasmàtica i, ja a nivell intracel·lular, amb el descens en els nivells de Fru 2,6-P₂ i Fru 1,6-P₂ (activadors) i l'augment de NH₄⁺ (inhibidor de la PFK-1) i de la Fru 6-P com a substrat. L'acció d'altres coneguts efectors de la PFK-1 es pot descartar donat que o bé no varien significativament la seva concentració com el cas de P_i, el pH o l'ADP o bé varien en direcció oposada al flux com l'ATP, l'AMP o el citrat (Gorell *et al.*, 1977). Aquest estat inhibidor de la PFK-1 produït per les variacions metabòliques induïdes per la hipoglicèmia es confirma per l'evidència de que l'administració de glucosa en l'estat de coma produeix, a curt terme, un acúmul transitori en el contingut d'hexoses 6-fosfat sense afectar els nivells dels intermediaris glicolítics a partir de la Fru 1,6-P₂ (Gorell *et al.*, 1977).

METABOLISME CEREBRAL DURANT LA DIABETIS I EL DEJU

Des dels estudis d'Owen *et al.* (1967) en pacients tractats d'obesitat per dejuni perllongat es coneix que, en estats on els cossos cetònics són exportats a la circulació per part del fetge, aquests poden ser utilitzats pel cervell amb una finalitat energètica. El cervell és capaç de satisfer una bona part de les seves demandes energètiques per medi de l'oxidació de l'acetoacetat i el β-hidroxiacetat seguint les rutes metabòliques mencionades en el capítol introductori. Malgrat això, l'acetoacetat i el β-hidroxiacetat no són capaços de mantenir per sí sols el funcionament normal del cervell i reemplaçar totalment a la glucosa de forma que aquesta utilització s'ha de considerar doncs, com un mecanisme de supervivència i no una situació metabòlica òptima.

Les velocitats d'utilització dels cossos cetònics per part del cervell són proporcionals a les seves concentracions plasmàtiques. Fins i tot en situacions de cetosi, les concentracions tissulars de cossos cetònics són indetectables, de forma que es pot afirmar que el transport d'aquests cossos cetònics a través de la barrera hematoencefàlica és el pas limitant en el seva utilització (Miller *et al.*, 1973; Cremer and Heath, 1974; Ruderman *et al.*, 1974) de forma que un cop travessada aquesta barrera són immediatament metabolitzats. Aquesta velocitat de transport es veu augmentada durant el dejuni i la diabetis (Gjedde and Crone, 1975; McCall *et al.*, 1982).

Corroborant els estudis d'Owen *et al.* (1967), el dejuni perllongat produeix, en humans, una disminució del 50% en el consum cerebral de glucosa determinat per PET (Redies *et al.*, 1989). Aquest estudi demostrava que la disminució afectava per igual a totes les àrees cerebrals. En canvi s'observava que el consum d'oxigen es manté inalterat en aquests estats de forma que el que es produeix en aquests estats és un canvi en la proporció d'oxidació dels diferents substrats energètics. Al contrari que en cervell humà, el consum de glucosa en cervell de rata no disminueix o ho fa molt lleugerament durant el dejuni (Ruderman *et al.*, 1974; Gjedde and Crone, 1975; Pardridge and Oldendorf, 1975; Crane *et al.*, 1985). Malgrat això, i al contrari que en condicions d'alimentació normal, una proporció important de la glucosa metabolitzada no és oxidada completament i és eliminada cap a la circulació en forma de lactat (Ruderman *et al.*, 1974). En rates dejunades, menys del 10% del consum energètic total prové de l'oxidació de cossos cetònics (Gjedde and Crone, 1975), mentre aquest valor arriba al 60% en humans (Owen *et al.*, 1967) de forma que les variacions en el metabolisme cerebral seran molt més acusades en els humans. Aquestes diferències observades entre els efectes del dejuni en rata i en humans podrien estar relacionades amb el major tamany del cervell humà i les seves proporcionalment altes necessitats energètiques respecte a la resta del cos (Redies *et al.*, 1989).

En els models experimentals de diabetis en rata les modificacions en el consum cerebral de glucosa no es troben tan ben establertes com en el cas del dejuni. Duckrow i Bryan (1987) van observar que la hiperglicèmia aguda per injecció intraperitoneal de glucosa no produïa cap variació en el consum cerebral de glucosa. En canvi aquest consum disminuïa un 15% a les tres setmanes d'inducció de la diabetis per estreptozotocina. Aquest resultat suggereix que no són les altes concentracions de glucosa les responsables d'aquests canvis en el metabolisme cerebral sinó variacions específiques de la diabetis, com el augment de la disponibilitat de cossos cetònics entre d'altres. Altres grups de recerca han obtingut resultats similars; durant els primers dies d'inducció de la diabetis no hi ha variacions, o fins i tot un cert augment, del consum de glucosa, mentre posteriorment aquest consum disminueix un 20-40% si es manté la diabetis durant setmanes (Ruderman *et al.*, 1974; Jakobsen *et al.*, 1990). En canvi Mans *et al.* (1988), van trobar un increment del 25% del consum cerebral de glucosa durant la primera setmana per després disminuir fins a valors control a les quatre setmanes d'iniciat el tractament. Aquestes diferències observades entre els diferents estudis, realitzades amb la mateixa metodologia, pot radicar en els diferents graus de cetosi plasmàtica assolits. En el model de Mans *et al.* (1988) les rates Long-Evans utilitzades són molt menys cetósiques durant la diabetis i el dejuni que altres tipus de rates, com les Sprague-Dawley utilitzades en altres estudis. Igualment les disminucions observades en els diferents estudis tenen

paralelisme amb els nivells plasmàtics de cossos cetònics assolits; d'un 30-40% de l'estudi de Ruderman *et al.*, (1974) en animals altament cetòsics, un 15% en animals mitjanament cetòsics (Jakobsen *et al.*, 1990) fins a la manca d'inhibició en l'estudi de Mans *et al.* (1988) en animals que presentaven baixos increments en el contingut plasmàtic de cossos cetònics.

Hi ha evidències que en el dejuni els transportadors de glucosa presents a la barrera hematoencefàlica no es troben disminuïts, mentre hi ha dades contradictòries en el cas de la diabetis on alguns autors no observen cap variació en el seu nombre (Pardridge and Oldendorf, 1979; Duckrow, 1988; Sivitz *et al.*, 1989; Pelligrino *et al.*, 1990) mentre altres resultats sustenten la idea d'una disminució en el seu nombre (McCall *et al.*, 1982; Pardridge *et al.*, 1990). Es acceptat però, que la disminució en el consum de glucosa associada als estats de diabetis cetòsica i el dejuni en el cervell humà està lligada a una disminució en la metabolització de la glucosa a l'interior cel.lular. En el cas del dejuni en cervell de rata les dades indiquen que no hi hauria disminució o seria d'una magnitud menor fins i tot a altes concentracions de cossos cetònics en plasma. Aquest efecte d'estalvi de glucosa per inhibició del metabolisme hidrocarbonat cerebral quan s'eleva els cossos cetònics en plasma s'ha suggerit que es produeix a nivell de la PFK-1 i de la piruvat deshidrogenasa (Figura 2.12) (Ruderman *et al.*, 1974; Thurston *et al.*, 1974; Newsholme *et al.*, 1977; Redies *et al.*, 1989; Ventura *et al.*, 1991).

ESTAT DEL ANIMAL	CONCENTRACIO TISSULAR (nmol/g teixit)				
	GLU 6-P	FRU 6-P	FRU 1,6-P2	CITRAT	ACETIL-COA
CONTROL	159±5	51±4	9.1±0.5	241±10	3.0±0.5
DEJUNI 48 H.	159±7	49±4	9.4±0.4	267±15	N.D.
DIABETIS	229±14 ***	74±4 ***	5.2±0.5 ***	389±30 ***	6.5±0.6 **

Figura 2.12.- Efecte de la diabetis i el dejuni en les concentracions de diversos intermediaris del metabolisme energètic a cervell de rata.

Adaptat de Ruderman *et al.* (1974). Els resultats són el promig ± S.E.M. per 8-10 animals. La significació de les diferències respecte els valors control es troba indicada com: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p > 0.001.

FUNCIO DE LA FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT DURANT EL DEJUNI I LA DIABETIS

Aquest efecte descrit d'estalvi de glucosa per inhibició de la PFK-1 és una idea generalment acceptada. També és acceptat que aquesta inhibició està mitjançada per increments en la concentració de citrat. En canvi, no es disposava de cap dada que indiqués quin era el comportament de la Fru 2,6-P₂ en aquestes condicions. La hipòtesi de que baixades en els nivells de Fru 2,6-P₂ poguessin ser senyals de la presència de substrats alternatius i que limitessin el flux glicolític semblava prou atractiva per interessar-nos-hi.

Vam utilitzar rates mascles Sprague-Dawley de 200-250 g de pes. Vam deixar grups d'animals dejunats amb lliure accés a l'aigua durant 24, 72 i 120 hores. La diabetis va ser induïda per injecció intravenosa de 60 mg/Kg d'estreptozotocina dissolta en amortidor citrat sòdic 50 mM a pH 4.5. Després de dues setmanes, quan els animals presentaven alts nivells de glucosa i de cossos cetònics en orina, els animals van ser sacrificats pels mètodes de decapitació en nitrogen líquid o radiació de microones prèviament descrits.

A la Figura 2.13 es pot apreciar els nivells plasmàtics de glucosa i cossos cetònics i la concentració cerebral de coneguts metabòlits reguladors de la PFK-1. Al cap de dues setmanes de l'inducció de la diabetis la glucèmia s'havia incrementat quatre vegades a l'igual que la concentració de β -hidroxibutirat indicant que els animals mostraven un fort estat diabètic amb una cetosi lleugera en comparació amb models més dràstics per administració d'al·loxà o dosis més elevades d'estreptozotocina (Thurston *et al.*, 1974; Ruderman *et al.*, 1974). En els animals dejunats s'observa una paulatina disminució de glucosa plasmàtica (50% de reducció a les 120 hores) amb un paral·lel augment dels cossos cetònics fins un estat altament cetósic als 5 dies. Es remarcable el fet que a les 120 hores de dejuni els animals presentaven un comportament normal quan havien perdut més del 20% de pes corporal.

Els nivells de Fru 2,6-P₂ no mostren cap variació al llarg del temps de dejuni mentre disminueixen significativament un 20% durant la diabetis. Un patró similar s'observa en els nivells de Glu 1,6-P₂ malgrat la disminució observada durant la diabetis no sigui significativa en aquest cas. Els nivells de citrat són considerablement més elevats en el animals diabetics mentre durant el dejuni aquests augments són molt més lleugers i només resulten significatius a les 120 hores.

CONDICIO EXPERIMENTAL	PLASMA	
	GLUCOSA (mM)	8-HIDROXIBUTIRAT (mM)
CONTROL (6)	6.6 ± 0.5	0.05 ± 0.01
DIABETES (9)	22.6 ± 0.3 ***	0.20 ± 0.02 ***
24 H DEJUNI (6)	4.3 ± 0.2 **	0.50 ± 0.11 ***
72 H DEJUNI (5)	3.7 ± 0.2 ***	2.25 ± 0.35 ***
120 H DEJUNI (4)	2.8 ± 0.3 ***	3.05 ± 0.78 ***

CONDICIO EXPERIMENTAL	CERVELL		
	FRU-2,6-P ₂ (nmol/g)	GLU-1,6-P ₂ (nmol/g)	CITRAT (nmol/g)
CONTROL (6)	5.8 ± 0.2	120 ± 21	131 ± 3
DIABETES (9)	4.7 ± 0.4 **	96 ± 8	200 ± 13 ***
24 H DEJUNI (6)	6.1 ± 0.5	116 ± 13	142 ± 7
72 H DEJUNI (5)	6.2 ± 0.3	110 ± 18	143 ± 13
120 H DEJUNI (4)	6.0 ± 0.5	103 ± 17	167 ± 13 **

Figura 2.13.- Concentracions de substrats energètics en plasma i de fructosa 2,6-bisfosfat, glucosa 1,6-bisfosfat i citrat en cervell de rata durant la diabetis i el dejuni.

Les mesures van ser efectuades utilitzant els mètodes descrits a Ventura *et al.*, (1991a) en plasma i cervells d'animals sacrificats per radiació de microones. Els punts representen els valors promig de 4-9 animals ± S.E.M.. * p<0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001.

Durant la diabetis s'observa una disminució en l'activitat PFK-1 (Figura 2.14) que podria ser resultat deguda o bé a alguna variació en la V_{max} de l'enzim per modificació covalent o variació en la proporció isoenzimàtica, o bé a una disminució en la relació entre la síntesi i degradació proteica. En canvi, no s'observa variació en les activitats PFK-2 i FBPasa-2 en cap de les situacions experimentals estudiades. D'aquestes dades es despren que la utilització de cossos cetònics produeix canvis oposats i de magnitud proporcional en les concentracions de Fru 2,6-P₂ i citrat depenents del grau de metabolització dels cossos cetònics.

Condicció Experimental		PFK-1 (U/g)	PFK-2 (mU/g)	FBPasa-2 (mU/g)	Ratio PFK-2/FBPasa-2
CONTROL	(6)	32.8 ± 1.0	0.59 ± 0.05	0.05 ± 0.01	11.8 ± 0.6
DIABETES	(4)	26.5 ± 1.3 * *	0.62 ± 0.09	0.08 ± 0.03	9.6 ± 2.8
120 H. DEJUNI	(4)	34.8 ± 1.4	0.56 ± 0.06	0.07 ± 0.02	11.1 ± 4.5

Figura 2.14.- Activitats enzimàtiques dels enzims relacionats amb el metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat durant la diabetis i el dejuni.

Adaptat de Ventura *et al.*, (1991a). Els valors representen el promig ± S.E.M. de 4-6 animals. Les diferències estadísticament significatives s'indiquen com: * p<0.05; ** p<0.01.

Durant el dejuni en rata, entre un 10 i un 20% del consum d'oxigen és atribuïble a l'oxidació de cossos cetònics (Gjedde and Crone, 1975; Hawkins *et al.*, 1986) mentre es produeix un fort augment de l'alliberament de lactat al torrent circulatori. Els nivells d'hexoses 6-fosfat i de Fru 1,6-P₂ no es modifiquen respecte als valors control (Ruderman *et al.*, 1974). Aquestes dades evidencien que es produeix un bloqueig en el complex de la piruvat deshidrogenasa i que l'activitat PFK-1 no es modifica significativament. En el mateix sentit, no s'observen variacions en els nivells de glucogen durant el dejuni (Nahas and Abdul-Ghani, 1989). En aquesta situació cap dels modificadors de l'activitat PFK-1 mostren variacions en les seves concentracions a excepció del lleuger augment de citrat als 5 dies de dejuni. El flux glicolític procedirà a una velocitat similar o sols lleugerament inferior a la control mentre l'alliberament de lactat indica un bloqueig en l'oxidació del piruvat probablement degut a un augment en la relació acetil-CoA/CoA que inhibeix a la piruvat deshidrogenasa (Denton *et al.*, 1975). És important remarcar que aquestes dades es refereixen a cervell de rata mentre que en altres espècies, entre elles els humans, sí podria observar-se inhibicions importants del flux glicolític si tenim en compte les evidències que indiquen que en cervell humà es produeix una forta caiguda en la utilització de glucosa durant el dejuni perllongat (Owen *et al.*, 1967; Redies *et al.*, 1989).

Durant la diabetis es produeix un augment en la concentració d'hexoses 6-fosfat i una forta disminució de Fru 1,6-P₂ indicant inhibició de la PFK-1 (Thurston *et al.*, 1974; Ruderman *et al.*, 1974). A més, es produeix una acumulació de glucogen que estaria motivada per l'acumulació de Glu 6-P que, alhora d'actuar com a substrat de la seva síntesi, activaria a la glucogen sintasa i inhibiria a la fosforil.lasa (Nahas and Abdul-Ghani, 1989). Els increments de citrat observats provocaran la disminució en la concentració de Fru 2,6-P₂ a través de l'efecte dual que el citrat exerceix, inhibint la PFK-2 i activant la FBPasa-2 cerebrals (Ventura *et al.*, 1992). S'ha descrit que els augments de la concentració de citrat augmenten la K_a de la PFK-1 per la Fru 2,6-P₂ de forma que els dos metabòlits actuen d'una forma coordinada (Ishikawa *et al.*, 1990). Aquests increments de citrat conjuntament amb la caiguda dels de Fru 2,6-P₂ provocaran un efecte sinèrgic inhibitori sobre la PFK-1 i el flux glicolític donat que altres modificadors de l'enzim no es troben significativament modificats durant la diabetis. Es especialment notori destacar que els isoenzims de la PFK-1 i la PFK-2/FBPasa-2 específics de cervell són especialment sensibles a la inhibició per citrat, motiu pel que aquest mecanisme d'estalvi de glucosa podria ser especialment actiu en aquest teixit (Newsholme *et al.*, 1977; Foe and Kemp, 1985; Ventura *et al.*, 1991; Ventura *et al.*, 1992).

La menor oxidació dels cossos cetònics pel teixit cerebral durant el dejuni malgrat els seus nivells plasmàtics són superiors als detectats durant la diabetis podria estar relacionada amb un augment de la capacitat dels transportadors situats a la barrera hematoencefàlica. S'han observat augments del 60% en la capacitat de transport del β-hidroxitirac dues setmanes després de la inducció de la diabetis (McCall *et al.*, 1982). Per confirmar aquestes dades també seria necessari obtenir dades de paràmetres que afecten a la velocitat del cicle dels àcids tricarboxílics i a l'activitat de la piruvat deshidrogenasa, com l'estat redox mitocondrial i el ratio acetil-CoA/CoA entre d'altres. En aquest sentit, es coneix que la relació β-hidroxitirac/acetoacetat actua com un indicador de l'estat redox mitocondrial. Aquesta relació es troba més elevada en el dejuni que durant la diabetis de forma que en el primer cas la mitocòndria es troba en un estat menys oxidat amb una relació NADH/NAD⁺ més elevada (Ruderman *et al.*, 1974). Aquesta dada suggereix que la piruvat deshidrogenasa estaria més inhibida durant el dejuni i que els nivells d'oxaloacetat serien més baixos, resultats que explicarien la manca d'augment importants en la concentració de citrat observats (Krebs, 1967).

Amb aquestes dades es pot suggerir que les disminucions observades en la utilització de glucosa són secundàries als increments de metabolització dels substrats alternatius, de forma que quan aquests substrats estiguin disponibles el cervell els

utilitzarà de forma que es produirà un estalvi parcial de glucosa. Aquest estalvi estarà provocat per l'augment en els nivells de citrat que provocarà una inhibició directa de la PFK-1 i colateralment disminuirà els nivells de Fru 2,6-P₂ de forma que es potencien els efectes inhibitoris sobre la PFK-1.

METABOLISME CEREBRAL DURANT EL DESENVOLUPAMENT

Durant les primeres hores després del naixement, el nounat presenta una forta hipoglicèmia com a conseqüència de les encara baixes velocitats de producció de glucosa pel teixit hepàtic. Estudis de captació de diferents substrats per tècniques isotòpiques indiquen que durant els primers dies de vida, el cervell de rata utilitza molt poca glucosa i el substrat emprat majoritàriament és el lactat, que prové de la degradació del glucogen muscular i hepàtic (Arizmendi and Medina, 1983; Fernandez and Medina, 1986; Dombrowski *et al.*, 1989). Aquesta utilització preferencial del lactat sobre la glucosa i els cossos cetònics en el període pre-lactant es justifica pel fet que durant els primers dies de vida els nivells de glucosa plasmàtica es mantenen baixos i l'augment de cossos cetònics només es produirà a partir del començament de la lactància (Stupf and Kraus, 1979). A més, els nivells dels enzims de la via glicolítica i de metabolització de cossos cetònics són encara molt baixos en aquest període (Leong and Clark, 1984a; Leong and Clark, 1984b; McIlwain and Bachelard, 1985).

D'aquestes dades es desprén que el metabolisme cerebral es sustenta per l'oxidació de lactat en el període pre-lactant. Quan s'inicia la lactància, l'oxidació d'àcids grassos produeix un increment important en la concentració de cossos cetònics. És important considerar que la llet de rata conté una proporció alta de greixos (Sokoloff, 1973). Conjuntament amb la producció de cossos cetònics, el cervell del lactant necessita el constant aport de glucosa amb finalitats energètiques i biosintètiques que provindrà de la llet materna i de la gluconeogènesi hepàtica a partir de lactat, glicerol i altres substrats gluconeogènics.

En aquests canvis en la proporció d'utilització dels diferents substrats després del naixement té una important influència la seqüència d'aparició dels enzims clau de les diverses rutes metabòliques. Com s'observa a la Figura 2.15 els enzims implicats en la via glicolítica com l'hexoquinasa, PFK-1, aldolasa i lactat deshidrogenasa augmenten des de valors baixos durant la primera setmana (30-40% de l'activitat adulta) fins a valors similars als adults a partir de la setmana de vida (Leong and Clark, 1984 a; McIlwain and Bachelard, 1985). Un patró similar segueixen els enzims implicats en el cicle dels àcids

tricarboxílics. En canvi, els enzims implicats en el metabolisme dels cossos cetònics, β -hidroxibutirat deshidrogenasa, 3-oxoàcid-CoA transferasa i acetoacil-CoA tiolasa presenten una forta inducció entre la primera i la segona setmanes per disminuir un altre cop a valors adults a partir de la quarta setmana. Aquest període d'activitat màxima es correspon amb el de màxima utilització dels cossos cetònics (Patel, 1979; Leong and Clark, 1984 b). En contrast amb aquestes induccions a partir de la primera setmana de vida, els nivells de glucosa 6-fosfat deshidrogenasa, enzim clau en la ruta de les pentoses, es manté gairebé constant des d'abans del naixement fins a l'estat adult (Leong and Clark, 1984 b). Aquesta alta activitat en relació als enzims glucolítics permet desviar la glucosa que entra a la cèl.lula cap a la ruta de les pentoses proveint d'esquelets de ribosa i NADPH per a la biosíntesi de RNA i lípids respectivament.

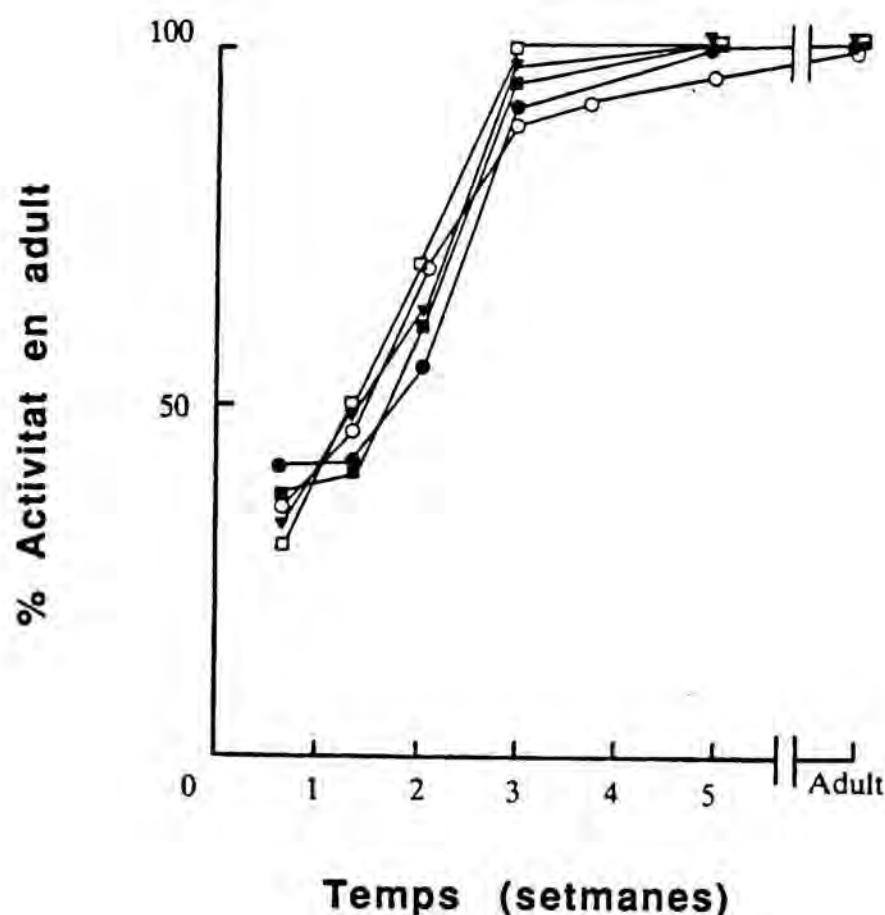


Figura 2.15.- Canvis en les activitats dels enzims glicolítics de cervell de rata durant el desenvolupament.

Adaptat de McIlwain and Bachelard (1985). Captació de glucosa *in vivo* (○), i activitats dels enzims: hexoquinasa (●), PFK-1 (■), lactat deshidrogenasa (▼) i citrat sintasa (□).

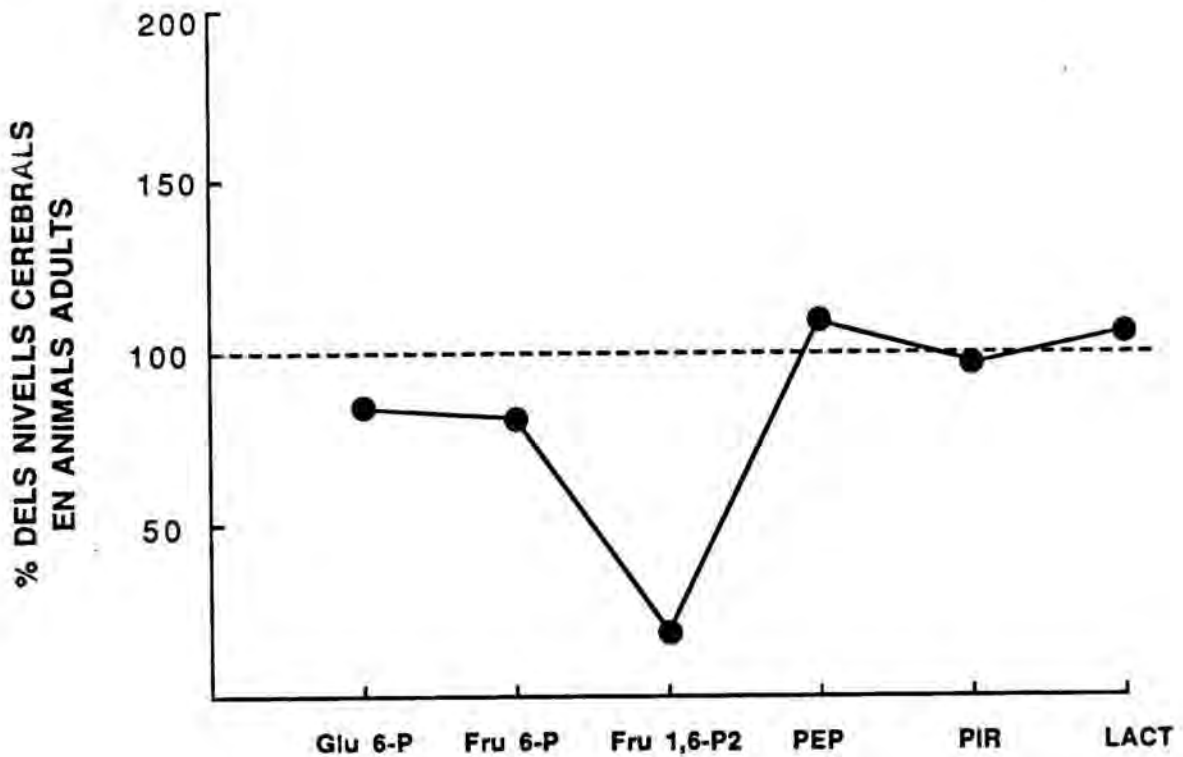


Figura 2.16.- Concentració de diversos intermediaris glicolítics a cervell de neonats.

Adaptada de Stumpf and Kraus (1979). Els resultats són els promitjos de 8 mesures i estan expressats com a percentatge respecte als valors a cervell adult.

Malgrat l'activitat màxima dels enzims glicolítics és baixa durant les primeres setmanes de vida, els seus nivells serien teòricament suficients per mantenir elevades velocitats d'utilització de glucosa. En canvi aquest consum de glucosa es manté disminuït i sols arriba a valors adults a les 2-3 setmanes d'edat. En el cervell de rata es produeix una disminució de cinc vegades en la quantitat de transportadors de glucosa immediatament després del naixement (Sivitz *et al.*, 1989). A més, com es mostra a la Figura 2.16, una important disminució específica de la Fru 1,6-P₂ en el cervell del neonat respecte a l'adult indica una inhibició de la PFK-1. El fet de no produir-se acúmulo d'hexoses 6-fosfat podria estar degut a la important utilització de la glucosa a través de la ruta de les pentoses que s'observa durant aquest període. La metabolització de la glucosa a través d'aquesta via pot arribar a ser del 60% del total de glucosa consumida (Itoh and Quastel, 1970). L'inhibició de la PFK-1 s'explicaria per els alts nivells de citrat (2-3 vegades els adults) que s'han detectat en el cervell neonat (Stumpf and Kraus, 1979). Tots aquests canvis són revertits progressivament i a les 3-4 setmanes tots aquests paràmetres es troben a valors similars als adults.

FUNCIO DE LA FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT DURANT EL DESENVOLUPAMENT

Per examinar la regulació de la Fru 2,6-P₂ durant el desenvolupament vam estudiar els seus nivells tissulars així com l'activitat PFK-2, enzim responsable de la seva síntesi. Els experiments es van efectuar amb rates femelles Sprague-Dawley (200-250 g) que van ser emparellades amb mascles fins observar presència intravaginal d'espermatozous. A partir d'aquest moment es va controlar el procés gestacional i, en els temps adients, els fetus van ser obtinguts a través de cesàrea. Els cervells de fetus i neonats van ser immediatament congelats per immersió en nitrogen líquid així com el cervell de les mares que va ser utilitzat com a control adult.

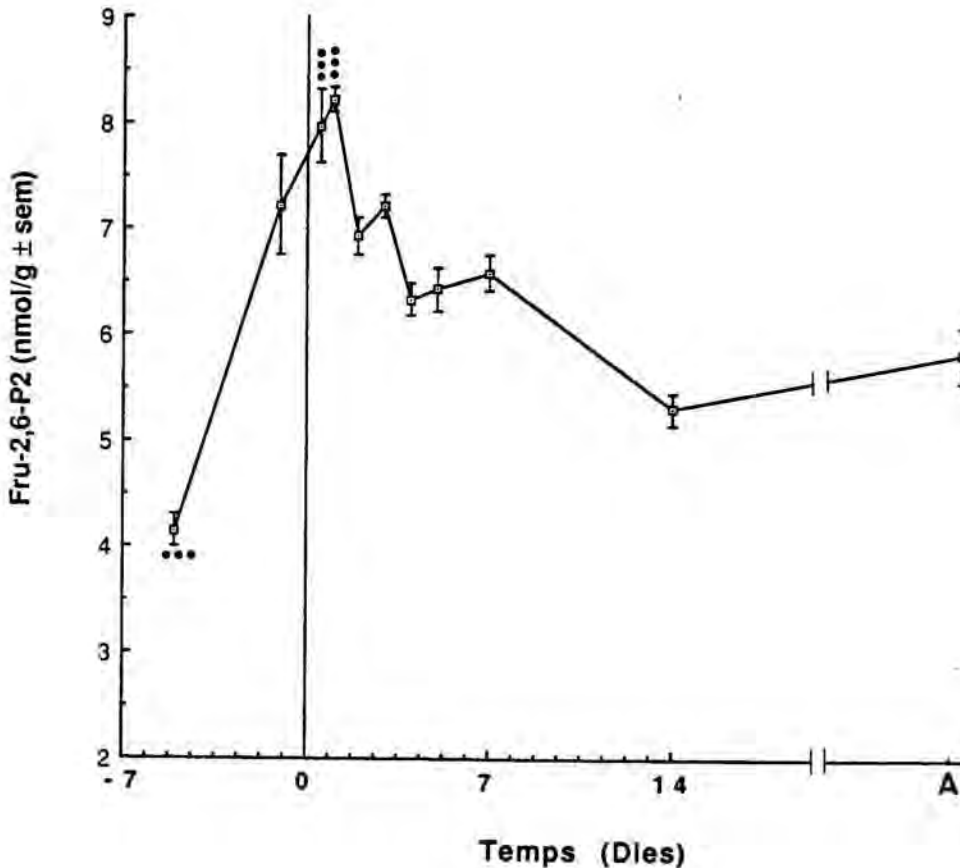


Figura 2.17.- Nivells cerebrals de fructosa 2,6-bisfosfat d'embrions, neonats i rates adultes.

Adaptada de Ambrosio *et al.*, (1992). El temps està expressat com (-) abans i (+) després del naixement. Els valors són els promitjos de 3-4 animals \pm S.E.M.. La significació de les diferències respecte als adults està expressada com: *** $p < 0.001$.

Com s'observa a la Figura 2.17 els nivells de Fru 2,6-P₂ s'incrementen a partir del setzè dia de gestació per arribar a valors màxims durant els primers dies post-part. A partir d'aquest punt s'observa una caiguda de la seva concentració que es manté durant dues setmanes fins arribar a valors similars als adults. Aquests resultats són contraposats als obtinguts en fetge de neonats, on s'observa un increment en els nivells de Fru 2,6-P₂ just abans del naixement, coincidint amb la mobilització de glucogen, per disminuir després quan es produeix l'episodi hipoglicèmic post-part (Schubert *et al.*, 1983). En eritròcits de pollastre, s'han observat increments mantinguts dels nivells de Fru 2,6-P₂ després del naixement que es correspondrien amb l'augment del consum de glucosa que s'ha observat (Espinet *et al.*, 1986).

Aquestes variacions en la concentració de Fru 2,6-P₂ estan relacionades amb les variacions en l'aport de substrats. Immediatament després del neixement, es produeix una disminució de cinc vegades en la quantitat de transportadors de glucosa (Sivitz *et al.*, 1989), el consum de glucosa a partir d'aquest moment es mantindrà baix i només arribarà a valors adults després de 2-3 setmanes. Això condiciona que, en el moment de nèixer, la degradació de les reserves de glucogen condueix a augments en els nivells cel.lulars d'hexoses-6-fosfat que produirien els augments transitoris de Fru 2,6-P₂ observats. Aquests augments transitoris afavoreixen la metabolització de la glucosa en aquestes condicions, on la seva concentració plasmàtica es troba baixa. Posteriorment, l'inici de la lactància i la possibilitat de matabolització dels cossos cetònics, induirà l'acumulació de citrat (Stumpf and Kraus, 1979) que inhibeix la PFK-2 (Ventura *et al.*, 1992). En aquesta situació, similar a la cetosi observada durant la diabetis, els augments de citrat i disminucions consegüents en la concnetració de Fru 2,6-P₂ propicien l'inhibició de la PFK-1 juntament amb la baixa activitat màxima d'aquest període. Aquesta inhibició permet utilitzar la menor quantitat de glucosa captada preferentment en la ruta de les pentoses, que es troba fortament afavorida en aquestes condicions on es necessiten equivalents de reducció per a la síntesi de mielina.

La Figura 2.18 ens mostra com l'activitat PFK-2 no presenta variacions significatives al llarg del desenvolupament obtenint-se uns valors lleugerament més elevats en el cervell de neonats i adults respecte als d'embrions. Aquest resultat no és paral.lel al perfil obtingut per a la PFK-1, que es manté a valors 10-20% de l'activitat en adult durant el període perinatal i només és a partir de les dues setmanes quan comença a augmentar fins a valors adults tal i com havia estat descrit (McIlwain and Bachelard, 1985).

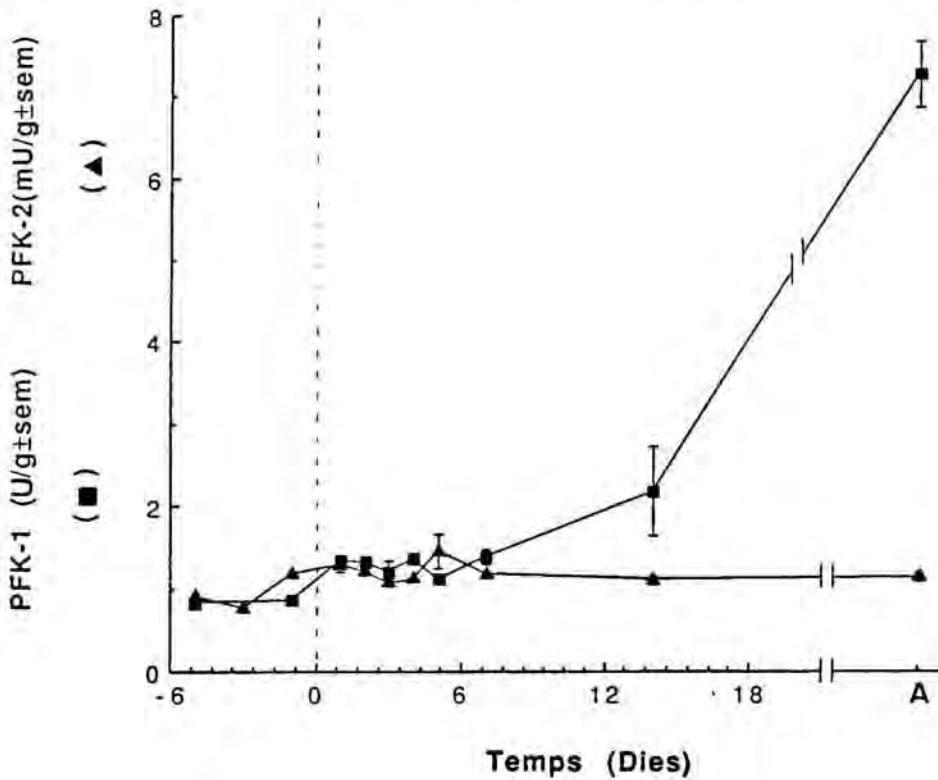


Figura 2.18.- Activitat PFK-1 i PFK-2 d'embrions, neonats i rates adultes.

Adaptada de Ambrosio *et al.*, (1992). El temps està expressat com (-) abans i (+) després del naixement. Els valors són els promitjos de 3-4 animals \pm S.E.M.. Els valors de PFK-1 són significativament superiors ($p < 0.001$) en adults i en neonats de 14 dies ($p < 0.05$) i significativament menors en embrions ($p < 0.01$) respecte a neonats.

En fetge s'havia descrit que la PFK-2 presentava una transició isoenzimàtica entre l'estat fetal i l'adult. La isoforma fetal diferia en propietats cinètiques i de fosforil·lació per diferents proteïna quinases (Martin-Sanz *et al.*, 1987). Per determinar si en cervell tenia lloc una transició isoenzimàtica similar entre l'estat fetal i l'adult vam caracteritzar la forma fetal comparant-la amb l'isoenzim de cervell adult descrit (Ventura *et al.*, 1991; Ventura *et al.*, 1992). Tan el perfil cromatogràfic d'elució d'una columna Mono-Q com la detecció per separació electroforètica de l'intermediari enzimàtic fosforil·lat per incubació amb $[2\text{-}^{32}\text{P}]\text{Fru } 2,6\text{-P}_2$ no indicaven cap tipus de comportament diferencial suggerint que no hi ha variacions isoenzimàtiques de la PFK-2 durant el desenvolupament.

Capítol 3:
Caracterització de la PFK-2/FBPasa-2
cerebral

ISOENZIMS DE LA PFK-2/FBPASA-2

La Fru 2,6-P₂ és l'activador més potent de la PFK-1 cerebral descrit fins el moment (Ishikawa *et al.*, 1990). La seva concentració tissular depèn del balanç entre les activitats PFK-2 i FBPasa-2. El descobriment de l'enzim que, en fetge de rata, catalitza la síntesi de la Fru 2,6-P₂ va ser realitzada, gairebé simultàneament, per tres grups de recerca (El-Maghrabi *et al.*, 1981; Furuya and Uyeda, 1981; Hue *et al.*, 1981). L'enzim, anomenat PFK-2 per diferenciar-lo de l'enzim glucolític, catalitza la formació de Fru 2,6-P₂ a partir de Fru 6-P i ATP. La hidròlisi de la Fru 2,6-P₂ a Fru 6-P i P_i es catalitza per la FBPasa-2 (Van Schaftingen *et al.*, 1982; El-Maghrabi *et al.*, 1982). Les activitats d'aquests enzims són molt reduïdes, calculant-se uns valors més de 1000 vegades inferiors als corresponents a la PFK-1 i FBPasa-1. Aquestes baixes activitats justifiquen les baixes concentracions de Fru 2,6-P₂ detectades en tots els teixits de mamífer (revisat a Van Schaftingen, 1987).

Les activitats PFK-2 i FBPasa-2 de diferents teixits de mamífer copurifiquen fins a homogeneïtat, indicant que en totes elles l'enzim és bifuncional. Aquesta proteïna bifuncional conté les dues activitats separades en dos dominis amb un centre actiu diferent per a cada una d'elles (El-Maghrabi *et al.*, 1984; Sakakibara *et al.*, 1984). Estudis cinètics i estereoquímics indiquen que la reacció quinasa té lloc a través de la formació d'un complex ternari. La reacció bisfosfatasa segueix un mecanisme *ping-pong* que inclou la formació d'un intermediari fosforilat (E-P). D'aquesta forma, l'incubació de l'enzim amb [2-³²P] Fru 2,6-P₂ produeix la fosforil·lació d'un residu de histidina a una velocitat 100 vegades superior a la velocitat total de hidròlisi (Stewart *et al.*, 1985). Aquesta propietat ha estat utilitzada per a la visualització específica de la PFK-2/FBPasa-2 per marcatge radiactiu de l'enzim i formació de l'intermediari E-³²P estable (El-Maghrabi *et al.*, 1986).

La possible existència de diversos isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2 es va plantejar al comparar dades bioquímiques, immunològiques i cinètiques dels enzims procedents de cor, fetge i múscul (Rider *et al.*, 1985; Taniyama *et al.*, 1988). Fins el moment de concloure aquesta tesi havien estat caracteritzades quatre tipus diferents d'isoenzims en mamífer depenent del teixit d'on s'han aïllat. Aquests isoenzims s'anomenen "L" (hepàtic), "M" (muscular), "H" (cardíac) i "T" (testicular). Tots quatre isoenzims són homodímers de masses moleculars similars però es diferencien en les seves propietats immunològiques, cinètiques, relació d'activitats PFK-2/FBPasa-2 i resposta a la fosforil·lació per proteïna quinasa depenent d'AMP cíclic (PKA) i proteïna quinasa C (PKC) (revisat a Hue *et al.*, 1990; Ventura *et al.*, 1991b).

PFK-2/FBPasa-2 hepàtica.- Les activitats PFK-2 i FBPasa-2 hepàtiques es troben localitzades en dos dominis separats dins de la mateixa proteïna. Aquesta proteïna presenta dues subunitats idèntiques de 55 kDa compostes de 470 aminoàcids (Van Schaftingen, 1987; Pilkis and El-Maghrabi, 1988; Pilkis and Claus, 1991). L'isoenzim hepàtic "L" presenta una activitat quinasa entre 1 i 4 vegades superior a la activitat bisfosfatasa.

Al contrari que la PFK-1, La PFK-2 hepàtica no es inhibida per altes concentracions d'ATP. L'enzim té una cinètica hiperbòlica per l'ATP amb una K_m de 0.1-0.2 mM per el que és probable que l'enzim es trobi saturat *in vivo*. L'afinitat per la Fru 6-P és dependent de la concentració de P_i i de l'estat de fosforil·lació de l'enzim. En presència de 5 mM P_i , la K_m per la Fru 6-P és de 50 μ M, concentració que es troba dins del rang de concentracions fisiològiques. L'efecte del fosfat sembla tenir poca significació fisiològica donat que s'aconsegueix un efecte activador màxim a concentracions molt inferiors a les fisiològiques (Laloux *et al.*, 1985). La PFK-2 és inhibida per citrat, fosfo-enol-piruvat i glicerol 3-fosfat (Gli 3-P). S'ha observat que els tres inhibidors poden jugar papers reguladors de la seva activitat en diferents situacions fisiològiques (revisat a Hue and Bartrons, 1985; Van Schaftingen, 1987; Pilkis & El-Maghrabi, 1988; Pilkis and Claus, 1991).

La FBPasa-2 requereix Mg^{2+} i és estimulada per P_i , Gli 3-P i nucleòtids trifosfat. La K_m per el seu substrat és molt baixa, 4 nM, concentració 100 vegades menor que els nivells existents en el fetge. Malgrat això la Fru 6-P, un dels seus productes de reacció, actua com un potent inhibidor amb una K_i de 20 μ M. D'aquesta forma, canvis en la concentració de Fru 6-P provocaran canvis oposats en les activitats PFK-2 i FBPasa-2 (revisat a Hue and Bartrons, 1985; Van Schaftingen, 1987; Pilkis & El-Maghrabi, 1988).

La PFK-2/FBPasa-2 hepàtica és un enzim interconvertible regulat per processos de fosforil·lació/defosforil·lació en una única serina a través de la PKA (Figura 3.1). La fosforil·lació indueix inactivació de la PFK-2 i activació de la FBPasa-2. La inactivació de la quinasa es produeix per disminució de la V_{max} , un increment en la K_m per la Fru 6-P i un augment en la sensibilitat a l'inhibició per citrat i fosfo-enol-piruvat. L'activació de la bisfosfatasa es produeix per un augment de la V_{max} , augment de la sensibilitat a l'activació per Gli 3-P i nucleòtids trifosfat i disminució de la sensibilitat a l'inhibició per Fru 6-P (Van Schaftingen *et al.*, 1981; El-Maghrabi *et al.*, 1982b). La defosforil·lació està catalitzada per les proteïna fosfatases 2A i 2C (Pelech *et al.*, 1984). Hormones com el glucagó i agonistes β -adrenèrgics provoquen augments d'AMP cíclic, inhibició de la

PFK-2 i activació de la FBPasa-2 (revisat a Hue and Bartrons, 1985; Van Schaftingen, 1987; Pilkis & El-Maghrabi, 1988) mentre l'insulina antagonitza aquests efectes (Pilkis *et al.*, 1983; Gil *et al.*, 1986; Gil *et al.*, 1988).

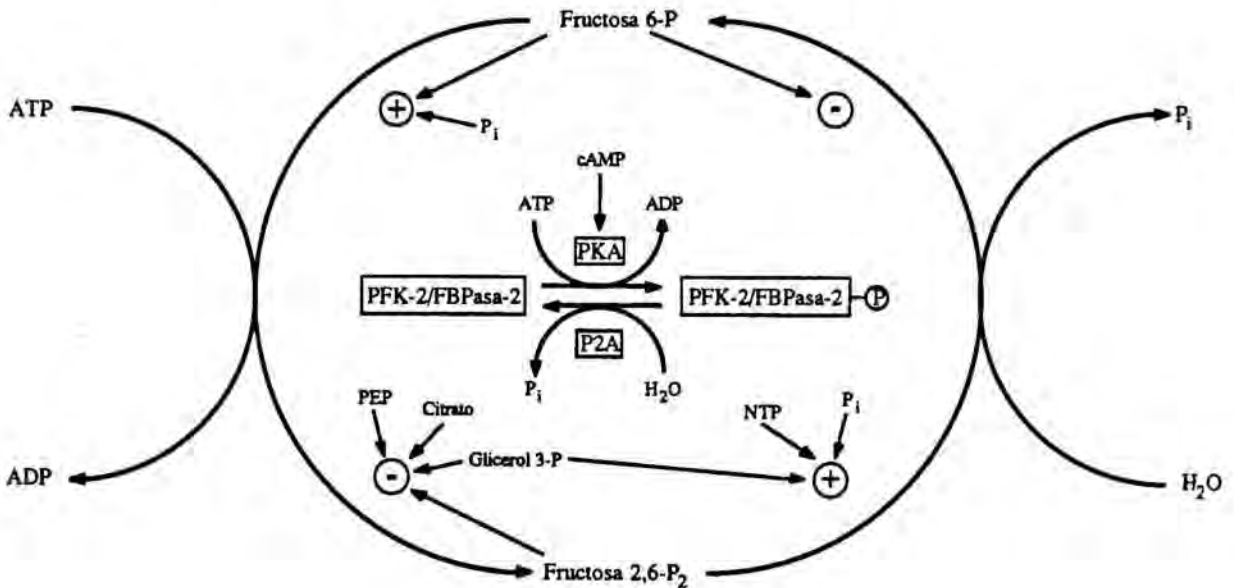


Figura 3.1.- Regulació de la PFK-2/FBPasa-2 hepàtica.

Els enzims es presenten enmarcats. PKA, proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic; P2A proteïna fosfatasa 2A; Pi, fòsfat inorgànic; PEP, fosfo-enol-piruvat; NTP, nucleòtids trifosfat.

La seqüència aminoacídica de l'enzim bifuncional hepàtic va ser obtinguda per seqüenciació proteïca (Lively *et al.*, 1988) i d'un cDNA parcial (Colosia *et al.*, 1987) i confirmada per seqüenciació d'un cDNA complet (Darville *et al.*, 1987). S'han identificat tres dominis diferenciats dins de la proteïna (Figura 3.2). El domini quinasa conté quatre cisteïnes essencials implicades en la unió de la Fru 6-P. El domini bisfosfatasa conté, en la posició 258, la histidina implicada en la formació del intermediari E-P (El-Maghrabi *et al.*, 1987; Pilkis *et al.*, 1987). A més, per estudis de mutagènesi dirigida, s'ha evidenciat l'importància que té per a l'activitat FBPasa-2 una altra histidina en posició 392 i que actuaria com a donador de protons (Tauler *et al.*, 1990). Per al mateix mètode s'ha posat de manifest la funció del residu de glutàmic-327 i del de lisina-356 en la unió de la Fru 2,6-P₂, i en concret, del grup fòsfat en posició C-6 (Lin *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992). El tercer domini, proper a l'extrem amino-terminal, conté el lloc de fosforil.lació per PKA. A més, presenta una diàna de fosforil.lació en tirosines (residus 352-359), però mai s'han trobat evidències que demostrin fosforil.lació per tirosina-proteïna quinases.

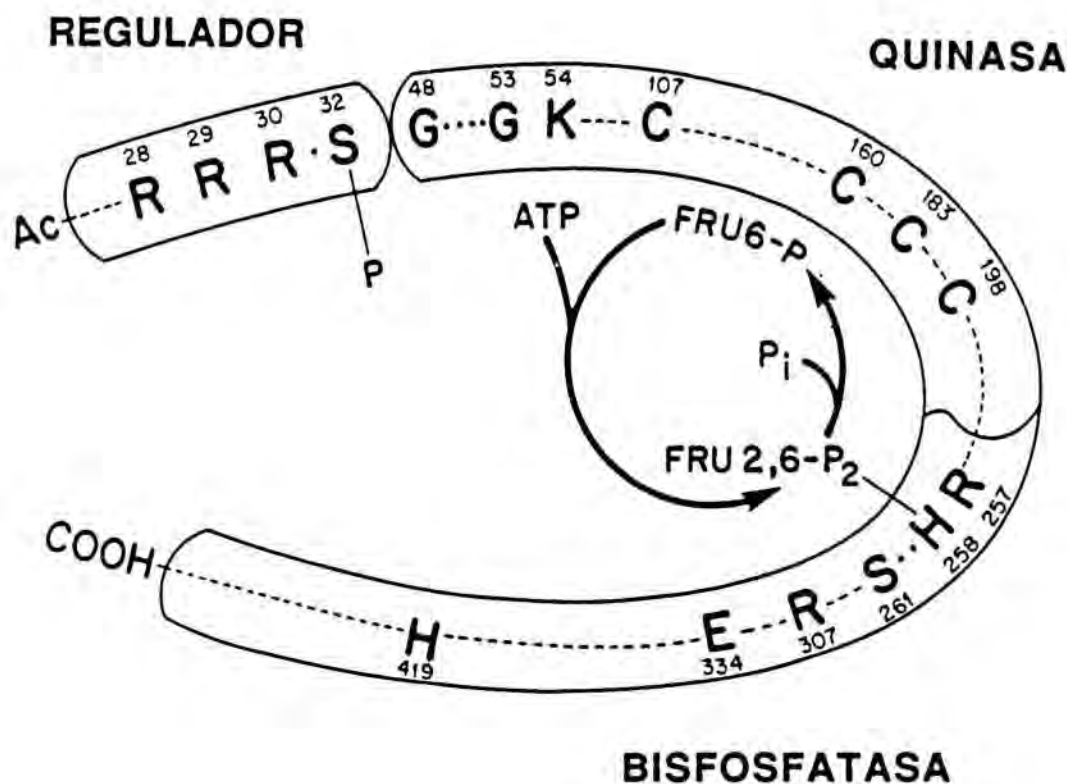


Figura 3.2.- Organització dels dominis i residus crítics de la PFK-2/FBPasa-2 hepàtica.

PFK-2/FBPasa-2 muscular.- La forma muscular "M" és idèntica a la forma hepàtica excepte els 32 primers aminoàcids, corresponents al primer exò de la forma hepàtica, que en la forma muscular són substituïts per un decapeptid que no conté el lloc de fosforil·lació hepàtic de la PKA. Aquests dos isoenzims provenen del mateix gen per splicing alternatiu a partir de dos promotors diferents. Aquest gen de 55 kb es troba localitzat al cromosoma X (Darville *et al.*, 1989).

Aquest isoenzim també forma homodímers de 54 kDa de pes molecular per subunitat. Aquest isoenzim presenta de 2 a 5 vegades més activitat bisfosfatasa que quinasa, justificant els baixos nivells d'aquest metabòlit detectats en aquest teixit (Van Schaftingen and Hers, 1986; Kitamura *et al.*, 1989). No s'ha demostrat cap tipus de fosforil·lació per aquest isoenzim. Les propietats cinètiques d'aquest isoenzim són similars a les del hepàtic excepte que no presenta modificacions d'activitat per Fru 3-P i l'activitat FBPasa-2 és menys sensible a l'inhibició per Fru 6-P (Van Schaftingen and Hers; Kitamura *et al.*, 1989).

PFK-2/FBPasa-2 cardíaca. Els isoenzims cardíacs "H" corresponen a dues proteïnes homodimèriques de pesos moleculars 54 i 58 kDa per subunitat segons determinació per SDS-PAGE. Aquests dos isoenzims provenen d'un splicing alternatiu d'un mateix gen, anomenat gen B, diferent del gen que codifica per a les formes "L" i "M", anomenat gen A (Sakata and Uyeda, 1991; Rider *et al.*, 1992). Aquest gen B, de 22 kb, es troba localitzat al cromosoma 13 en rata i en el 1 en humans (Darville *et al.*, 1991; Hilliker *et al.*, 1991).

L'estructura d'aquests isoenzims és molt similar a la dels descrits per fetge i múscul; contenen un domini quinasa i un domini bisfosfatasa que presenten una forta homologia (> 86%) entre totes les PFK-2/FBPasa-2 descrites (Figura 3.2). En canvi, divergeixen en la zona amino-terminal, concretament els primers 34 residus de la proteïna cardíaca que no presenten el centre de fosforil·lació per PKA de l'isoenzim hepàtic. També divergeixen en el extrem carboxi-terminal. Aquesta zona es codificada per els exons 15 i 16 del gen cardíac (Darville *et al.*, 1991). L'exò 15 codifica per una seqüència que conté dianes de fosforil·lació depenents de PKA i PKC i està absent en el missatger que codifica per al isoenzim de 54 kDa (Sakata and Uyeda, 1990; Sakata and Uyeda 1991; Lange *et al.*, 1991; Rider *et al.*, 1992).

La fosforil·lació de la forma de 58 kDa (530 aminoàcids) per PKA i PKC ha estat demostrada *in vitro* per diversos grups i es troba localitzada, a diferència de l'enzim hepàtic, a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna (Rider and Hue, 1986; Kitamura *et al.*, 1988; Rider *et al.*, 1992). En canvi, hi ha dades contradictòries de com aquestes fosforil·lacions afecten a les característiques cinètiques de l'enzim. Hi ha resultats que suggereixen que la fosforil·lació per PKA disminueix lleugerament la K_m per la Fru 6-P de la PFK-2 sense modificar la V_{max} , l'activitat bisfosfatasa o la sensibilitat a l'inhibició per citrat (Kitamura and Uyeda, 1987; Rider *et al.*, 1992). Kitamura *et al.*, (1988) suggereixen augments de la V_{max} per la PFK-2 al incubar amb PKC. Altres grups no han pogut confirmar aquests resultats (Rider and Hue, 1986; Ventura *et al.*, 1991). És interessant constatar com la fosforil·lació a través de PKA en la zona amino-terminal, produeix una forta inactivació de la PFK-2 hepàtica, mentre la fosforil·lació al costat carboxi-terminal, produeix una lleugera activació de la PFK-2 cardíaca.

Els isoenzims de cor mostren una sèrie de diferències de tipus cinètic amb els altres isoenzims. L'activitat FBPasa-2 a cor és 80 vegades inferior a l'activitat quinasa (Rider and Hue, 1986) de forma que l'enzim de cor és molt més una quinasa que una bisfosfatasa. A més, la K_m per la Fru 2,6-P₂ de la FBPasa-2 és molt alta, 40 μ M (Kitamura and Uyeda, 1988), de forma que la FBPasa-2 no es troba saturada en

condicions fisiològiques. A més, la forma cardíaca no presenta inhibició per Gli 3-P i és molt més sensible a l'inhibició per citrat que les formes hepàtica i muscular (Rider *et al.*, 1985; Ventura *et al.*, 1991).

PFK-2/FBPasa-2 de testicles.- L'isoenzim de testicles "T" ha estat descrit recentment per Sakata *et al.*, (1991). Sembla ser el producte de l'expressió d'un tercer gen que presenta una forta homologia en els dominis quinasa i bisfosfatasa amb les altres isoformes. Al igual que en els altres cassos, les divergències es troben a nivell del primer i darrers exons transcrits. L'expressió del cDNA clonat produeix una proteïna de 55 kDa que s'associa formant homodímers. Presenta propietats cinètiques similars a les altres formes excepte que l'enzim de testicles és fosforil·lat per PKC però no per PKA en clara diferència amb les formes hepàtica i cardíaca (Sakata *et al.*, 1991).

S'han descrit altres PFK-2/FBPasa-2es amb propietats cinètiques i de fosforil·lació diferenciades dels prèviament descrits. L'isoenzim de cèl·lules d'hepatoma de rata (HTC) s'havia vist que no era fosforil·lable per PKA i no presentava activitat FBPasa-2 (Loiseau *et al.*, 1988). Això representaria la primera isoforma que no presentaria bifuncionalitat. Recentment, el clonatge i expressió de l'enzim present a aquestes cèl·lules indica que és idèntic al tipus "M" però on la seva activitat FBPasa-2 està inhibida per algun mecanisme desconegut (Crepin *et al.*, 1989). També hi ha evidències d'una possible transició isoenzimàtica durant el desenvolupament hepàtic. La forma fetal, a diferència de l'adult, es fosforil·la per PKA i PKC però aquestes fosforil·lacions no produeixen modificacions de l'activitat quinasa (Martín-Sanz *et al.*, 1992).

PFK-2/FBPASA-2 CEREBRAL

Caracterització molecular de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral.- Havíem vist que els nivells de Fru 2,6-P₂ es mantienien, en general, bastant estables al llarg d'una ampla varietat de situacions experimentals. Igualment, l'anàlisi de les activitats PFK-2 i FBPasa-2 en aquestes situacions mostrava que en cap d'elles es produïen modificacions importants de les seves V_{max}. Per aquest motiu vam creure important abordar la caracterització d'aquestes dues activitats que es comportaven a cervell d'una forma clarament diferenciada respecte altres teixits de mamífer, i en especial del teixit hepàtic.

Per procedir a caracteritzar les propietats de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral vam purificar-la d'extractes cerebrals de rata. En paral·lel vam dur extractes de fetge, múscul i cor, de les que havien estat descrites diferents formes isoenzimàtiques. Vam utilitzar un

procediment que incloua dues etapes: un fraccionament entre el 6 i el 21% de PEG 6000 i una cromatografia de bescanvi iònic en una columna Mono Q. El perfil d'elució de la columna amb un gradient de NaCl mostrava que l'activitat PFK-2 coelua amb la FBPasa-2. La Figura 3.3 senyala com els isoenzims muscular i hepàtic elueixen aproximadament a 0.4 M de NaCl mentre els isoenzims de cor i cervell elueixen aproximadament a 0.2 M.

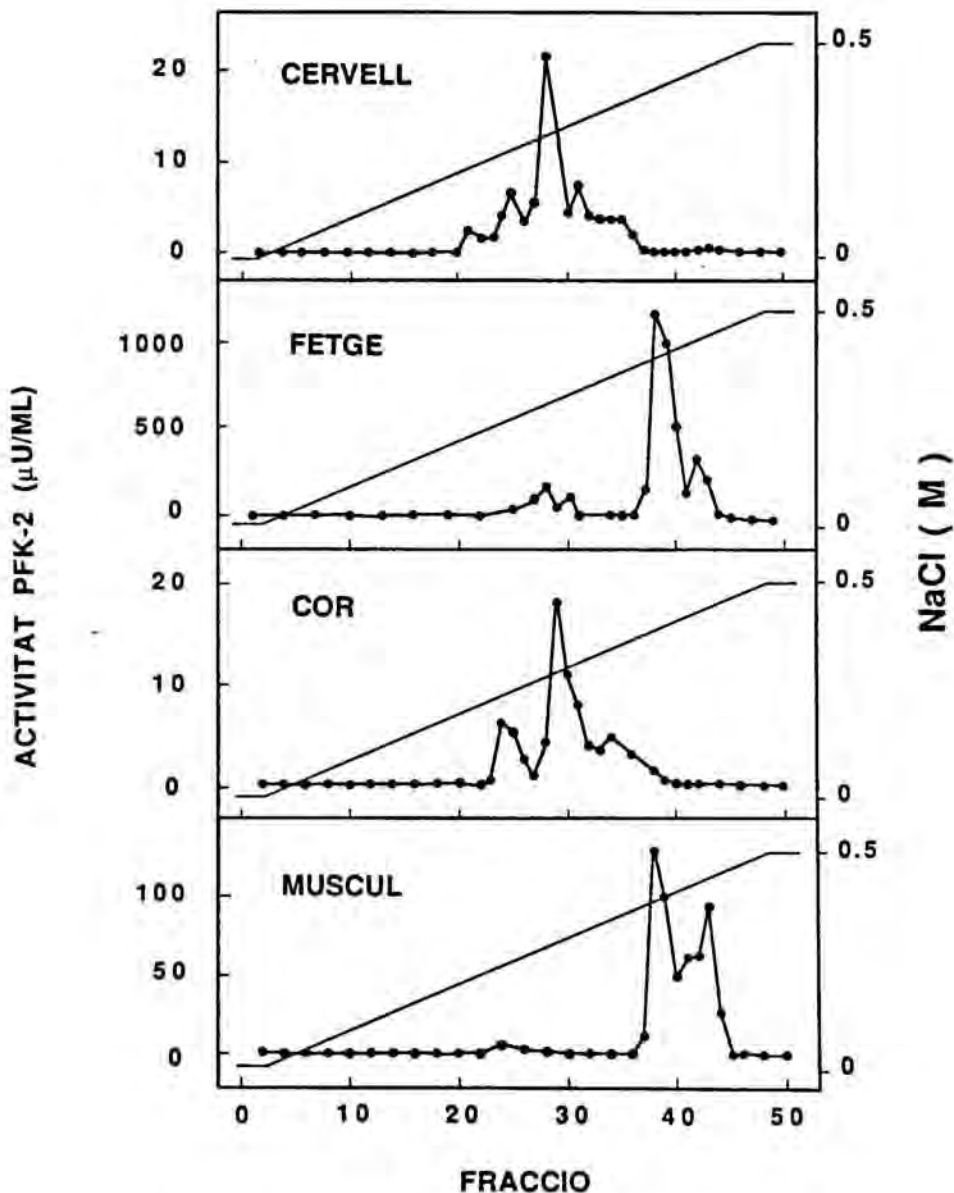


Figura 3.3.- Perfils d'elució de la PFK-2 de cervell, cor, fetge i muscul.

Adaptada de Ventura *et al.* (1991a). Les fraccions purificades tenien una activitat específica de 0.55, 0.30, 3.4 i 0.53 mU/mg de proteïna per cervell, cor, fetge i muscul respectivament.

Es interessant constatar com totes les formes elueixen en varios pics que podrien representar o bé l'existència de més d'una forma isoenzimàtica, com podria ser el cas de cor, o bé l'existència de la mateixa forma en diferents estats de fosforil.lació. Després de l'incubació del segon pic de la forma hepàtica amb fosfatasa alcalina i reaplicació a la columna s'observava un altre cop l'aparició dels dos pics, amb predomini del primer que correspon a la forma no fosforil.lada. Això suggereix que els dos pics, d'almenys la forma hepàtica, corresponen a diferents estats de fosforil.lació.

Tan la PFK-2 com la FBPasa-2 coelueixen de la columna per a totes les isoformes, suggerint que totes elles són bifuncionals. La relació quinasa/bisfosfatasa de l'enzim cerebral era molt elevada, aproximadament 70. Aquesta dada justifica els alts nivells de Fru 2,6-P₂ observats a cervell malgrat la reduïda activitat PFK-2 (10 cops menor que la observada a fetge). El fet d'observar relacions PFK-2/FBPasa-2 de només 10 quan es mesura en extractes directes no purificats suggereix que aquesta activitat FBPasa-2 pot estar elevada *in vivo* degut a l'acció de modificadors de la seva activitat o bé a l'existència d'altres tipus de fosfatases inespecífiques que actuïn sobre la Fru 2,6-P₂. El manteniment de l'activitat FBPasa-2 en extractes filtrats a través de columnes d'exclusió molecular de G-25 fa suposar que té lloc la segona possibilitat.

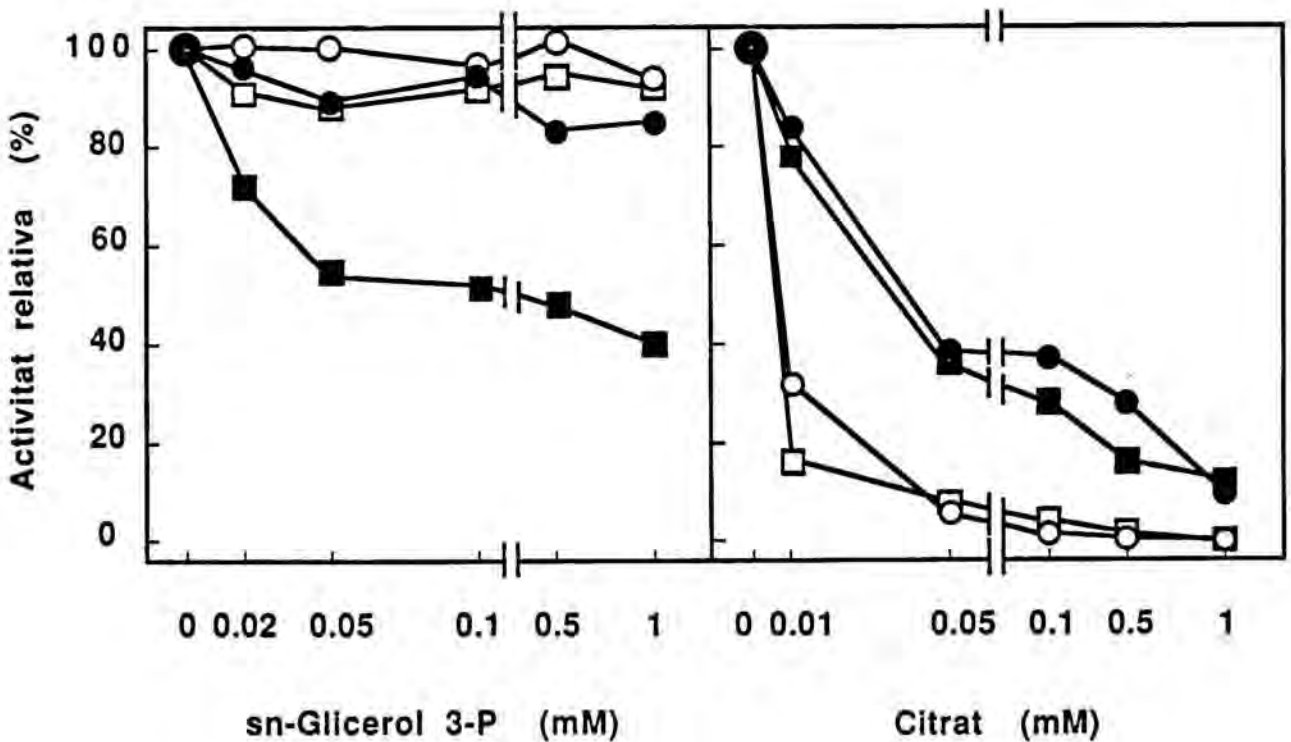


Figura 3.4.- Efectes del glicerol 3-fosfat i el citrat a l'activitat PFK-2 de cervell, cor, fetge i múscul de ratna.

Adaptada de Ventura *et al.* (1991a).

S'havia descrit que els efectes cinètics del Gli 3-P i el citrat eren diferents per als diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2. A la Figura 3.4 s'observa com mentre l'activitat quinasa hepàtica es fortament inhibida pel Gli 3-P, l'isoenzim de cervell, juntament amb el muscular i el cardíac, no eren afectats per concentracions de Gli 3-P fins a 1 mM. Igualment, en condicions subòptimes de Fru 6-P, la PFK-2/FBPasa-2 cerebral al igual que la cardíaca, eren molt més sensibles a l'inhibició per citrat que les formes muscular i hepàtica.

Aquestes dades de tipus estructurals i cinètic feien pensar que la PFK-2/FBPasa-2 present a teixit cerebral de rata podria ser molt similar a l'isoenzim de cor prèviament descrit. Va ser del tot sorprenent doncs, les dades obtingudes per estudis d'incubació amb [2-³²P] Fru 2,6-P₂ seguits de SDS-PAGE de l'intermediari E-P radiactiu format i per estudis de Western blot. Com es mostra a la Figura 3.7 en el cas de cervell boví, els anticossos policlonals de la forma hepàtica de la PFK-2/FBPasa-2 reconeixien per Western blot a l'enzim purificat de cervell de rata. S'observava una única banda corresponent a un pes molecular de 120 kDa en un Western corregut en un gel en condicions desnaturalitzants. Igualment SDS-PAGE de mostres de PFK-2/FBPasa-2 cerebral incubades amb [2-³²P] Fru 2,6-P₂ mostraven també un únic senyal de pes molecular 120 kDa. Aquestes dades evidenciaven que la PFK-2/FBPasa-2 cerebral purificada era un isoenzim diferent dels prèviament descrits i que presentava subunitats d'alt pes molecular.

Amb aquestes evidències de que ens trobavem amb una possible forma isoenzimàtica específica de teixit cerebral vam procedir a una major purificació de l'enzim cerebral. Donada la baixa activitat detectada de l'enzim en teixit cerebral vam escollir com a material biològic de partida el cortex boví obtingut directament de l'escorxador i minimitzant els temps d'isquèmia *post-mortem*. Els cervells eren disseccionats, mantinguts en gel i utilitzats immediatament. Uns 700 grams de cortex, net de meninges i vasos, eren homogenats en 3 volums de amortidor A (veure "Abreviatures") a 4°C. L'homogenat era centrifugat a 15000 x g durant 20 minuts. S'afegia PEG 6000 fins a un percentatge del 6% (pes/volum), es deixava reposar 10 minuts a la cambra freda i es centrifugava a 15000 x g durant 20 minuts. Al sobrenedant recollit s'hi afegia 15% (pes/volum) de PEG 6000 i el pH es portava fins a 6.5. Es deixava reposar durant 10 minuts a la cambra freda i es centrifugava de nou a 15000 x g durant 20 minuts. El pellet era redissolt en 300 ml. d'amortidor B (veure "Abreviatures") i clarificat per centrifugació a 15000 x g durant 15 minuts. L'enzim s'aplicava a una columna de Blue Sepharose CL6B (1.8 x 35 cm) que havia estat prèviament equilibrada amb amortidor B. La columna era rentada durant tota la nit i fins que la concentració de proteïna eluida era

negligible. La PFK-2/FBPasa-2 s'el·luïa (aproximadament entre 5 i 10 mM de ATP-Mg) amb un gradient de 0-15 mM d'ATP-Mg en amortidor B. Les fraccions que contenen l'activitat PFK-2 eren ultrafiltrades fins a 3 ml. amb un equip Amicon amb filtres YM-10. Aquest ultrafiltrat es diluïa quatre cops i s'aplicava a una columna Mono Q equilibrada amb amortidor C (veure "Abreviatures"). Un cop rentada la columna amb el mateix amortidor s'aplicava un gradient de KCl (0-300 mM). La PFK-2/FBPasa-2 el·luïa aproximadament a 0.2 M de KCl i un cop diluïda dos cops era reaplicada a la mateixa columna i el·luïda en un gradient similar però amb un pendent menor. L'enzim el·luïa en forma d'un sol pic (Figura 3.5). Les fraccions que contenen l'enzim pur eren guardades amb glicerol al 20% a -80°C . D'aquesta forma l'enzim era estable durant almenys tres mesos.

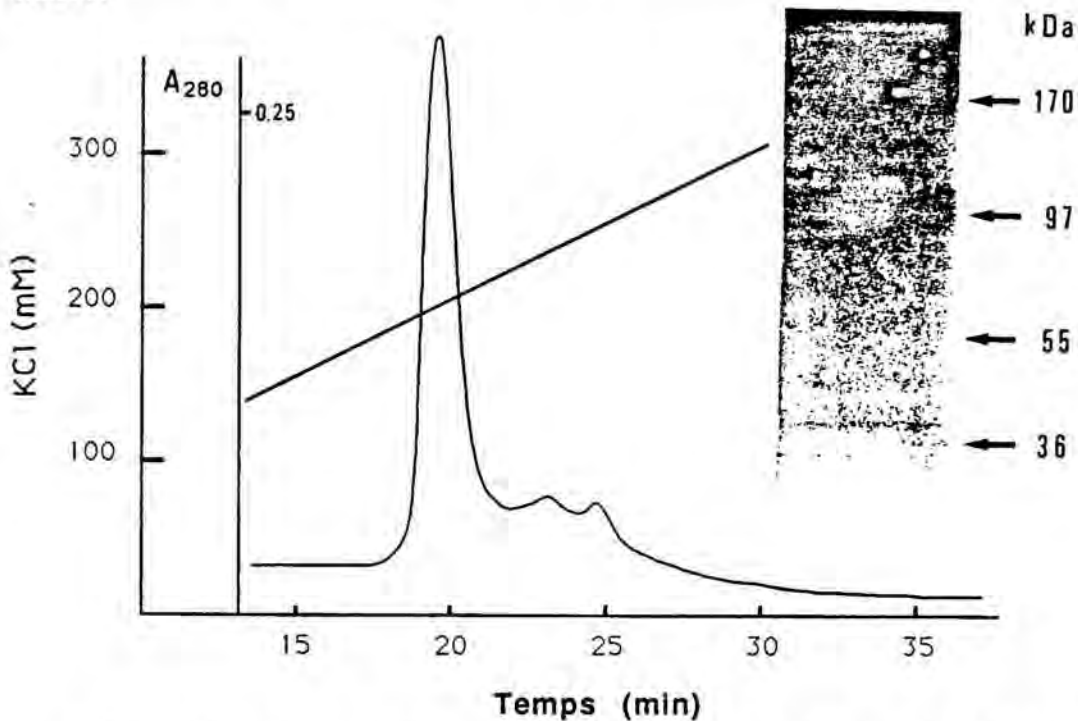


Figura 3.5.- Perfil d'elució de la columna Mono-Q i SDS-PAGE de la PFK-2/FBPasa-2 de cervell boví.

Adaptada de Ventura *et al.* (1992). Perfil d'elució de la columna Mono-Q després de reaplicar les fraccions prèviament purificades. L'enzim el·luïa entre els minuts 19 i 21. També es mostra la electroforesi d'una fracció del pic. La posició dels marcadors de pes molecular està indicada per les fletxes.

Aquest mètode de purificació permet l'aïllament de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral amb un rendiment global del 10%. El procediment és ràpid (menys de quatre dies) i permet aïllar l'enzim pur amb un grau de purificació de més de 15000 vegades (Figura 3.6). A més durant aquest procediment no vam trobar altres pics d'activitat PFK-2. L'enzim pur tenia activitat quinasa (90 mU/mg de proteïna) i bisfosfatasa (29 mU/mg de proteïna) de forma que es pot concloure que l'enzim cerebral és també bifuncional.

Etapes	Proteïna	Activ. PFK-2	Act. Esp.	Purificació	Rendiment
	mg	mU	mU/mg	vegades	%
Extracte	25002	147	0.006	1	100
6-21% PEG	4242	82.4	0.019	3.2	56
Blue-Seph.	3.44	48.4	14.1	2345	32.9
Mono-Q	0.71	31.6	44.5	7417	21.5
Mono-Q Reaplicació	0.15	13.9	92.7	15450	9.5

Figura 3.6.- Purificació de la PFK-2/FBPasa-2 de cervell boví.

Adaptada de Ventura *et al.* (1992).

El pes molecular de l'enzim nadiu és de 225.000 Da determinat en una columna d'exclusió molecular Superosa 12 HR mentre que la electroforesi en condicions desnaturalitzants mostra una sola banda de 120 kDa de pes molecular (Figura 3.6 i 3.7). Aquestes dades indiquen que l'estructura de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral és la de homodimers d'alt pes molecular si es compara amb les altres formes conegudes. Aquestes dades es van comprovar per medi d'estudis de Western blot amb l'anticòs de la forma hepàtica i amb marcatge amb [2-³²P] Fru 2,6-P₂ (Figura 3.7). El Western indica que l'anticòs de la forma hepàtica reconeix la forma cerebral de forma que comparteixen almenys certa relació antigènica. El marcatge específic amb [2-³²P] Fru 2,6-P₂ suggereix que el mecanisme de reacció de la bisfosfatasa es similar també al de les altres PFK-2/FBPase-2 descrites, intervinguent-hi la formació d'una fosfo-histidina com a intermediari de reacció.

Per tal d'obtenir més informació de tipus estructural de la naturalesa de la nova forma aïllada vam seqüenciar la proteïna després de l'alquilació amb 4-vinil-piridina. Els resultats negatius indicaven que l'extrem amino-terminal estava bloquejat per a la degradació d'Edman. Vam procedir doncs, a la seqüenciació de fragments procedents de digestions amb CNBr. Els fragments de digestió en CNBr van ser separats per SDS-

PAGE en gels de 15% d'acrilamida i 0.75% de bisacrilamida i posteriorment els fragments van ser transferits a membranes. Després de la detecció amb Coomassie Blue es van detectar tres pèptids de pesos moleculars 36.000, 32.000 i 22.000 Da. El pèptid de 36 kDa va ser seqüenciat directament de la membrana i va conduir a una seqüència amb certesa fins el desé aminoàcid. La seqüència és Gln-Val-Asn-Gln-His-Leu-Lys-Gly-Glu-Tyr. Aquesta seqüència no té homologies significatives amb qualsevol seqüència corresponent a les PFK-2/FBPasa-2es conegudes.

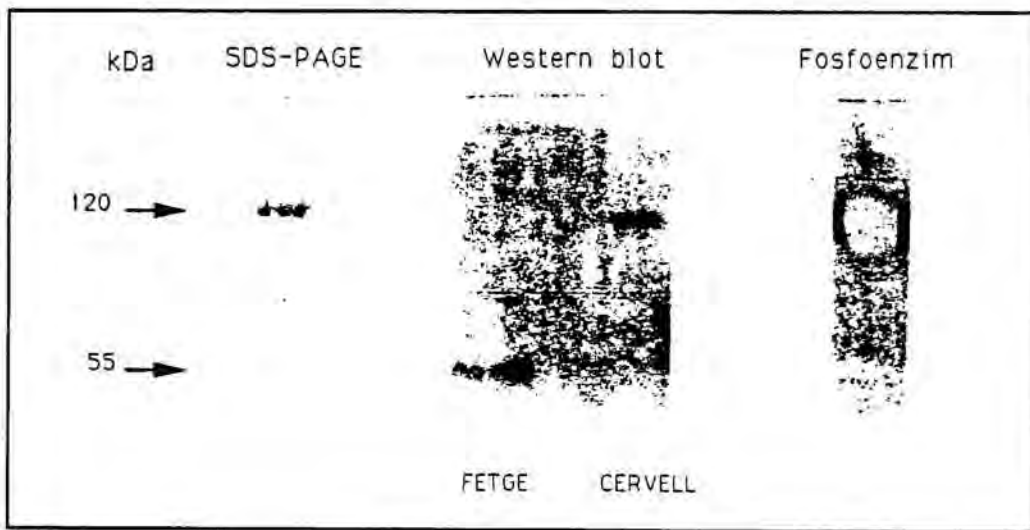


Figura 3.7.- SDS-PAGE, Western blot i marcatge amb fructosa 2,6-bisfosfat de la PFK-2/FBPasa-2 de cervell boví.

Adaptat de Ventura *et al.* (1992). A l'esquerra es pot observar la tinció amb Coomassie Blue, en el centre la autorradiografia del Western blot i a la dreta el marcatge amb ($2\text{-}^{32}\text{P}$) fructosa 2,6-bisfosfat de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral.

Totes aquestes dades de tipus estructural indiquen que la PFK-2/FBPasa-2 present a teixit cerebral correspon a un nou isoenzím, específic de teixit nerviós, que no havia estat descrit fins el moment. Aquesta forma curiosament presenta un pes molecular doble i almenys certa part de la seva seqüència és diferent de les altres formes conegudes. Comparteix amb elles certes propietats bàsiques com són la bifuncionalitat, formació d'un intermediari fosforil·lat per incubació amb [$2\text{-}^{32}\text{P}$] Fru 2,6- P_2 , de forma que es llògic suposar un mecanisme de reacció, almenys per la fosfatasa, similar als altres isoenzím.

A més es reconegut per anticossos contra la forma hepàtica per el que es pot suggerir una similitud en l'estructura secundària de certes zones que li confereixi similituds antigèniques. Una forma de la PFK-2/FBPasa-2 de llevat, també de tamany elevat (93 kDa), s'ha clonat i expressat recentment (Kretsmer and Fraenkel, 1991). Aquesta forma té els dos dominis quinasa i bisfosfatasa i seqüències addicionals als extrems amino i carboxi-terminal. Malgrat tenir el domini de la bisfosfatasa similar a les altres formes la histidina 258 es troba substituïda per una serina i aquesta forma no mostra activitat bisfosfatasa. Aquests resultats junt amb els nostres mostrarien un altre grup d'isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2 amb tamany molt superiors als coneguts fins el moment i que presentarien zones reguladors d'elevat tamany als dos extrems dels dominis catalítics.

Adició	Activitat PFK-2 (mU/mg prot.)			
	Cervell	Cor	Fetge	Múscul
control	0.49	0.18	4.03	0.65
+ subunitat catalítica	0.46	0.17	0.98	0.60

Teixit	Adició	Activitat PFK-2 (mU/mg prot.)	
		Condicions Òptimes	Condicions Subòptimes
Cervell	control	0.46	0.27
	+ subunitat catalítica	0.45	0.29
Fetge	control	4.01	1.87
	+ subunitat catalítica	2.79	1.08

Figura 3.8.- Efecte del tractament de la PFK-2 amb la subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Modificada de Ventura *et al.* (1991a). PFK-2 purificada de cervell, cor, fetge i múscul va ser incubada 20 min a 30° C amb 0.1 mU de subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Posteriorment l'enzim va ser incubat per a determinar la seva activitat en condicions saturants (5mM Fru-6-P) o subsaturants (0.1 mM Fru-6-P) de substrats. Els valors són el promig de dos assatjos independents.

Fosforil·lacions per PKA i PKC de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral.- Les fosforil·lacions per PKA i PKC són unes altres propietats diferencials per a totes de les PFK-2/FBPasa-2 descrites. Nosaltres vam efectuar incubacions amb PKA i PKC i vam estimar les modificacions que produeixen en l'activitat PFK-2 a condicions òptimes i subòptimes de concentració de Fru 6-P. A la Figura 3.8 s'observa com mentre l'isoenzim hepàtic és inhibit més d'un 75% per incubació amb PKA, l'isoenzim de cervell de rata, al igual que el muscular i el cardíac, no modificava la seva activitat a condicions òptimes ni subòptimes de substrats. Per comprobar si l'absència de modificació podia ser deguda al fet que els enzims estiguessin en una forma ja totalment fosforil·lada vam incubar-los amb glucosa, ADP-Mg, hexoquinasa i la subunitat catalítica de la PKA. S'havia descrit que en aquestes condicions la PKA actuava de forma inversa i defosforil·lava específicament els seus substrats (El-Maghrabi *et al.*, 1980). Després d'aquest tractament tampoc no vam obtenir cap modificació de forma que es pot concloure que no es produeixen canvis en ni en la V_{max} ni en la K_m per la Fru 6-P per la PFK-2 cerebral associats a fosforil·lacions dependents de PKA. Aquest resultat es contradiu amb els de Kitamura *et al.*, (1988) i els de Rider *et al.* (1992) que indiquen una lleugera modificació de la K_m per la Fru 6-P per la PFK-2 cardíaca. La modificació però, és poc important quantitativament i si tenim en compte que no modifica l'activitat FBPasa-2 ni modifica la sensibilitat cap a altres efectors com el citrat, l'efecte d'aquesta fosforil·lació semblaria fisiològicament poc important en comparació als efectes produïts per altres efectors al·lostèrics tan sobre l'activitat quinasa com sobre la bisfosfatasa.

Vam analitzar també les possibles modificacions d'activitat que la fosforil·lació per PKC pogués produir sobre els diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2. S'havia suggerit que aquesta fosforil·lació activava l'enzim cardíac (Kitamura *et al.*, 1988). A la Figura 3.10 es mostra com cap de les activitats, incloent la cerebral, no eren modificades per la fosforil·lació dependent de PKC. Igualment, tampoc no s'observava modificació si prèviament eliminàvem els possibles fosfats que ja estiguessin incorporats a l'enzim per tractament durant 20 minuts a 30^o C amb 1 unitat de fosfatasa alcalina immobilitzada en agarosa. L'activació de l'activitat cardíaca per fosforil·lació per PKC suggerida per Kitamura *et al.* (1988) no era observada en els nostres experiments ni en els d'altres grups (Rider and Hue, 1986; Rider *et al.*, 1992). Rider *et al.* (1992), atribueixen aquestes discrepàncies a que les modificacions en la V_{max} obtinguda per Kitamura *et al.* (1988) podrien estar degudes a un efecte activador directe de la fosfatidil-serina i l'oleïna sobre la PFK-2 donat que en els seus experiments, ja s'observa aquest efecte al incubar amb aquest compostos i absència de PKC.

Adició	Activitat PFK-2 (mU/mg prot.)			
	Cervell	Cor	Fetge	Múscul
Defosforil.lada	0.23	0.038	2.14	0.14
+ proteïna quinasa C	0.25	0.035	2.09	0.13

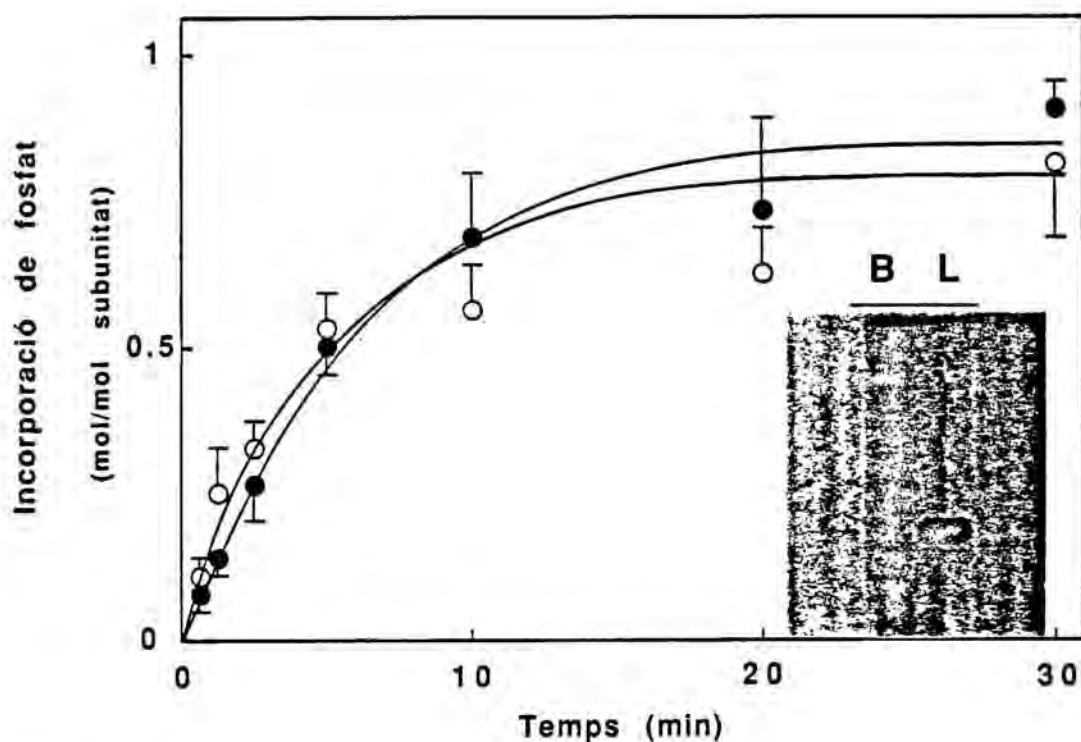
Figura 3.9.- Efecte del tractament de la PFK-2 amb proteïna quinasa C.

PFK-2 purificada de cervell, cor, fetge i múscul va ser defosforil.lada durant 20 min amb 1 U de fosfatasa alcalina immobilitzada. Després els enzims van ser incubats 20 min a 30^o C en presència de 0.1 unitats de proteïna quinasa C en un medi que contenia 2 mM CaCl₂, 50µg/ml de fosfatidil-serina i 2 µg/ml de dioleïna, 1mM ATP-Mg, 5mM P_i, 2mM ditiotritol, 5mM MgCl₂ i 100 mM Hepes pH 7.1. Els valors són el promig de dos experiments independents.

Aquests resultats obtinguts amb l'enzim cerebral de rata parcialment purificat els vam comprovar amb l'enzim pur de cortex boví. Com es mostra a la Figura 3.10, la subunitat catalítica de la PKA catalitza la fosforil.lació de la PFK-2/FBPasa-2 de cervell i la de fetge. Si incubàvem concentracions similars dels dos isoenzims, la velocitat de fosforil.lació era similar per als dos isoenzims (Figura 3.10). La estequiometria de la fosforil.lació era 0.9 mols i 0.8 mols de fosfat/mol de subunit per la PFK-2/FBPasa-2 cerebral i hepàtica respectivament. Aquests resultats indiquen una relació propera a 1 suggerint que la PFK-2/FBPasa-2 de cervell té un sol lloc de fosforil.lació per PKA. Aquest fet fa descartar la idea, com es podria pensar al observar un pes molecular doble al dels altres isoenzims, de que la forma cerebral hagi evolucionat per medi d'una duplicació gènica a partir d'altres formes de l'enzim bifuncional.

Al igual que el que havíem observat amb el enzim purificat de rata, la fosforil.lació per la subunitat catalítica de la PKA no modificava ni la K_m ni la V_{max} de la PFK-2, i tampoc modificava l'activitat FBPasa-2 en condicions subsaturants (Figura 3.10). És probable que aquest major tamany de la forma cerebral impedeixi la transmissió, als dominis catalítics, del senyal produït per la fosforil.lació via PKA. Per altra banda, l'incubació de la proteïna purificada de cortex amb PKC no donava cap tipus de senyal de

fosforil·lació de forma que es pot afirmar que l'isoenzim cerebral, al contrari que el de cor i testicles, no és substrat de la PKC.



Adició	Activitat PFK-2 (mU/mg prot.)	Activitat FBPassa-2 (mU/mg prot.)
control	62.4	0.95
+ subunitat catalítica PKA	65.8	1.07

Figura 3.10.- Fosforil·lació de la PFK-2/FBPassa-2 de cervell boví per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Modificat de Ventura *et al.* (1992). La PFK-2/FBPassa-2 de cervell i fetge van ser incubades en presència de 2 mU/ml de subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Als temps indicats es van extreure al·liqüotes i es va mesurar el (^{32}P) fosfat incorporat. Els valors són el promig \pm S.E.M. per tres experiments independents. Igualment, d'al·liqüotes d'aquestes incubacions es van determinar les activitats PFK-2 i FBPassa-2 que es mostren a la taula i es van sotmetre a SDS-PAGE. Al panel inferior es pot observar la autoradiografia del gel.

Propietats cinètiques de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral. Vam determinar diverses propietats cinètiques de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral (Figures 2.11). Els valors de la K_m per la Fru 6-P i el ATP són similars als obtinguts per els isoenzims de múscul i cor (Kitamura and Uyeda, 1988; Kitamura *et al.*, 1989; Rider *et al.*, 1985) mentre el valor de la K_m per la Fru 6-P és menor que l'obtinguda per a la forma hepàtica (revisat a Van Schaftingen, 1987; Hue and Ridet 1987; Pilkis and El-Maghrabi, 1988). Curiosament, la FBPasa-2 té una alta K_m per la Fru 2,6-P₂, molt superior a les seves concentracions fisiològiques suggerint que *in vivo* aquesta activitat es troba en condicions subsaturants de substrat. A més, aquesta activitat mostra una alta sensibilitat a l'inhibició no-competitiva a concentracions fisiològiques de Fru 6-P (Figura 2.11). El citrat va demostrar tenir un efecte dual en les dues activitats. Reduïa la K_m per la Fru 2,6-P₂ de la bisfosfatasa sense modificar la seva V_{max} , mentre inhibia molt fortament la activitat quinasa. Altres modificadors de l'activitat quinasa hepàtica, com el glicerol 3-P (Figura 3.4) i el fosfo-enol-piruvat, no modificaven cap de les dues activitats, mentre l'ATP tampoc no modificava la FBPasa-2 cerebral.

	V_{max}	K_m ATP	K_m Fru-6-P	K_i citrat
<u>PFK-2</u>	90 mU/mg	55 μ M	27 μ M	35 μ M
	V_{max}	K_m Fru-2,6-P ₂	K_i Fru-6-P	K_a citrat
<u>FBPasa-2</u>	29 mU/mg	70 μ M	20 μ M	16 μ M

Figura 3.11.- Constants cinètiques de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral.

Adaptada de Ventura *et al.* (1992).

Donat que la fosforil·lació per PKA no té implicacions en l'activitat enzimàtica, el control de les activitats PFK-2 i FBPasa-2 dependrà bàsicament de variacions en els nivells dels seus substrats i efectors al·lostèrics. A més, no hem observat variacions de l'activitat enzimàtica significatives al llarg de diverses situacions experimentals estudiades, de forma que sembla que no hi hagi un fort control de la seva expressió gènica i/o degradació de la proteïna o ARNm. La concentració de Fru 2,6-P₂ als teixits de mamífer està doncs, control·lada per la relació d'activitats PFK-2 i FBPasa-2. La relació quinasa/bisfosfatasa és propera a 3 si les dues activitats es mesuren com a V_{max}. Malgrat això, hem vist que la bisfosfatasa té una alta K_m per el seu substrat comparada amb la de l'isoenzim hepàtic. Aquest fet suggereix que en condicions fisiològiques aquesta relació encara serà més elevada i explicaria els alts nivells de Fru 2,6-P₂ (5-6 nmol/g) malgrat els baixos nivells d'enzim (0.5 mU/g). A més, la bisfosfatasa es trobarà inhibida per les concentracions de Fru 6-P normals a cervell (20 µM). Donat que la Fru 6-P és el substrat de la PFK-2 i els seus valors de K_m són propers també a la seva concentració intracel·lular, és lògic suposar que els nivells de Fru 6-P control·len, en bona part, els nivells de Fru 2,6-P₂. Un increment de la concentració de Fru 6-P produirà un augment de la de Fru 2,6-P₂ a través d'un increment de l'activitat PFK-2 i una inhibició de la FBPasa-2 per l'inhibició acompetitiva de la Fru 6-P. Inversament una disminució dels nivells de Fru 6-P conduïxen a baixades de Fru 2,6-P₂ i, en conseqüència, del flux glicolític. Aquesta situació era la que s'observava en situacions com la isquèmia i la hipoglicèmia (Ventura *et al.*, 1991, Ambrosio *et al.*, 1991). Totes aquestes consideracions no afecten a l'altre substrat de la PFK-2, l'ATP, donat que aquest isoenzim té una K_m tan baixa que es trobarà permanentment saturat del seu substrat.

Com a efector més important trobat, hem caracteritzat els efectes duals que exerceix a la PFK-2 i a la FBPasa-2. No només inhibeix molt fortament la quinasa, sinó també activa la bisfosfatasa (activació de 2 cops a 5 µM) per disminució de la seva alta K_m per la Fru 2,6-P₂. D'aquesta forma el citrat, el qual es troba elevat en animals diabètics (Ventura *et al.*, 1991) o durant la lactància (Stumpf and Kraus, 1979), pot mediar els efectes d'estalvi de glucosa promoguts per la utilització de cossos cetònics. El citrat inhibeix directament la PFK-1 i, a més, inhibeix la PFK-2 i activa la FBPasa-2. La disminució que s'observa de Fru 2,6-P₂ actuarà sinèrgicament amb el citrat i mantindrà a la PFK-1 en un estat poc actiu.

Capítol 4:

Clonatge i expressió de la
PFK-2/FBPasa-2 cerebral

EXPRESSIO DELS GENS DE LA PFK-2/FBPASA-2

Estructura i expressió dels gens de la PFK-2/FBPasa-2. Diversos ARNm que codifiquen diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2 han estat identificats: un ARNm de 2.1-2.2 kb per a la forma hepàtica, un de 1.9 kb per a la forma muscular, un de 4 kb per a la forma de cor boví i un de 2 kb per a la forma de testicles (Darville *et al.*, 1987; Colosia *et al.*, 1987; Crepin *et al.*, 1989; Sakata and Uyeda, 1990, Ventura *et al.*, 1991; Sakata *et al.*, 1991).

El gen que codifica els isoenzims de fetge i múscul, anomenat gen A, ha estat caracteritzat (Darville *et al.*, 1989; Lange *et al.*, 1989; Lemaigre *et al.*, 1991; Lange *et al.*, 1992) i localitzat al cromosoma X en rata i en humans (Darville *et al.*, 1989; Hilliker *et al.*, 1991). Aquest gen de 55 kb de longitud i 15 exons codifica els isoenzims de múscul i fetge per splicing alternatiu a partir de dos promotors diferents (Figura 4.1). Els ARNm de "L" i "M" comparteixen 13 exons idèntics. En canvi tenen un primer exò addicional que és específic de la forma "M" (primer exò del gen) i de la "L" (segon exò del gen). Es genera un transcrit específic de múscul des d'un promotor situat en la posició 5' del gen. La regió promotora de la forma hepàtica es troba situada entre els exons primer de la forma muscular i primer de la forma hepàtica (Darville *et al.*, 1989), d'aquest darrer promotor es genera el transcrit específic de fetge.

Experiments de *footprinting* indiquen que en el promotor de la forma hepàtica es troben seqüències que uneixen factors de transcripció amb ubiqüitat i altres específics de teixit hepàtic que actuen o bé com a activadors o repressors en cèl.lules hepàtiques o bé com a silenciadors en cèl.lules no hepàtiques. En el promotor hepàtic s'han trobat quatre seqüències d'unió de NF-I amb una funció d'estimulació de la transcripció. Un altre proteïna de la família de Oct-1 sembla mediar l'estimulació del promotor hepàtic per unió a un lloc de vuit nucleòtids. També s'hi troben footprints específics de fetge que inclouen seqüències de possible unió de Tf-LF2 o alguna proteïna relacionada, una seqüència poli(dG), regions amb resposta a glucocorticoids i uns altres dos llocs d'unió de factors específics de fetge i altres que actuen com elements de regulació negativa en cèl.lules que no siguin hepàtiques (Lemaigre *et al.*, 1991). En canvi, en el promotor muscular només s'han trobat fins el moment regions d'unió NF-I (Darville *et al.*, 1989). Recentment, s'ha descrit un potent element de resposta a glucocorticoids en el primer intrò del gen (concretament entre els exons 1' hepàtic i el 2 que correspon a les dues formes) (Lange *et al.*, 1992).

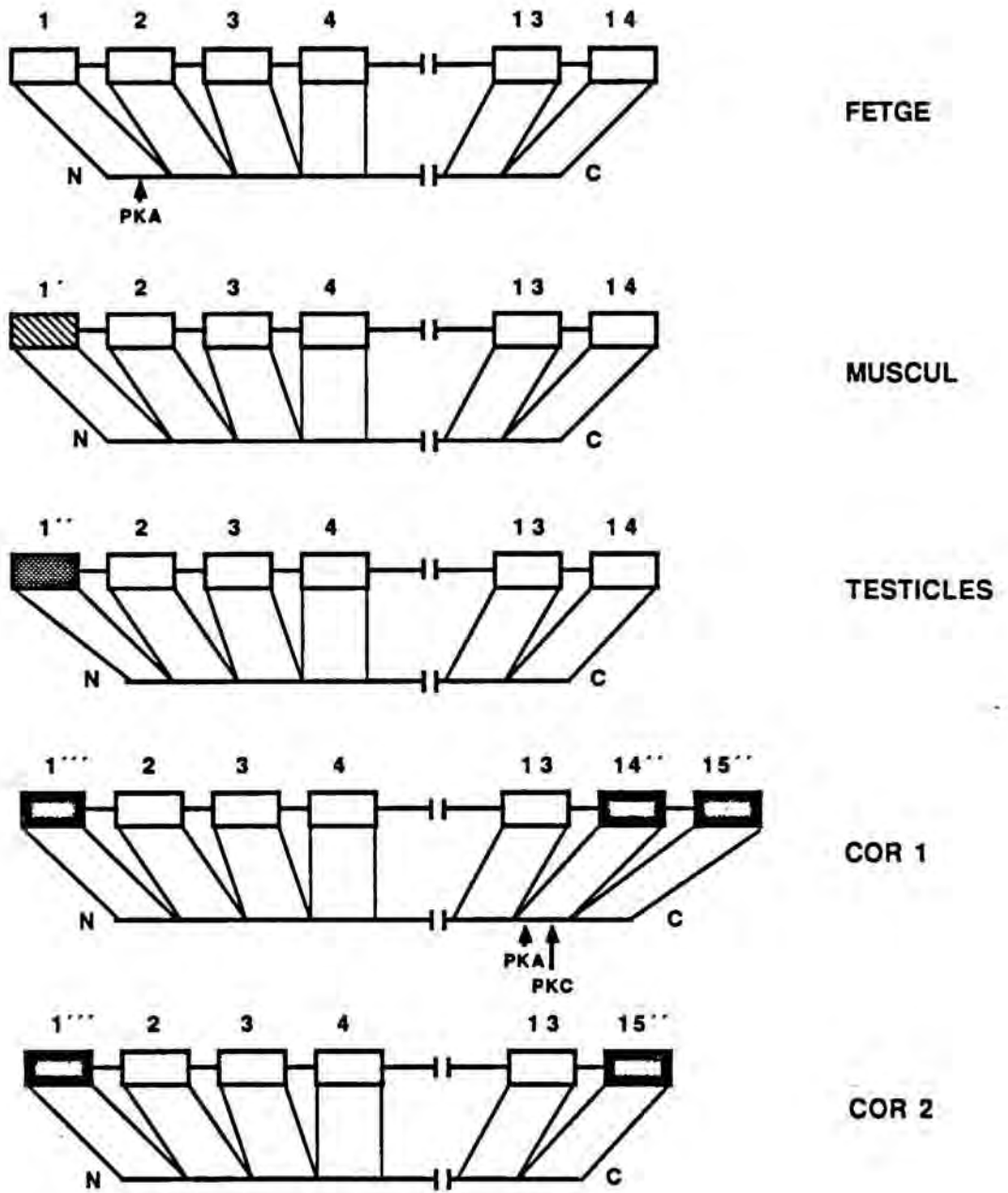


Figura 4.1.- Estructura dels gens de la PFK-2/FBPasa-2.

Modificada de Ventura *et al.* (1991b). A la Figura s'observa els exons expressats dels diferents gens de la PFK-2/FBPasa-2. En el cas de testicles aquests exons són hipotetitzats donat que no es disposa de la seqüència del gen. Els exons marcats com () són els corresponents als dominis catalítics i que presenten forta homologia entre tots ells. Les fletxes indiquen els punts de control per fosforil·lació.

L'estructura del gen B, corresponent als dos isoenzims aïllats de cor, és similar a la descrita per el gen A (Figura 4.1). Al igual que en el gen A, el gen B probablement prové de la fusió de dos gens ancestrals que codifiquen per a una fosfotransferasa i una fosfohidrolasa respectivament. D'aquesta forma, els exons 3-14 del gen B són un 66% homòlegs als exons 2-13 del gen A i codifiquen per als dominis catalítics dels enzims. Aquest gen B conté, a més, un possible exò no codificant (exò 1) i el primer exò codificant (exò 2) que no guarda cap homologia amb els exons 1 o 1' de les formes "M" i "L" del gen A. En el extrem 3', aquest gen B presenta dos exons (15 i 16) diferents també de l'exò 14 que seria el seu corresponent en el gen A. L'exò 15 inclou la seqüència que codifica per a les dianes de fosforil·lació per PKA i PKC (Sakata and Uyeda, 1989; Darville *et al.*, 1991). En aquest gen es troben dues senyals de poliadenilació que permetien suggerir la possibilitat de dos isoenzims diferents per splicing diferencial del mateix transcrit primari. Aquesta hipòtesi ha estat demostrada per clonatge (Sakata and Uyeda, 1991) i seqüenciació proteïca (Rider *et al.*, 1992) dels dos isoenzims previstos i presents a cor. Un d'ells conté tots els exons codificants del gen B, mentre l'altre no presenta l'exò 15 que és el que conté les dianes de fosforil·lació per PKA i PKC.

El gen que codifica per a la isoforma present a testicles no ha estat caracteritzat fins el moment. Malgrat això es pot deduir l'estructura dels exons codificants del mateix a partir de la seqüència de cDNA clonada (Sakata *et al.*, 1991). Els que probablement seran els exons 2-14 de la forma testicular presenten una gairebé total similitud (94%) amb els exons 2-14 de les formes muscular i hepàtica i els exons 3-14 de la forma cardíaca (Figura 4.1). En canvi en la zona 5' de la seva seqüència, en el lloc que probablement correspondrà al primer exó, es completament diferent a totes les altres PFK-2/FBPasa-2s descrites i no presenta la diana de fosforil·lació per PKA de la forma hepàtica.

D'aquestes dades d'estudi dels promotors es desprén que, almenys el gen de la PFK-2/FBPasa-2 hepàtica, està sotmés a una complexa regulació multihormonal (Kummel and Pilkis, 1990). Hi ha grups que, en animals diabètics, han observat disminució en els nivells de ARN^{PFK-2/FBPasa-2} (Miralpeix *et al.*, 1992), mentre altres grups indiquen que els nivells no varien significativament ni en diabetis ni dejuni (Colosia *et al.*, 1988). El que sí és plenament acceptat és l'augment que es produeix durant la realimentació o l'administració d'insulina en animals dejunats o diabètics respectivament (Colosia *et al.*, 1988; Miralpeix *et al.*, 1992). S'han observat també increments de ARN^{PFK-2/FBPasa-2} en animals adrenalectomitzats després del tractament amb glucocorticòids (Marker *et al.*, 1989), i en rates hipotiroidees després de tractar-les amb triiodotironina (Wall *et al.*, 1989). En cèl·lules d'hepatoma de rata (FTO-2B) l'insulina i la dexametasona augmenten també els nivells de ARN^{PFK-2/FBPasa-2} per augment de la

velocitat de síntesi sense afectar la velocitat de degradació del ARN^{PFK-2/FBPasa-2}. L'exposició de les cèl.lules a un medi lliure de glucosa abolia els increments produïts per l'insulina, però no els produïts per dexametasona (Cifuentes *et al.*, 1991). Durant la regeneració hepàtica, s'ha observat un fenomen bifàsic; durant les primeres hores post-hepatectomia es produeix una disminució dels nivells de ARN^{PFK-2/FBPasa-2} per disminució de la seva velocitat de síntesi i sense modificar-se apreciablement la seva velocitat de degradació. Posteriorment, la velocitat de transcripció augmenta per sobre dels valors control amb un màxim a les 72 hores (Rosa *et al.*, 1992).

L'augment que produeixen els glucocorticoides en la transcripció del ARN^{PFK-2/FBPasa-2} de la forma hepàtica no ha estat comprovat fins el moment per a la forma muscular. Malgrat això construccions efectuades amb el promotor de la forma muscular i l'element de resposta a glucocorticoides experimentaven induccions de fins a 10 cops en la seva velocitat de transcripció en presència de dexametasona (Lange *et al.*, 1992). En canvi, i a diferència de la forma hepàtica, el ARN^{PFK-2/FBPasa-2} a múscul esquelètic no presenta variacions amb el dejuni i la realimentació (Colosia *et al.*, 1988). Respecte a la transcripció de la forma cardíaca es disposa de poques dades. El que es coneix és que no presenta variacions de proteïna o ARNm en animals amb hipotiroidisme ni amb l'administració de triiodetironina (Wall *et al.*, 1989).

Possibles vies evolutives de la PFK-2/FBPasa-2. Un cop obtinguda la seqüència de la PFK-2/FBPasa-2 es va efectuar la búsqueda, en bases de dades, de possibles homologies amb altres proteïnes. Curiosament es van obtenir similituds, en el domini de la bisfosfatasa, amb la fosfoglicerat mutasa de llevat i la 2,3-bisfosfoglicerat mutasa humana. Aquestes homologies no només són estructurals sinó també funcionals. Tauler *et al.* (1987) van observar que el domini de la FBPasa-2 catalitzava també l'hidròlisi del 1,3-bisfosfoglicerat competitivament amb la Fru 2,6-P₂. Bazan *et al.*, (1989) van confirmar que aquestes homologies també incloïen similituds en l'estructura secundària en el domini d'unió de nucleòtids trifosfat de la PFK-2.

Aquests resultats van suggerir la idea d'una possible via evolutiva per a la PFK-2/FBPasa-2. Aquest model proposa l'existència de diferents gens ancestrals per a la unitat funcional fosfotransferasa i la fosfohidrolasa/mutasa. Sobre aquests gens van coincidir almenys dos vies evolutives: una divergent que condueix a l'aparició d'enzims monofuncionals i una fusió gènica que conduiria a la formació de les PFK-2/FBPasa-2es (Figura 4.2). En suport de la primera via s'han observat, en protozous, formes de PFK-2 i FBPasa-2 que no són bifuncionals (Van Schaftingen *et al.*, 1987) i en plantes (McDonald *et al.*, 1987). Les dades obtingudes a partir del clonatge del gen A no fan sinó

corroborar la segona via de la hipòtesi (Darville *et al.*, 1989). El domini de la quinasa, que correspon als exons 3-7 i on es troben les tres cisteïnes essencials per a la seva activitat és molt similar a una regió de la proteïna E1 del virus del papiloma. Al domini de la bisfosfatasa, els exons 8-9, són molt similars a la fosfoglicerat mutasa i la 1,3-bisfosfoglicerat mutasa. D'aquesta forma la PFK-2/FBPasa-2 s'originaria per la fusió de dos dominis catalítics: PFK-2 (exons 3-7) i FBPasa-2 (exons 8 i 9). A aquests dos dominis s'hi haurien afegit, al llarg del temps, altres dominis de caracter regulador codificats per altres exons. Això inclouria els exons 1 i 1' de la PFK-2/FBPasa-2 que conté la diana de fosforil·lació per PKA de la forma hepàtica (Darville *et al.*, 1989), i els exons 15 i 16 de les formes cardíques i que contenen les dianes de fosforil·lació per PKA i PKC (Sakata and Uyeda, 1990; Darville *et al.*, 1991; Sakata and Uyeda, 1991; Rider *et al.*, 1992).

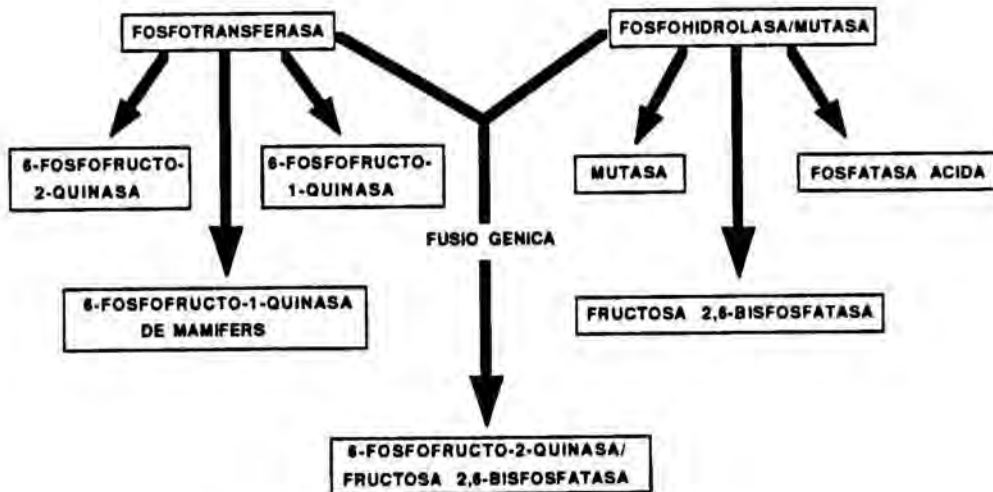


Figura 4.2.- Possible via evolutiva de la PFK-2/FBPasa-2.

Adaptada de El-Maghrabi *et al.* (1990).

EXPRESSIO DE LA PFK-2/FBPASA-2 CEREBRAL

Per estudiar l'expressió de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral vam efectuar l'anàlisi de RNA total cerebral per tècniques de Northern blot. Vam extreure RNA total de cervell de rata i, en paral·lel, de fetge múscul i cor com a control donat que el tamany dels seus missatgers ja havien estat descrits (Crepin *et al.*, 1989; Sakata and Uyeda, 1990). Aquests filtres van ser hibridats amb la sonda de cDNA^{2k1400} (Colosia *et al.*, 1988), corresponent als dominis catalítics de la PFK-2/FBPasa-2 hepàtica i que vam suposar seria força homòloga als seus corresponents dominis a la forma cerebral.

Com es veu a la Figura 4.3, tots els teixits presentaven un fort senyal fins i tot en condicions de rentat severes (0.1xSSC, 0.1xSDS a 50° C). El RNA de fetge i múscul mostraven les bandes característiques de 2.1 i 1.9 kb respectivament. Els RNAs de cervell i cor presenten dos senyals, un més intens d'aproximadament 6.8 kb i un de menor intensitat a 4 kb. L'intensitat relativa d'aquests dos senyals no variava apreciablement en rantats de baixa o alta severitat suggerint que els dos es tracten d'hibridacions específiques.

Aquests dos senyals poden ser dos tipus d'espècies de mRNA presenta a teixit cerebral o bé, donat que es tracta de RNA total, poden ser senyals deguts a mRNA i diferents transcrits no processats. Aquests resultats indiquen també que en teixit cerebral sols s'expressen mRNAs d'alt pes molecular (> 4 kb) donat que no s'observa cap tipus de senyal de menor tamany. Aquests tamanyos de mRNA són coherents amb l'expressió d'una proteïna d'alt pes molecular. Donat que en aquest rang de tamanyos de transcrit la resolució del Northern és baixa, la similitud entre els senyals observats a cervell i cor poden ser degudes a una similitud en el tamany dels missatgers respectius sense descartar la possibilitat de coexpressió dels dos isoenzims en els mateixos tipus cel.lulars o bé en diferents tipus cel.lulars i/o àrees cerebrals.

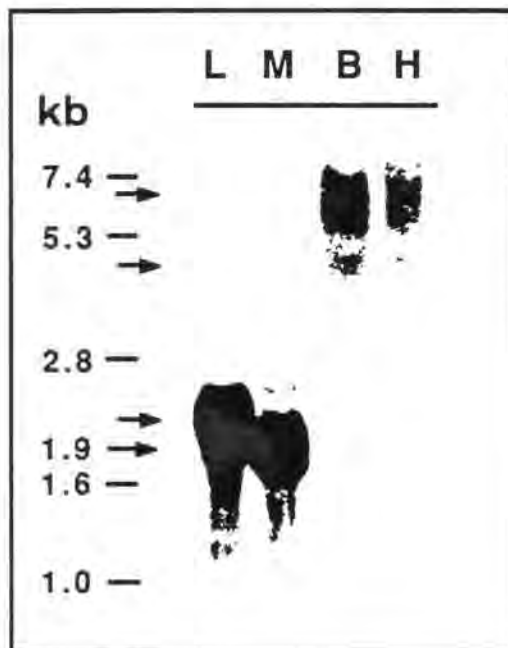


Figura 4.3.- Expressió de diferents mRNAs de la PFK-2/FBPasa-2.

Adaptada de Ventura *et al.* (1991a). RNA total de fetge (L), múscul (M), cervell (B) i cor (H) van ser hibridats amb la proba cDNA^{2k1400}. Els resultats són representatius de tres experiments independents.

CLONATGE DEL cDNA DE LA PFK-2/FBPASA-2 CEREBRAL

Aïllament de clons de cDNA.- Amb l'objectiu d'aïllar clons de cDNA corresponents a la PFK-2/FBPasa-2 cerebral es van analitzar genoteques de cDNA comercials construïdes en λ gt 10 i λ gt 11 a partir de RNA poli(A)⁺ de cervell boví. Per determinar els clons positius vam utilitzar la sonda RI/BsnI corresponent al domini bisfosfatasa de la PFK-2/FBPasa-2 de cor humà i que havíem observat que hibridava en Northern blots de RNA total de cervell.

Vam analitzar 200.000 clons d'una genoteca de cDNA construïda en λ gt 10 a partir de RNA poli(A)⁺ de cervell boví cebat amb oligonucleòtids a l'atzar. De l'anàlisi, efectuat en filtres de nylon (Hybond) per duplicat, vam obtenir dos clons (B82 i B85) que hibridaven amb la sonda. La digestió del DNA dels fags amb l'enzim *Eco RI* ens va permetre estimar el tamany dels clons, que en els dos casos va ser aproximadament de 1500 bp, no presentant cap d'ells dianes *Eco RI* internes. Aquest fragments es van subclonar en pEMBL i es van efectuar mapes de restricció dels dos clons (Figura 4.4). D'aquesta forma vam poder deduir que els dos clons eren idèntics.

Vam analitzar també 500.000 clons d'una genoteca de cDNA construïda en λ gt 11 a partir de RNA poli(A)⁺ de cervell boví cebat amb oligo (dT). Vam utilitzar com a sonda el clon obtingut a l'anàlisi de la genoteca anterior. D'aquest anàlisi vam obtenir tres clons idèntics que, un cop seqüenciats es va comprovar que corresponien a l'isoenzim cardíac de la PFK-2/FBPasa-2. Aquesta dada ens indica que a cervell s'expressen, almenys, els isoenzims cerebral i cardíac.

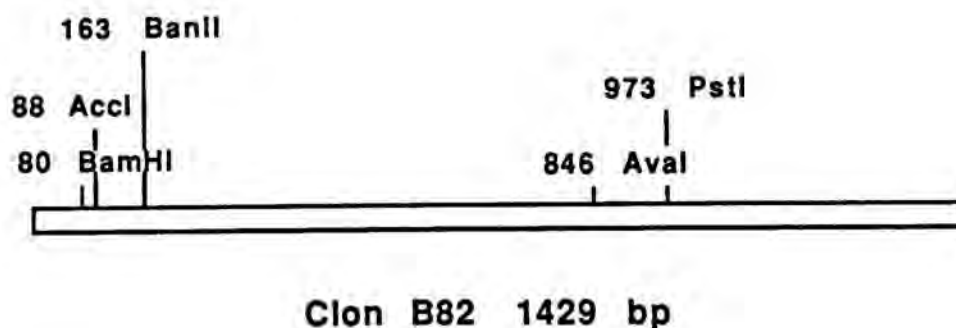


Figura 4.4.- Mapa de restricció del clon B82.

El gràfic mostra la posició dels punts de tall pels enzims de restricció indicats que es van utilitzar per comparar els diferents clons obtinguts.

Anàlisi de la seqüència del cDNA del clon B82.- L'anàlisi de la seqüència del nucleòtids del clon de cDNA B82 corresponent a la PFK-2/FBPasa-2 cerebral va ser efectuada pel mètode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) seguint el protocol subministrat en el "kit" comercial T7 sequencingTM (Pharmacia). Utilitzàvem com a motlle DNA de doble cadena dels subclons adients. Per a la seqüenciació vam utilitzar oligonucleòtids cebadors universals de M13 i específics de seqüències obtingudes amb anterioritat.

La seqüenciació completa del cDNA de B82 ens indica que aquest s'exté al llarg de 1429 bp tots ells corresponents a un marc de lectura obert. No es van trobar cap codó de parada ni cap seqüència consensus de senyal de poliadenilació. D'aquesta forma, vam deduir que ens trobàvem amb un clon parcial, la qual cosa és coherent amb l'alt pes molecular del proteïna purificada de cervell boví. La seqüència de nucleòtids i la seqüència d'aminoàcids deduida es mostren a la Figura 4.5. El marc de lectura correcte va ser deduit per comparació amb la seqüència dels altres isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2 prèviament clonats.

1/1	31/11
TCA GAA GGG GTG GAG GGC CGC CGA GCC TCG	CGT GGG AAG ATG CCC TTG GAG CTG ACT CAG
ser glu gly val glu gly arg arg ala ser	arg gly lys met pro leu glu leu thr gln
61/21	91/31
AGC CGG GTG CAG AAG ATC TGG ATC CCG GTC	GAC CAC CGC CCC TCG CTG CCC AGA ACC TGT
ser arg val gln lys ile trp ile pro val	asp his arg pro ser leu pro arg thr cys
121/41	151/51
GGG CCG AAG CTC ACC AAC TCC CCG ACA GTG	ATT GTC ATG GTG GGG CTC CCT GCC CGT GGG
gly pro lys leu thr asn ser pro thr val	ile val met val gly leu pro ala arg gly
181/61	211/71
AAG ACC TAC ATC TCC AAG AAG CTA ACC CGC	TAC CTC AAC TGG ATT GGT GTC CCG ACG AAA
lys thr tyr ile ser lys lys leu thr arg	tyr leu asn trp ile gly val pro thr lys
241/81	271/91
GTG TTC AAC TTG GGC GAG TAC CGC CGG GAC	GGC GTG AAG CAG TAC AGC TCC TAC AAC TTC
val phe asn leu gly glu tyr arg arg asp	gly val lys gln tyr ser ser tyr asn phe
301/101	331/111
TTC CGC CCT GAC AAC GAG GAG GCC ATG AAA	GTC CGC AAG CAG TGT GCC CTG GCT GCC TTG
phe arg pro asp asn glu glu ala met lys	val arg lys gln cys ala leu ala ala leu
361/121	391/131
AGA GAT GTC AAA AGT TAC CTG ACG AAG GAG	GGG GGC CAG ATC GCA GTT TTC GAT GCC ACC
arg asp val lys ser tyr leu thr lys glu	gly gly gln ile ala val phe asp ala thr
421/141	451/151
AAT ACT ACT AGA GAG AGG AGA CAC ATG ATC	CTC CAT TTT CCG AAA GAA AAC GAT TTC AAG
asn thr thr arg glu arg arg his met ile	leu his phe pro lys glu asn asp phe lys
481/161	511/171
GTG TTT TTC ATT GAG TCT GTG TGT GAT GAC	CCT ACA GTC GTT GCC TCC AAC ATC ATG GAA
val phe phe ile glu ser val cys asp asp	pro thr val val ala ser asn ile met glu
541/181	571/191

GTG AAA ATC TCT AGC CCG GAT TAC AAA GAT TGC AAC TCC CGA GAG AAC GCT ATG GAC GAC
 val lys ile ser ser pro asp tyr lys asp cys asn ser arg glu asn ala met asp asp
 601/201 631/211
 TTC ATG AAG AGA ATT AAC TGC TAT GAG GCC AGT TAC CAG CCC CTC GAC CCT GAT AAT GAT
 phe met lys arg ile asn cys tyr glu ala ser tyr gln pro leu asp pro asp asn asp
 661/221 691/231
 GAC AGG GAC TTG TCG CTG ATT AAG GTG ATC GAT GTG GGC CAG CGC TTC CTG GTG AAC CGT
 asp arg asp leu ser leu ile lys val ile asp val gly gln arg phe leu val asn arg
 721/241 751/251
 GTG CAG GAT CAC ATT CAG CGC CGC ATC GTG TAC TAC CTG ATG AAC ATC CAC TGG CAG CCC
 val gln asp his ile gln arg arg ile val tyr tyr leu met asn ile his trp gln pro
 781/261 811/271
 CGC ACC ATC TAC CTG TGC CGG CAT GGC GAG AGC AAG CAC AAC CTC CAA GGC AAG ATC GGG
 arg thr ile tyr leu cys arg his gly glu ser lys his asn leu gln gly lys ile gly
 841/281 871/291
 GGC GAC TCG GGC TTG TCC AGC CGG GGC AGG AAG TTC GCC AAC GCC CTG AGC AAG TTC GTG
 gly asp ser gly leu ser ser arg gly arg lys phe ala asn ala leu ser lys phe val
 901/301 931/311
 GAG GAG CAG AAC CTG AAG GAC CTC AAG GTG TGG ACC AGC CAG CTG AAG AGC ACC ATC CAG
 glu glu gln asn leu lys asp leu lys val trp thr ser gln leu lys ser thr ile gln
 961/321 991/331
 ACC GCC GAG GCC CTG CAG CTG CCT TAC GAG CAG TGG AAG GCC CTC AAC GAG ATC GAC GCG
 thr ala glu ala leu gln leu pro tyr glu gln trp lys ala leu asn glu ile asp ala
 1021/341 1051/351
 GGC GTG TGT GAG GAG ATG ACC TAC GAG GAG ATC AAG GAC ACC TAC CCC GAG GAG TAC GCG
 gly val cys glu glu met thr tyr glu glu ile lys asp thr tyr pro glu glu tyr ala
 1081/361 1111/371
 CTG GCT GAG GCA GAC AAG TAC TAC TAC CGC TAC CCT ACC GGG GAG TCC TAC CAG GAC CTG
 leu ala glu ala asp lys tyr tyr tyr arg tyr pro thr gly glu ser tyr gln asp leu
 1141/381 1171/391
 GTG CAG CGC TTG GAG CCG GTC ATC ATG GAA CTA GAG CGG CAG GAA AAC GTG CTG GTC ATC
 val gln arg leu glu pro val ile met glu leu glu arg gln glu asn val leu val ile
 1201/401 1231/411
 TGC CAC CAG GCC GTC TGC GTC TGC CTC CTG GCC TAC TTC CTT GAC AAG AGC GCA GAG GAG
 cys his gln ala val cys val cys leu leu ala tyr phe leu asp lys ser ala glu glu
 1261/421 1291/431
 ATG CCC TAC CTG AAG TGC CCG CTT CAC GCT GTC TTG AAG CTG ACT CCC ATC GCT TAT GGT
 met pro tyr leu lys cys pro leu his ala val leu lys leu thr pro ile ala tyr gly
 1321/441 1351/451
 TGC CGA GTA GAA TCC ATC TAC CTG AAC GTG GAG TCC GTG AGC ACA CAC CGG GAG AGG TCA
 cys arg val glu ser ile tyr leu asn val glu ser val ser thr his arg glu arg ser
 1381/461 1411/471
 GAG GAT GCA AAG AAG GGA CCT AAC CCG CTC ATG AGA AGC AAT AGT CAC
 glu asp ala lys lys gly pro asn pro leu met arg ser asn ser his

Figura 4.5.- Seqüència de nucleòtids i traducció del clon B82.

L'anàlisi de la seqüència del clon B82 ens indica que aquesta s'extén al llarg dels dos centres catalítics i per tant, i com era d'esperar, en tota la seva extensió presenta una forta homologia amb les seqüències dels cDNAs dels altres isoenzims. També s'observa que la PFK-2/FBPasa-2 cerebral és codificada per un gen que s'expressarà específicament a cervell i que no ha estat descrit fins el moment. L'isoenzim de llevat, que presenta al igual que el cerebral un alt pes molecular (Kretschmer and Fraenkel, 1991), presentava una homologia menor en tots els dominis (menys del 45% d'aminoàcids idèntics enfront el 65-67% d'identitat vers les isoformes de mamífer). D'aquesta forma s'evidencia que, malgrat es pogués suggerir una relació estreta entre aquestes dues isoformes de pes molecular elevat, no es troben evolutivament més properes que les formes corresponents a altres teixits de mamífer, almenys en les regions catalítiques.

Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids codificada pel cDNA del clon B82. El marc de lectura obert del clon B82 codifica per a un fragment proteic de 476 aminoàcids (Figura 4.5). En aquest fragment es troba una seqüència potencialment susceptible de N-glicosilació del tipus Asn-X-Ser/Thr a la posició 141. També es troba la seqüència Arg-Arg-Ala-Ser en la posició 10. Aquesta, és la seqüència consensus òptima per a la fosforil.lació per PKA (Kennelly and Krebs, 1991). Aquesta dada fa suposar que serà la fosforil.lació d'aquesta serina, situada en posició amino-terminal respecte els dominis catalítics, la que havíem comprovat que es produïa a la PFK-2/FBPasa-2 de cervell boví. Malgrat no ser les seqüències òptimes, també es troben quatre possibles seqüències de fosforil.lació per PKC en posicions 65, 142, 286, i 455. Aquest tipus de fosforil.lació no les havíem observat *in vitro* en l'enzim purificat, de forma que no semblen ser seqüències de reconeixement de PKC per aquest enzim. En posició 423 es troba una tirosina objecte de possible fosforil.lació teòrica per tirosina proteïna quinases. Malgrat això, mai no s'ha demostrat fosforil.lació d'aquesta tirosina, que és molt conservada entre els diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2.

La seqüència d'aminoàcids alineada amb la dels altres isoenzims de mamífer prèviament clonats es presenta a la Figura 4.6. En els extrems amino i carboxi-terminals, on es troben situades les regions reguladors, presenten entre totes elles poques similituds. En canvi, la seqüència cerebral presenta, en els dominis catalítics quinasa i bisfosfatasa, entre un 65% i un 67% d'identitat amb la PFK-2/FBPasa-2 de cor i fetge boví i les de cor, fetge i testicles de rata. Entre totes elles presenten una seqüència consensus en aquestes regions (de l'aminoàcid 43 al 460 de la forma cerebral) d'aprox del 60% d'aminoàcids.

Cervell (B)	SEGWEGRRAS	RGKMPLELTO	SRVQKIWIPV	DHRPS-LPRT	CG---PKL	TN
Fetge (B)		SQEMGELTO	TRLQKIWIPH	NNGNSRLQRR	RGSSIPQF	TN
Cor (B)		SGNPAS	SSEQNNNSYE	TKASLRISEK	KCSWASYMTN	
Testicle (R)		ASPRELTO	NPLKKIWMPY	SNG--RPAH	ASQRGVCM	TN
Cor (R)						
Fetge (R)		SREMGELTO	TRLQKIWIPH	SSSSVLQRR	RGSSIPQF	TN

Cervell (B)	SPTIVIMVGL	PARGKTYISK	KLTRYLNWIG	VPTKMFNLGE	YRFDGVKQYS
Fetge (B)	SPTMVMVGL	PARGKTYIST	KLTRYLNWIG	TPTKMFNLGQ	YRF-EDVSYR
Cor (B)	SPTMVMVGL	PARGKTYVSK	KLTRYLNWIG	VPTKMFNLGV	YRFQAVKSYK
Testicle (R)	CPTLIVMVGL	PARGKTYISK	KLTRYLNWIG	VPTREFNVGQ	YRRDMVKTYK
Cor (R)	PTLIVMIGL	PARGKTYVSK	KLTRYLNWIG	VPTKMFNLGV	YRREAVKSYK
Fetge (R)	SPTLIVMVGL	PARGKTYIST	KLTRYLNWIG	TPTKMFNLGQ	YRREAV-SYR

Cervell (B)	SYNFFRPDNE	EAMKVRKQCA	LAALRDVKS	LYTKEGGQIAV	FDATNTTTRER
Fetge (B)	NYEFFLPDNE	EALLIRKQCA	LAALKDVHSY	LSHEEGRVAV	FDATNTTTRER
Cor (B)	SYDFFRHDNE	EAMKIRKQCA	LMALKDVKAY	LTEESGQIAV	FDATNTTTRER
Testicle (R)	SFEFFLPDNE	EGLKIRKQCA	LAALNDVRKF	LSEEGGHVAV	FDATNTTTRER
Cor (R)	SYDFFRHDNE	EAMKIRKQCA	LMALDVKAY	FTEESGQIAV	FDATNTTTRER
Fetge (R)	NYEFFRPDNT	EAQLIRKQCA	LAALKDVHXY	LSREEGHVAV	FDATNTTTRER

Cervell (B)	RAMILHFPE	NDFKVFFIES	VCDDPTVVAS	NIMEVKISSP	DYKDCNSREN
Fetge (B)	RSLILQFAKE	HGYKVFFIES	ICNDPDVIAE	NIRQVKLGSP	DYIDCD-REK
Cor (B)	RDLLLNFAEE	NSFKVFFVES	VCDDPDVIAA	NILEVKVSSP	DYPERNRENV
Testicle (R)	RAMIFNFEQ	NGYKIFFVES	ICVDPEVIAA	NIVQVKLGSP	DYVNRDSDEA
Cor (R)	RDMLLNFAKQ	NAFKVFFVES	VCDDGDVIAA	NILEVKVSSP	DYPERNRENV
Fetge (R)	RSLILQFAKE	HGYKVFFIES	ICNDPEIAE	NIKQVKLGSP	DYIDCDQEKV

Cervell (B)	AMDDFMKRIN	CYEASYQHLD	PDNDDRDL	SLIKVIDVGQRF	LVNRFQDHIQ
Fetge (B)	VLEDFLKRIE	CYEVNYQHLD	-DELD	SHLSYIKIFDVGTRY	MVNRVQDHIQ
Cor (B)	VMDDFLKRIE	CYKVTYQHLD	PDSHDKDLSF	IKVINVGQRF	LVNKVQDYIQ
Testicle (R)	-TEDFMRRIE	CYENSYESLD	EE-QORDLSY	IKIMDVGQSY	VVNRVADHIQ
Cor (R)	-MEDFLKRIE	CYKVTYQHLD	PDNYDKDLSF	IKVMNVGQRF	LVNRFQDYIQ
Fetge (R)	-LEDFLKRIE	CYEINYQHLD	EE-IDSHLSY	IKIFDVGTRY	MVNRVQDHVQ

Cervell (B)	RRIVYYLMNI	HVQPRIIYLC	RHGESKHN	LQ GKIGGDSGLS	SRGRKFANAL
Fetge (B)	SRTVYYLMNI	HVTPRSIYLC	RHGESEINLR	GRIGGDSGLS	ARGKQYAYAL
Cor (B)	SKIVYYLMNI	HVHPRTIYLC	RHGESEFNLL	GKIGGDSGLS	VRGKQFAQAL
Testicle (R)	SRIVYYLMNI	HVTPRSIYLC	RHGESEINIK	GRIGGDFGLS	PRGREFSKHL
Cor (R)	SKIVYYLMNI	HVHPRTIYLC	RHGESEFNIL	GKIGGDSGLS	LRGKQFAQAL
Fetge (R)	SRTAYYLMNI	HVTPRSIYLC	RHGESEINLR	GRIGGDSGLS	ARGKQYAYAL

Cervell (B)	SKFVEEQNLK	DLKVVWISQLK	STIQTAEAALQ	LPYEQWKALN	EIDAGVCEEM
Fetge (B)	ANFIQSOGIS	SLKVGITSHMK	RTIQTAEAALG	LPYEQWKALN	EIDAGVCEEM
Cor (B)	RKFLEEQEI A	DLKVVWISQLK	RTIQTAESLG	VTYEQWKILN	EIDAGVCEEM
Testicle (R)	ACFISDQNIK	DLKVVWISQMK	RTIQTAEAALS	VPYEQWKVLN	EIDAGVCEEM
Cor (R)	KKFLEEQEI Q	DLKVVWIRKVK	RTIQTAESLG	VTYEQWKILN	EIDAGVCEEM
Fetge (R)	ANFIRSOGIS	SLKVVWISHMK	RTIQTAEAALG	VPYEQWKALN	EIDAGVCEEM
Cervell (B)	TYEEIKDTYP	EEYALAEADK	YYRYHTGES	YQDLVQRLEP	VIMELERCEN
Fetge (B)	TYEEIQEHYP	EEFALRDQDK	YRYRYHKGES	YEDLVQRLEP	VIMELERCEN
Cor (B)	TYAEIQEQYP	DEFALRDEEK	YLYRYFGGES	YQDLVQRLEP	VIMELERCEN
Testicle (R)	TYEEIQDHYP	IEFALRDQDK	YRYRYHKGES	YEDLVQRLEP	VIMELERCEN
Cor (R)	TYSEIQQRYP	EEFALRDQEK	YLYRYFGGES	YQDLVQRLEP	VIMELERCEN
Fetge (R)	TYEEIQEHYP	EEFALRDQDK	YRYRYHKGES	YEDLVQRLEP	VIMELERCEN
Cervell (B)	VLVICHQAVC	VCLLAYFLDK	SAEMPYLKC	PLHAVLKLTP	IAYGCRVESI
Fetge (B)	VLVICHQAVM	RCLLAYFLDK	SSDELPYLKC	PPSTVLKLTP	VAYGCKVESI
Cor (B)	VLVISHQAVM	RCLLAYFLDK	GADELPYLRC	PLHTIFKLTP	VAYGCKVETI
Testicle (R)	VLVICHQAVM	RCLLAYFLDK	AAEELPYLKC	PLHTVLKLTP	VAYGCKVESI
Cor (R)	VLVISHQAVM	RCLLAYFLDK	GADELPYLRC	PLHIFKLTP	VAYGCKVETI
Fetge (R)	VLVICHQAVM	RCLLAYFLDK	SSDELPYLKC	PLHTVLKLTP	VAYGCRVESI
Cervell (B)	YLNVESVSTH	RESEDAKKG	PNPLMRSNSH		
Fetge (B)	YLNVEAVNTH	REKPEVDIT	REPEALDTV	PAHY	
Cor (B)	KLNVEAVNTH	RDKPTNFPK	SQTPVRMRRN	SFTPLSSSNT	IRRPRNYSVG
Testicle (R)	FLNVAAVNTH	RDRPQNVDIS	RPSEEALVTV	PAHQ	
Cor (R)	TLNVEAVNTH	RDKPTHNFPK	SQTPVRMRRN	SFTPLSSSNT	IRRPRNYSVG
Fetge (R)	YLNVEAVNTH	REKPEVDIT	REAEALDTV	PAHY	
Cor (B)	SRPLQPLSPL	RALDTQEGAD	QPKTQAETSR	AAHRLPSPAP	PTSPS
Cor (R)	SRPLKPLSPL	RALDMQEGAD	QPKTQVSIPV	V	

Figura 4.6.- Comparació entre les seqüències d'aminoàcids de les PFK-2/FBPasa-2 conegudes.

Les seqüències consensu per a tots els isoenzims es troben enmarcades. (B) boví; (R) rata.

En el domini quinasa, la seqüència d'unió de nucleòtids trifosfat Gly-Leu-Pro-Ala-Arg-Gly-Tyr-Thr i les quatre cisteïnes (Cys 119,172,195 i 211) que es pensa que estan relacionades amb el mecanisme de catàlisi es troben a la forma cerebral i hepàtica. Curiosament, la cisteïna 195 està substituïda per una arginina en les formes de cor i testicle. La arginina 195, que es creu que intervé en la unió de Fru 6-P també es troba conservada en totes elles.

En el domini bisfosfatasa, la histidina implicada en la formació de l'intermediari de reacció fosforil.lat E-P (His 272 a la forma cerebral) es troba conservada. La histidina 406 de l'enzim cerebral, de la que s'ha suggerit que actua com a donador de protons a l'oxigen del fosfat col.locat en posició C-2 (Tauler *et al.*, 1990), també hi és present al igual que la lisina 369 (Li *et al.*, 1992) i el glutàmic 341 (Lin *et al.*, 1992). En canvi, de les dues arginines a les que se'ls ha suggerit un paper d'unió del grup fosfat en posició C-2, una d'elles (Arg 271) es troba a la forma cerebral, mentre l'altre està substituïda per una serina (Ser 321). Aquesta modificació en el centre actiu podria reflexar-se en les propietats cinètiques observades per aquesta forma. Es pot hipotetitzar que la manca d'aquesta arginina afeblirà l'interacció del substrat, Fru 2,6-P₂, amb el centre actiu de la FBPasa-2 la qual cosa pot conduir a la alta K_m observada en l'isoenzim cerebral en comparació amb les altres formes.

En conclusió, es pot afirmar que la PFK-2/FBPasa-2 cerebral és un isoenzim codificat per un gen encara no descrit i que s'expressa específicament a cervell. En aquest teixit, a més d'aquesta forma específica, s'expressa també la isoforma cardíaca prèviament descrita (Sakata and Uyeda, 1990). Per aprofundir en la significació d'aquesta doble presència, caldrien estudis per comprobar si aquestes dues expressions es produeixen en els mateixos tipus cel.lulars o bé s'expressen diferencialment en certes àrees i/o tipus cel.lulars. Aquestes dades també evidencien un alt grau de conservació dels dominis catalítics de les dues activitats. Les diferències, situades en els extrems de la proteïna, es corresponen acuradament amb els exons primer i darrers de totes les formes estudiades (Figures 4.1 i 5.2). Això fa suggerir que, en base a una fusió gènica inicial d'una fosfotransferasa i una fosfohidrolasa/mutasa ancestrals, altres exons s'han anat fusionant a aquests dominis. Això ofereix la possibilitat d'adquirir propietats reguladores diferencials que permetin satisfer les necessitats altament especialitzades dels diferents teixits de mamífer.

Aquests centres de regulació, concretament per processos de fosforil.lació/defosforil.lació, es troben en aquests dominis amino i carboxi-terminal. la forma hepàtica presenta fosforil.lació per PKA en la seva regió amino-terminal mentre la

cardíaca la presenta per PKA i PKC en la seva regió carboxi-terminal. Aquesta posició oposada dels centres de fosforil·lació es correspon amb efectes cinètics també oposats. La situació de l'isoenzim cerebral és similar a la del isoenzim hepàtic, observant-se una probable diana de fosforil·lació per PKA a la regió amino-terminal. Malgrat això, aquesta fosforil·lació, comprovada *in vitro*, no produeix els mateixos efectes sobre les dues activitats que a la forma hepàtica. Una possible hipòtesi a desenvolupar seria que els amplis dominis extracatalítics d'aquesta forma de 120 kDa influïrien en la manca de transmissió de la modificació covalent als dominis catalítics. D'aquesta forma, la fosforil·lació no tindria un efecte directe sobre les activitats, encara que no es poden excloure altres efectes indirectes no observats fins el moment.

Discussió general i perspectives

DISCUSSIO GENERAL I PERSPECTIVES

El cervell presenta un alt i continu nivell de consum energètic derivat de l'alt cost energètic del manteniment dels potencials d'acció necessaris per a la neurotransmissió. Aquest consum elevat no presenta, si prenem el cervell com a conjunt i en condicions normòxiques, variacions molt notables d'aquest consum com es desprén de les evidències que indiquen que en múltiples situacions fisiològiques el consum de glucosa presenta variacions de magnitud molt reduïda en comparació a altres teixits (Bradford, 1985; Bryan *et al.*, 1986; Siesjö, 1988).

S'havien trobat prou evidències de que el control de la glucolisi cerebral era exercit fonamentalment a través del control de les activitats hexoquinasa, piruvat quinasa i molt especialment, el control sobre la PFK-1 en adició al control del transport de glucosa que, en algunes condicions com l'anòxia i la hipoglucèmia, pot ser un factor limitant (Lund-Andersen, 1979; Lowry and Passonneau, 1964; Gorell *et al.*, 1977; Ruderman *et al.*, 1974; Kintner *et al.*, 1980).

La PFK-1 és modulada per numerosos efectors i representa un exemple paradigmàtic d'enzim multimodulat (Sols, 1981). La fructosa 2,6-bisfosfat havia estat descrit com l'activador allostèric més potent de la 6-fosfofructo-1-quinasa i inhibidor de la fructosa 1,6-bisfosfatasa, realitzant un paper important en la regulació de la glucolisi/gluconeogènesi hepàtica (Hue & Bartrons, 1985). En el cervell, el metabolisme de la fructosa 2,6-bisfosfat i el seu possible paper regulador sobre la glucolisi no havien estat estudiats fins el moment. Dades prèvies indicaven que la fructosa 2,6-bisfosfat era present en cervell de rata (Kuwajima & Uyeda, 1982) i en astròcits i neurones en cultiu (Pauwels & Trouet, 1984). A més, hi havia dades que demostraven que, d'una forma semblant a d'altres teixits, era un potent activador de la 6-fosfofructo-1-quinasa cerebral (Foe & Kemp, 1985; Vora *et al.*, 1985; Dunaway *et al.*, 1988).

Durant la isquèmia es produeix una activació de 4 a 7 vegades en el flux glucolític, evidenciant-se que el punt de control principal és la PFK-1 (Lowry *et al.*, 1964). La Fru 2,6-P₂, tot i ser el més potent activador de la PFK-1 descrit fins el moment, presenta uns augments molt lleugers en els seus nivells durant els primers segons d'isquèmia (Yamamoto *et al.*, 1990; Ogushi *et al.*, 1990; Ventura *et al.*, 1991). La forta activació inicial observada semblaria més relacionada als augments d'AMP i P_i i a la disminució de l'ATP que a les petites modificacions de Fru 2,6-P₂ observades. Això no exclouria la necessitat de mantenir els seus nivells elevats per tal d'actuar sinèrgicament amb els augments d'AMP i aconseguir una activació màxima de la PFK-1.

Durant la hipoglucèmia i la recirculació després d'un episodi isquèmic, el flux glucolític es troba disminuït per un bloqueig també a nivell de la PFK-1 (Gorell *et al.*, 1977; Kintner 1980). En aquestes situacions els baixos nivells de Fru 2,6-P₂ serien responsables en part del manteniment d'una reduïda activitat PFK-1 (Ambrosio *et al.*, 1991; Ventura *et al.*, 1991a). Durant la hipoglucèmia actuaria conjuntament amb l'augment de NH₄⁺ i la disminució de Fru 1,6-P₂, mentre que durant la recirculació després d'un episodi isquèmic actuaria conjuntament amb la disminució del pH intracel·lular donat que els altres efectors no varien o ho fan en sentit contrari.

En situacions com la diabetis, dejuni o durant la lactància s'havia descrit un efecte d'estalvi de glucosa per utilització de substrats alternatius, principalment cossos cetònics. Era una idea generalment acceptada que aquest estalvi era produït per una inhibició en l'activitat PFK-1 (Ruderman *et al.*, 1974; Gjedde and Crone, 1975; Newsholme *et al.*, 1977; Stumpf and Kraus, 1979). En el nostre model de rata vam observar que la disminució de nivells de Fru 2,6-P₂ correlacionava amb les disminucions del consum de glucosa i els augments de citrat observats (Figura 2.13). A més, d'aquestes dades es pot suggerir que les disminucions observades en els nivells de Fru 2,6-P₂ són secundàries i proporcionals als augments de citrat, ja que aquestes variacions només es produeixen quan s'eleva notablement els nivells de citrat. El citrat actua exercint efectes oposats sobre les activitats PFK-2 i FBPasa-2, inhibeix fortament a la quinasa i activa a la bisfosfatasa per disminució de la seva K_m (Ventura *et al.*, 1992). D'aquesta forma, el citrat inhibeix directament la PFK-1 (Newsholme *et al.*, 1977) i a més, disminueix els nivells de Fru 2,6-P₂ per modificació de l'activitat dels enzims del seu metabolisme. S'ha descrit també que els augments de citrat augmenten la K_a de la PFK-1 per la Fru 2,6-P₂ (Ishikawa *et al.*, 1990). Tot això fa que la Fru 2,6-P₂ actuï sinèrgicament amb les modificacions dels nivells de citrat que exerceix les funcions de senyal primari de l'efecte d'estalvi de glucosa quan altres substrats alternatius són metabolitzats.

Aquests resultats suggereixen que el paper desenvolupat per la Fru 2,6-P₂ és el manteniment de la PFK-1 en una situació d'activació permissiva essencial del flux glucolític i no el d'induir variacions intenses i ràpides del consum i metabolització de la glucosa. A més, les variacions en els nivells de Fru 2,6-P₂ semblen lligades a modificacions en els nivells dels seus substrats o modificació d'altres efectors de la pròpia PFK-1 de forma que no actuaria com a senyal primari sinó com a conseqüència de la resposta efectuada per altres mecanismes com la mobilització de glucogen, la disminució dels intermediaris glucolítics o la utilització de substrats alternatius a la glucosa. Avala aquesta hipòtesi el fet que les activitats PFK-2 i FBPasa-2 estan regulades

oposadament per els nivells de Fru 6-P, de forma que els nivells de Fru 6-P control·len directament i en el mateix sentit la concentració de Fru 2,6-P₂. Igualment, el citrat actuaria amb un efecte dual d'activació de la PFK-2 i inhibició de la FBPasa-2. Les variacions ràpides del metabolisme glucídic són induïdes per altres efectors que actuen sobre la PFK-1 com a senyals primaris: per exemple l'AMP i el P_i en el cas de l'inici d'un període isquèmic o el citrat en el cas de la diabetes i la lactància. Malgrat això, aquests senyals primers necessiten la modificació en el sentit adient dels nivells de Fru 2,6-P₂ per a tenir un efecte màxim, sigui aditiu o sinèrgic, sobre la PFK-1. D'aquesta forma i donada l'extremada sensibilitat de la PFK-1 a modificacions en la seva concentració, la Fru 2,6-P₂ sí té un paper, secundari però a d'altres efectors, en el sentit d'actuar de forma sinèrgica amb aquests senyals primaris de modificació del flux glucolític.

En un futur, seria interessant analitzar l'efecte dels neurotransmissors sobre el metabolisme de la Fru 2,6-P₂ en neurones i astròcits en cultiu. L'anàlisi de la possible correlació d'aquestes variacions amb les modificacions del metabolisme energètic cerebral observades en condicions d'estimulació nerviosa com l'estimulació lluminosa (Reivich and Alavi, 1973), estrés sonor (Justice *et al.*, 1989), depressió (Caldecott-Hazard *et al.*, 1988) o estats epilèptics (Fujikawa *et al.*, 1989) podria donar llum sobre quins són alguns mecanismes que relacionen l'activitat nerviosa amb el metabolisme energètic.

Era interessant la caracterització de les activitats PFK-2/FBPasa-2 presents a cervell donat que en cap situació estudiada s'havia observat modificacions importants de la seva V_{\max} . Les dades de tipus estructural evidencien que la PFK-2/FBPasa-2 cerebral correspon a un nou isoenzim, específic de teixit nerviós, que no havia estat descrit fins el moment. L'enzim és bifuncional amb activitats específiques de 92 mU/mg de proteïna i 29 mU/mg de proteïna per a la quinasa i la bisfosfatasa respectivament i presenta una estructura homodimèrica amb subunitats d'alt pes molecular, 120 kDa. Aquest enzim, comparteix certes propietats bàsiques amb els altres isoenzims descrits com són: bifuncionalitat i formació d'un intermediari de reacció fosforilat per incubació amb (2-³²P) Fru 2,6-P₂, de forma que probablement el mecanisme de reacció és similar al dels altres isoenzims, almenys per a la bisfosfatasa. A més, és reconegut per anticossos generats contra la forma hepàtica de forma que es poden suggerir similituds amb l'estructura secundària de les regions reconegudes per l'anticòs. En canvi, presenta un elevat tamany, 120 kDa per subunitat, i la seqüenciació de fragments proteics no revela cap tipus d'homologia amb els altres isoenzims dels que es coneix la seva seqüència (Ventura *et al.*, 1992).

Propietats	Teixits			
	Fetge	Múscul	Cor	Cervell
Ratio PFK-2/FBPase-2	1 - 4	0.2	80	70
Fosforil.lació per PKA	+	-	+	+
Canvis d'activitat	+	-	+ / -	-
Fosforil.lació per PKC	-	-	+	+
Canvis d'activitat	-	-	+ / -	-
Inhibició Glicerol 3-P	+	-	-	-
Inhibició Citrat	+	+	++	++

Figura D.1.- Característiques cinètiques i de fosforil.lació dels isoenzims de la PFK-2/FBPase-2.

Modificada de Ventura *et al.* (1990b). Les dades van ser preses de Rider and Hue (1986); Hue and Rider (1987); Kitamura *et al.* (1988) i Ventura *et al.* (1992). Simbologia: +, efectes detectables; -, sense efecte.

Les característiques cinètiques i de regulació alostèrica de l'enzim (Figures 3.11 i D.1) s'ajusten a les funcions, nivells tissulars i característiques del metabolisme de la Fru 2,6-P₂ observada als diferents models experimentals presentats al Capítol 2. Aquesta isoforma present a cervell, és fosforil.lada per PKA (Figura 3.10 i D1) però no ho és per PKC. La fosforil.lació per PKA presenta una relació màxima propera a 1 mol de fosfat/mol de subunitat, suggerint la presència d'un únic centre de fosforil.lació. Aquesta fosforil.lació però, no modifica cap paràmetre cinètic de l'enzim (Figures 3.8 i 3.10). Seria important realitzar estudis per determinar la significació fisiològica d'aquesta fosforil.lació i comprovar si aquesta es produeix *in vivo*. No es pot excloure que aquesta fosforil.lació pugui afectar a la vida mitja de l'enzim, modificar la interacció amb alguna

hipotètica proteïna reguladora o regular la unió a algun tipus d'estructura supramolecular, com en el cas de l'hexoquinasa (Knull et al., 1973; Xie and Wilson, 1988; Arora and Pedersen, 1988; Parry and Pedersen, 1990). Donat que l'isoenzim cardíac també és present a cervell (Pàgina 89) i la Fru 2,6-P₂ és present a totes les àrees (Figura 2.10) i tipus cel.lulars (Pauwels and Trouet, 1984) estudiats fins el moment, seria també interessant determinar la localització d'aquestes dues poblacions enzimàtiques en àrees i tipus cel.lulars cerebrals.

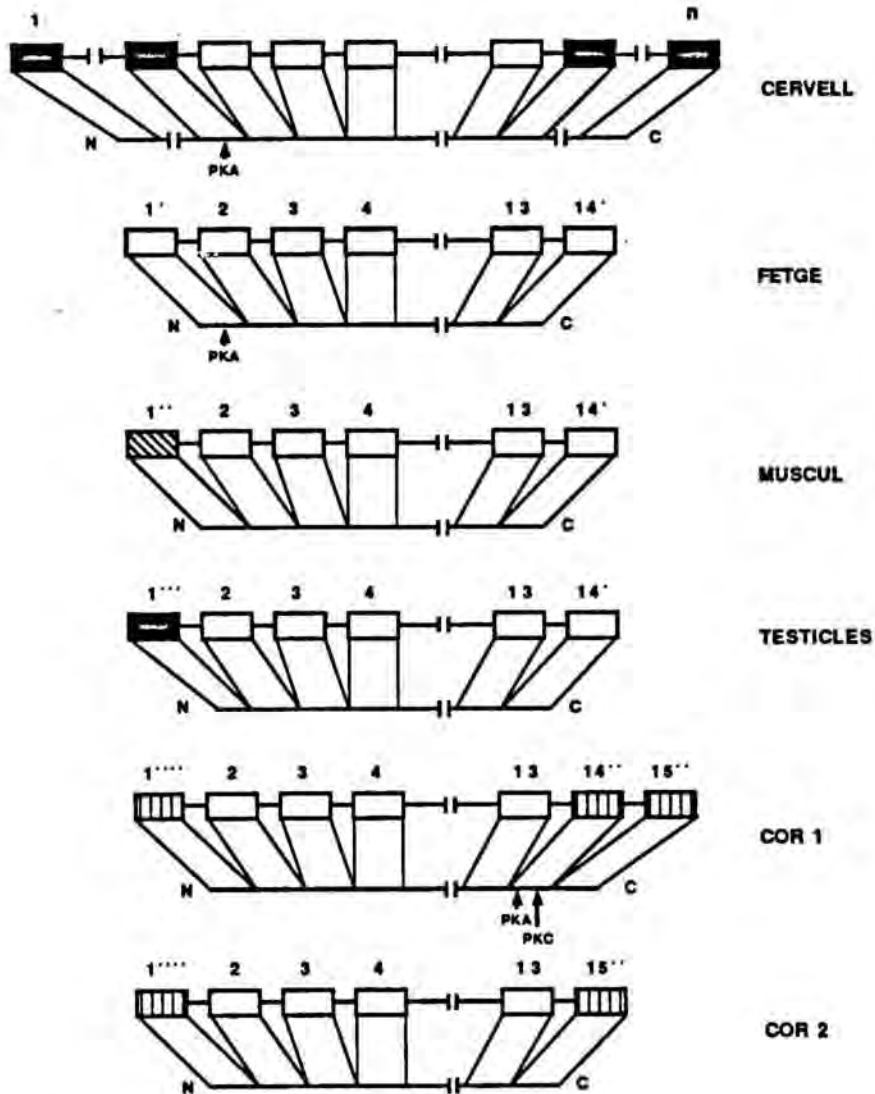


Figura 4.1.- Estructura dels gens de la PFK-2/FBPasa-2.

Modificada de Ventura *et al.* (1991b). A la Figura s'observa els exons expressats dels diferents gens de la PFK-2/FBPasa-2. En el cas de testicles aquests exons són hipotetitzats donat que no es disposa de la seqüència del gen. Els exons marcats com () són els corresponents als dominis catalítics i que presenten forta homologia entre tots ells. Les fletxes indiquen els punts de control per fosforil.lació.

La seqüenciació del clon parcial B82 indica que la PFK-2/FBPasa-2 cerebral està codificada per un gen diferent als descrits amb anterioritat i que s'expressa específicament a teixit nerviós. La seqüència aminoacídica de la proteïna codificada per aquest clon presenta, en els seus dominis catalítics, un 65-67 % d'identitat respecte als altres isoenzims de mamífer. Aquesta dada suggereix mecanismes catalítics similars per a tots ells. A més, indica un procés evolutiu comú per fusió gènica de un centre fosfotransferasa i un centre fosfohidrolasa ancestrals.

A partir d'aquesta estructura s'han afegit exons reguladors en posicions 5' i 3' respecte a aquest bloc bifuncional (Figura D.2). D'aquesta forma s'aconsegueixen regulacions de les dues activitats adjacents amb la funcionalitat requerida a cada tipus de teixit.

En el cas de l'isoenzim cerebral, el centre de fosforil·lació per PKA està situat molt probablement en posició amino-terminal respecte als centres catalítics. Aquesta fosforil·lació no produeix efectes sobre la cinètica de l'enzim. Una possible hipòtesi a desenvolupar seria que els amplis dominis extracatalítics d'aquest isoenzim de 120 kDa influïrien en la manca de transmissió de la modificació covalent als dominis catalítics. Una forma raonable de comprovar aquesta hipòtesi seria l'expressió de la proteïna codificada per el clon B82, truncada en els seus extrems amino i carboxi-terminals però que conté la diana de fosforil·lació per PKA, i observar la cinètica i els efectes de la fosforil·lació per PKA en l'activitat d'aquesta proteïna truncada. Altres estudis necessaris i evidents són el clonatge del cDNA complet de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral per poder caracteritzar els dominis terminals d'aquesta proteïna i que probablement tindran importància a nivell de regulació de les dues activitats. Igualment és necessària la caracterització i localització del gen que codifica per aquest isoenzim. Seria especialment interessant l'anàlisi de la seqüència promotora del mateix i la caracterització dels factors que regulen la seva expressió, bé siguin factors amb ubiqüitat, factors específics de teixit nerviós o bé repressors que impedeixen la seva expressió en altres teixits.

Conclusions

1.- La concentració de Fru 2,6-P₂ es manté constant, o fins i tot lleugerament augmentada, durant el primer minut d'isquèmia completa. Posteriorment els seus nivells cauen un 50%, en paral·lel amb les concentracions d'ATP i Fru 6-P. Les activitats PFK-2 i FBPasa-2 no es modifiquen al llarg del temps d'isquèmia, suggerint que en aquesta condició experimental els nivells de Fru 2,6-P₂ són controlats pels nivells dels substrats de la seva síntesi.

2.- Els nivells cerebrals de Fru 2,6-P₂ són molt menys sensibles a la hipoglucèmia experimental que els corresponents nivells de Fru 2,6-P₂ hepàtics. La concentració cerebral disminueix només quan la glucosa plasmàtica esdevé limitant per a la seva utilització per part del cervell i les concentracions d'intermediaris glucolítics i l'ATP disminueixen.

3.- La concentració de Fru 2,6-P₂ és similar en escorça, hipocamp, estriat i cerebel. Igualment, totes aquestes àrees mostren disminucions similars en els nivells de Fru 2,6-P₂ en un estat de coma hipoglucèmic, recuperant-se els nivells 30 minuts després de l'administració de glucosa. En canvi en situacions d'hipoglucèmia lleugera no es produeix variació en els seus nivells. En situació de coma hipoglucèmic l'activitat PFK-2 disminueix lleugerament recuperant-se també 30 minuts després de l'administració de glucosa mentre l'activitat FBPasa-2 no variava en cap situació.

4.- Les variacions en el nivells de Fru 2,6-P₂ correlacionen amb les modificacions del consum cerebral de glucosa quan es produeix metabolització de cossos cetònics. Les activitats PFK-2 i FBPasa-2 no es modifiquen durant la diabetis o el dejuni. S'observen disminucions de Fru 2,6-P₂ durant la diabetis però no al llarg d'un període de dejuni. Aquestes modificacions són proporcionals i oposades a les variacions del nivells de citrat, que augmenta notablement durant la diabetis i només ho fa molt lleugerament després de 5 dies de dejuni. Aquestes dades suggereixen que es produeix un efecte d'amplificació de l'inhibició del citrat sobre la PFK-1 per inducció en paral·lel de disminucions en els nivells de Fru 2,6-P₂.

5.- Els nivells de Fru 2,6-P₂ augmenten notablement just després del neixement per disminuir posteriorment fins a valors adults. L'activitat PFK-2 cerebral no presenta variacions notables durant el desenvolupament cerebral al contrari que l'activitat PFK-1 que s'indueix a partir de la segona setmana després del neixement. El perfil cromatogràfic i el marcatge amb (2-³²P) Fru 2,6-P₂ semblen indicar que l'isoenzim de la PFK-2/FBPasa-2 present a teixit de cervell embrionari i de neonat sembla ser similar al present en teixit cerebral adult.

6.- L'isoenzim de la PFK-2/FBPasa-2 cerebral correspon a un isoenzim específic d'aquest teixit i que no havia estat descrit fins el moment. L'estructura de l'enzim correspon a un homodímer de 120 kDa de pes molecular per subunitat. Aquest enzim és bifuncional i presenta unes activitats de 92 mU/mg de proteïna i 29 mU/mg de proteïna per a la quinasa i la bisfosfatasa respectivament.

7.- La PFK-2/FBPasa-2 cerebral és reconeguda per anticossos generats contra la forma hepàtica i forma un intermediari fosforil·lat a l'incubar amb (2-³²P) Fru 2,6-P₂ suggerint unes característiques estructurals i mecanístiques similars a les dels altres isoenzims prèviament descrits. En canvi la seqüenciació d'un fragment proteic mostrava diferències en almenys, certs dominis de l'enzim.

8.- La PFK-2/FBPasa-2 cerebral no és fosforil·lada per PKC mentre sí ho és per PKA en una proporció propera a un mol de fosfat/mol de subunitat. Això suggereix la presència d'un únic centre de fosforil·lació per PKA. La cinètica d'aquesta fosforil·lació és molt similar a l'obtinguda per a l'isoenzim hepàtic. Aquest fosforil·lació però, no indueix cap modificació de la V_{max} o la K_m de la PFK-2 o la FBPasa-2.

9.- La PFK-2/FBPasa-2 cerebral presenta unes característiques cinètiques i de regulació alostèrica que s'ajusten als nivells tissulars i característiques descrites en els models experimentals estudiats. La FBPasa-2 presenta una elevada K_m per a la Fru 2,6-P₂, de forma que en condicions fisiològiques la seva activitat és molt reduïda. La Fru 6-P regula els nivells de metabolit bisfosforil·lat donat que la PFK-2 presenta una K_m al voltant dels seus nivells fisiològics i inhibeix a la FBPasa-2. El citrat també presenta un efecte dual inhibint a la quinasa i activant a la bisfosfatasa.

10.- La PFK-2/FBPasa-2 cerebral és el producte de l'expressió d'un gen no descrit fins el moment que sembla expressar-se específicament a teixit nerviós. La seqüenciació d'un clon parcial de cDNA indica que la PFK-2/FBPasa-2 cerebral presenta una seqüència i estructura molt similar a la dels altres isoenzims (65-67% d'identitat d'aminoàcids). L'estructura bifuncional suggereix que aquest gen prové d'un procés de fusió gènica d'una fosfotransferasa i una fosfohidrolasa ancestrals.

11.- L'estructura de l'enzim és la de dos dominis catalítics units i que li confereixen la bifuncionalitat flanquejats per extensions amino i carboxi-terminals a les que es pot suggerir funcions de tipus regulador. En aquest sentit s'observa la presència de la diana de fosforil·lació per PKA situada en posició amino-terminal respecte als dominis catalítics.

Bibliografia

- Ackermann, J., Grove, T., Wong, G., Gadian, D. and Radda, G. (1980) "Mapping of metabolism in whole animals by ^{31}P -NMR using surface coils" *Nature* **283**, 167-170.
- Agardh, C.D., Chapman, A.G. and Siesjö, B.K. (1981) "Endogenous substrate utilized by rat brain in severe insulin-induced hypoglycemia" *J. Neurochem* **36**, 490-500.
- Ambrosio, S., Ventura, F., Rosa, J.L. and Bartrons, R. (1991) "Fructose 2,6-bisphosphate in hypoglycemic rat brain" *J. Neurochem* **57**, 200-203.
- Ambrosio, S., Ventura, F. and Bartrons, R. (1991) "Fructose 2,6-bisphosphate in developing rat brain" *Develop. Brain Res.* **66**, 274-276.
- Arizmendi, C. and Medina, J.M. (1983) "Lactate as an oxidizable substrate for rat brain *in vitro* during perinatal period" *Biochem. J.* **214**, 633-635.
- Arora, K.K. and Pedersen, P.L. (1988) "Functional significance of mitochondrial-bound hexokinase in tumor cell metabolism" *J. Biol. Chem.* **263**, 17422-17428.
- Auer, R.N., Olsson, Y. and Siesjö, B.K. (1984) "Hypoglycemic brain injury in the rat" *Diabetes* **33**, 1090-1098.
- Baulida, J., Onetti, R. and Bassols, A. (1992) "Effects of epidermal growth factor on glycolysis in A431 cells" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **183**, 1216-1223.
- Bazan, J.F., Fletterick, R.J. and Pilgis, S.J. (1989) "Evolution of a bifunctional enzyme: 6-phosphate,2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9642-9646.
- Beitner, R. (1985) "Glucose 1,6-bisphosphate- the regulator of carbohydrate metabolism" in *Regulation of carbohydrate metabolism*, 1-29, CRC Press, Boca Raton.
- Beitner, R. (1990) "Regulation of carbohydrate metabolism by glucose 1,6-bisphosphate in extrahepatic tissues; comparison with fructose 2,6-bisphosphate" *Int. J. Biochem.* **22**, 553-557.
- Beneviste, M., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N.H. (1984) "Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis" *J. Neurochem.* **43**, 1369-1374.
- Berne, R.M. and Levy, M.N. (1988) "The nervous system and its components" in "Physiology" Mosby Company, St. Louis, U.S.A. 69-76
- Bessman, S.P. and Geiger, P. J. (1980) "Compartmentation of hexokinase and creatine phosphokinase, cellular regulation and insulin action" in *Current Topics in Cellular Regulation* **16**, Academic Press, New York, 55-86.
- Betz, L. (1983) "Sodium transport in capillaries isolated from rat brain" *J. Neurochem.* **41**, 1150-1157.
- Betz, L. (1986) "Transport of ions across the blood-brain barrier" *Federation Proc.* **45**, 2050-2054.
- Betz, A.L. and Goldstein, G.W. (1986) "Specialized properties of solute transport in brain capillaries" *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 241-250.

- Betz, A.L. and Gilboe, D.D. (1974) "Kinetics of cerebral glucose transport in vivo: inhibition by 3-O-methylglucose" *Brain Res.* **65**, 368-372.
- Betz, A.L., Goldstein, G.W. and Katzman, R. "Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers" in "Basic neurochemistry" Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R.W. and Molinoff ed., Raven Press Ltd., New York, U.S.A.
- Boado, R.J. and Pardridge, W.M. (1990) "The brain-type glucose transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain barrier" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **166**, 174-179.
- Boscà, L., Rousseau, G and Hue, L. (1985) "Phorbol 12-myristate 13-acetate and insulin increase the concentration of fructose 2,6-bisphosphate and stimulate glycolysis in chicken embryo fibroblasts" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 6440-6444.
- Boscà, L., Mojena, M., Ghysdael, J., Rousseau, G.G. and Hue, L. (1986) "Expression of the v-src and v-fps oncogene increases fructose 2,6-bisphosphate in chick-embryo fibroblasts" *Biochem. J.* **236**, 595-599.
- Boscà, L., Mojena, M., Diaz-Guerra, M.J. and Marquez, C. (1988) "Phorbol 12,13-dibutyrate and mitogens increase fructose 2,6-bisphosphate in lymphocytes" *Eur. J. Biochem.* **175**, 317-323.
- Bradford, H.F. (1988) "Glial cells" in "Chemical Neurobiology. An introduction to Neurochemistry" Freeman and Company ed., New York, U.S.A., 59-112.
- Brightman, M.W. (1977) "Morfology of blood-brain interfaces" *Exp. Eye Res. (Suppl.)* **25**, 1-25.
- Brightman, M.W., Hori, M., Rapoport, S.I., Reese, T.S. and Westergaard, E. (1973) "Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium" *J. Comp. Neurol.* **128**, 317-326.
- Bryan, R.M., Keefer, K.A. and MacNeill, C. (1986) "Regional cerebral glucose utilization during insulin-induced hypoglycemia in unanesthetized rats" *J. Neurochem.* **46**, 1904-1911.
- Buchsbaum, M.S., Gillin, J.C., Wu, J., Hazlett, E., Sicotte, N., Dupont, R.M. and Bunney, W.E. (1989) "Regional cerebral glucose metabolic rate in human sleep assessed by positron emission tomography" *Life Sciences* **45**, 1349-1356.
- Bustos, R. and Sobrino, F. (1989) "Control of fructose 2,6-bisphosphate levels in rat macrophages by glucose and phorbol ester" *F.E.B.S. Lett.* **251**, 143-146.
- Calcutt, N.A., Tomlison, D.R. and Willars, G.B. (1988) "Ganglioside treatment of streptozotocin-diabetic rats prevents defective axonal transport of 6-phosphofructokinase activity" *J. Neurochem.* **50**, 1478-1483.
- Caldecott-Hazard, Mazziotta, S.J. and Phelps M. (1989) "Cerebral correlates of depressed behaviour in rats, visualized using ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography" *J. Neurosci.* **8**, 1951-1961.
- Cataldo, A.M. and Broadwell, R.D. (1986) "Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose 6-fosfatase activity under normal and experimental conditions:neurons and glia" *J. Electron Microsc. Tech* **3**, 413-417.

- Chapman, A.G., Westerberg, E. and Siesjö, B.K. (1981) "The metabolism of purine and pyrimidine nucleotides in rat cortex during insulin-induced hypoglycemia and recovery" *J. Neurochem.* **36**, 179-189.
- Christensen, H.N. (1973) "The development of amino acid transport system" *Fed. Proc.* **32**, 19-28.
- Cifuentes, M.E., Espinet, C., Lange, A.J., Pilkis, S.J. and Hod, Y. (1991) "Hormonal control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression in rat hepatoma cells" *J. Biol. Chem.* **266**, 1557-1563.
- Cohen, E. and Wurtzman, R.J. "Brain acetyl-choline synthesis: control by dietary choline" *Science* **191**, 561-562.
- Colosia, A.D., Lively, M., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1987) "Isolation of a cDNA clone for rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **143**, 1092-1098.
- Colosia, A.D., Marker, A.J., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R., Granner, D.K., Tauler, A. and Pilkis, S.J. (1988) "Induction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin" *J. Biol. Chem.* **263**, 18669-18677.
- Cornford, E.M., Braun, L.D. and Oldendorf, W.H. (1978) "Carrier mediated transport of choline and certain choline analogs" *J. Neurochem.* **30**, 299-308.
- Crane, P.D., Pardridge W.M., Braun, L.D. and Oldendorf, W.H. (1985) "Two-day starvation does not alter the kinetics of the blood-brain barrier transport and phosphorylation of glucose in rat brain" *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **5**, 40-46.
- Cremer, J.E. and Heath, D.F. (1974) "The estimation rates of utilization of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data" *Biochem. J.* **142**, 527-544.
- Cremer, J.E., Braun, L.D. and Oldendorf, W.H. (1976) "Changes during development in transport processes of the blood-brain barrier" *Biochem. Biophys. Acta* **448**, 633-637.
- Cremer, J.E., Cunningham, V.J., Pardridge, W.M., Braun, L.D. and Oldendorf, W.H. (1979) "Kinetics of the blood-brain barrier transport of pyruvate, lactate and glucose in suckling, weanling and adult rats" *J. Neurochem.* **33**, 439-445.
- Cremer, J.E., Ray, D.E., Sarna, G.S. and Cunningham, V.J. (1981) "A study of the kinetic behaviour of glucose based on simultaneous estimates of influx and phosphorylation of brain regions of rats in different physiological states" *Brain Res.* **221**, 331-342.
- Crepin, K.M., Darville, M.I., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1987) "Characterization of distinct mRNAs coding for putative isozymes of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Eur. J. Biochem.* **183**, 433-440.
- Crepin, K.M., Darville, M.I., Michel, A., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1989) "Cloning and expression in *Escherichia Coli* of a rat hepatoma cell cDNA coding for 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Biochem. J.* **264**, 151-160.
- Crone, C. (1965) "Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue" *J. Physiol. London* **181**, 103-113.

- Crone, C. (1978) "D-glucose fuel for the brain" *Trends in Neurosciences* Nov. 120-123.
- Crone, C. and Thompson, A.M. (1973) "Comparative studies of capillary permeability in brain and muscle" *Acta Physiol. Scand.* **87**, 252-260.
- Cummins, C.J., Lust, W.D. and Passonneau, J.V. (1983) "Regulation of glycogenolysis in transformed astrocytes *in vitro*" *J. Neurochem.* **40**, 128-137.
- Darville, M.I., Crepin, K.M., Vanderckhove, J., Van Damme, J., Octave, J.N., Rider, M.H., Marchand, M.J., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1987) "Complete nucleotide sequence coding for rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase derived from a cDNA clone" *F.E.B.S. Lett.* **224**, 317-321.
- Darville, M.I., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1989) "5' flanking sequence and structure of the gene encoding rat 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 6543-6547.
- Darville, M.I., Chickri, M., Lebeau, E., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1991) "A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *F.E.B.S. Lett.* **288**, 91-94.
- Denis-Pouxviel, C., Gautier, T., Daviaud, D. and Murat, J.C. (1990) "Phosphofructokinase 2 and glycolysis in HT29 human colon adenocarcinoma cell line" *Biochem. J.* **268**, 465-470.
- Denton, R.M. and Halestrap, A.P. (1979) "Regulation of pyruvate metabolism in mammalian tissues" in *Essays in Biochem* **15**, 37-77.
- Denton, R.M., Randle, P.J., Bridges, B.J., Cooper, R.H., Kerbey, A.L., Pask, H.T., Severson, D.L., Stansbie, D and Whitehouse, S. (1975) "Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase" *Mol. Cell. Biochem.* **9**, 27-53.
- Dienel, G.A., Nelson, T., Cruz, N.F., Jay, T., Crane, A.M. and Sokoloff, L. (1988) "Over-estimation of glucose 6-phosphatase activity in brain *in vivo*" *J. Biol. Chem.* **263**, 19697-19708.
- Drewes, L.R. and Gilboe, D.D. (1973) "Glycolysis and the permeation of glucose and lactate in the isolated perfused dog brain during anoxia and postanoxic recovery" *J. Biol. Chem.* **248**, 2489-2496.
- Dombrowski, G.J., Swiatek, K.R. and Chao, K.L. (1989) "Lactate, 3-hydroxybutyrate and glucose as substrates for early postnatal rat brain" *Neurochem. Res.*, **14**, 667-675.
- Duckrow, R.B. and Bryan, R.M. (1987) "Regional cerebral glucose utilization during hypoglycemia" *J. Neurochem.* **48**, 989-993.
- Duckrow, R.B. (1988) "Regional cerebral blood flow and glucose utilization during hyperinsulinemia" *Brain Res.* **462**, 363-366.
- Duckrow, R.B. (1988) "Glucose transfer into rat brain during acute and chronic hyperglycemia" *Metabolic Brain Disease* **3**, 201-209.
- Dunaway, G.A. (1983) "A review of animal phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role" *Mol. Cell. Biochem.* **52**, 75-91.

- Dunaway, G.A. and Kasten, T.P. (1985) "Nature of the rat brain phosphofructokinase isozymes" *J. Biol. Chem.* **260**, 4180-4185.
- Dunaway, G.A., Kasten, T.P., Sebo, T. and Trapp, R. (1988) "Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues" *Biochem. J.* **251**, 677-683.
- El-Maghrabi, M.R., Haston, W.S., Flockhart, D.A., Claus, T.H. and Pilkis, S.J. (1980) "Studies on the phosphorylation and dephosphorylation of L-type pyruvate kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase" *J. Biol. Chem.* **255**, 668-675.
- El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J. and Pilkis, S.J. (1981) "Partial purification of a rat liver enzyme that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **101**, 1071-1077.
- El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J., Fox, E. and Pilkis, S.J. (1982) "Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **257**, 7603-7607.
- El-Maghrabi, M.R., Fox, E., Pilkis, J. and Pilkis, S.J. (1982b) "Cyclic-AMP dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **106**, 794-802.
- El-Maghrabi, M.R., Pate, T.M., Murray, J. and Pilkis, S.J. (1984) "Differential effects of proteolysis and protein modification on the activities of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **259**, 13096-13103.
- El-Maghrabi, M.R., Correia, J.J., Heil, P.J., Pate, T.M., Cobb, C.E. and Pilkis, S.J. (1986) "Tissue distribution, immunoreactivity and physical properties of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5005-5009.
- El-Maghrabi, M.R., Pate, T.M., D'Angelo, G., Correia, J.J., Lively, M.O. and Pilkis, S.J. (1987) "Identification of critical sulhydryl residues in the primary sequence of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **262**, 11714-11720.
- Espinet, C., Bartrons, R. and Carreras, J. (1986) "Fructose 2,6-bisphosphate and glucose 1,6-bisphosphate in erythrocytes during chicken development" *F.E.B.S. Lett.* **209**, 254-256.
- Farfarano, M., Vasta, V., Bruni, P. and D'Alessandro, M. (1984) "The effect of insulin on fructose 2,6-bisphosphate levels in human fibroblasts" *F.E.B.S. Lett.* **171**, 117-120.
- Fernandez, E. and Medina, J.M. (1986) "Lactate utilization by the neonatal brain *in vitro*" *Biochem. J.* **234**, 489-492.
- Foe, L.G. and Kemp, R.G. (1984) "Isoenzyme composition and phosphorylation of brain phosphofructokinase" *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 503-511.
- Foe, L.G. and Kemp, R.G. (1985) "Isolation and characterization of phosphofructokinase C from rabbit brain" *J. Biol. Chem.* **260**, 726-730.
- Fox, P. and Raichle, M. (1986) "Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1140-1144.

- Fox, P., Raichle, M., Mintum, M. and Dece, C. (1988) "Non oxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity" *Science* **241**, 462-464.
- French, T.J., Holness, M.J., MacLennan, P.A. and Sudgen, M.C. (1988) "Effects of nutritional status and acute variation of substrate supply on cardiac and skeletal muscle fructose 2,6-bisphosphate concentrations" *Biochem. J.* **250**, 773-779.
- Fujikawa, D.G., Dwyer, B.E., Lake, R.R. and Westerlain, C.G. (1989) "Local cerebral glucose utilization during status epilepticus in newborn primates" *Am. J. Physiol.* **256**, 1160-1167.
- Furuya, E. and Uyeda, K. (1981) "A novel enzyme catalyzes the synthesis of activation factor from ATP and fructose 6-P" *J. Biol. Chem.* **256**, 7109-7112.
- Furuya, E., Yokoyama, M. and Uyeda, K. (1982) "Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase by phosphorylation and dephosphorylation: possible mechanism for coordinated control of glycolysis and glycogenolysis" *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **79**, 325-329.
- Gallego, C. and Carreras, J. (1989) "Fructose 2,6-bisphosphate and glucose 1,6-bisphosphate levels in erythrocytes with high and low 2,3-bisphosphoglycerate content during postnatal development" *F.E.B.S. Lett.* **251**, 74-78.
- Gerhart, D.Z., LeVasseur, R.J., Broderius, M.A. and Drewes, L.R. (1989) "Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry" *J. Neurosci. Res.* **22**, 464-472.
- Ghajar, J.B.G., Plum, F. and Duffy, T.E. (1982) "Cerebral oxidative metabolism and blood flow during acute hypoglycemia and recovery in unanesthetized rats" *J. Neurochem.* **38**, 397-404.
- Gil, J., Carreras, J. and Bartrons, R. (1986) "Effects of diabetes on fructose 2,6-P₂, glucose 1,6-P₂ and 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **136**, 498-503.
- Gil, J., Miralpeix, M., Carreras, J. and Bartrons, R. (1988) "Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-bisphosphate levels in the liver of diabetic rats" *J. Biol. Chem.* **263**, 1868-1871.
- Gjedde, A. and Crone, C. (1975) "Induction processes in blood-brain barrier transfer of ketone-bodies during starvation" *Am. J. Physiol.* **229**, 1165-1169.
- Goldberg, N.D. and O'Toole, A. (1969) "The properties of glycogen synthetase and regulation of glycogen biosynthesis in rat brain" *J. Biol. Chem.* **244**, 3053-3061.
- Gorell, J.M., Law, M.M., Lowry, O.H. and Ferrendelli, J.A. (1977) "Levels of cerebral cortical glycolytic and citric acid cycle metabolites during hypoglycemic stupor and its reversal" *J. Neurochem.* **29**, 187-191.
- Gould, G.W. and Bell, G.I. (1990) "Facilitative glucose transporters: an expanding family" *T.I.B.S.* **15**, 18-23.
- Guha, S.K. and Rose, Z.B. (1982) "Brain glucose 1,6-bisphosphatase requires inosine monophosphate" *J. Biol. Chem.* **257**, 6634-6637.
- Hara, M., Matsuda, Y., Hirai, K., Okumura, N. and Nakagawa, H. (1989) "Characteristics of glucose transport in neuronal cells and astrocytes from rat brain in primary culture" *J. Neurochem.* **52**, 902-908.

- Hawkins, R.A., Mans, A.M. and Davis, D.W. (1986) "Regional ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes" *Am. J. Physiol.* **250**, 169-178.
- Hilliker, C.E., Darville, M.I., Aly, M.S., Chickri, M., Szpirer, C., Marynen, P., Rousseau, G.G. and Cassiman, J.J. (1991) "Human and rat chromosomal localization of two genes for 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase by analysis of somatic cell hybrids and *in situ* hybridization" *Genomics* **10**, 867-873.
- Hofer, H.W., Schlatter, S. and Grafe, M. (1985) "Phosphorylation of phosphofructokinase by PKC changes the allosteric properties of the enzyme" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **129**, 892-897.
- Hubel, D.H. (1986) "El cerebro" en *El Cerebro*, 4a ed., Scientific American, New York, 1-24.
- Hue, L. (1981) "The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in liver" *Adv. Enzymol.* **52**, 247-331.
- Hue, L., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1981) "Fructose 2,6-bisphosphate: hormonal regulation and mechanism of its formation in liver" *J. Biol. Chem.* **256**, 8900-8903.
- Hue, L. (1982) "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the stimulation of glycolysis by anoxia in isolated hepatocytes" *Biochem. J.* **206**, 359-365.
- Hue, L. and Bartrons (1984) "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control by glucagon of gluconeogenesis from various precursors in isolated rat hepatocytes" *Biochem. J.* **218**, 165-170.
- Hue, L. and Bartrons, R. (1985) "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in liver, muscle and adipose tissue" in *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Beitner, R. ed.) Vol 1, 29-44, CRC Press, Boca Raton.
- Hue, L. and Rider, M. (1987) "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues" *Biochem. J.* **245**, 313-324.
- Hue, L., Rider, M.H. and Rousseau, G.G. (1990) "Fructose 2,6-bisphosphate in extra-hepatic tissues" in *Fructose 2,6-bisphosphate*, S.J. Pilkis ed., CRC Press, Boca Raton, 173-192.
- Ibrahim, M.Z.M. (1975) "Glycogen and its related enzymes of metabolism in the central nervous system" *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **52**, 1-85.
- Ishikawa, E., Ogushi, S., Ishikawa, T. and Uyeda, K. (1990) "Activation of mammalian phosphofructokinases by ribose 1,5-bisphosphate" *J. Biol. Chem.* **265**, 18875-18878.
- Itoh, T. and Quastel, J.H. (1970) "Acetoacetate metabolism in infant and adult rat brain *in vitro*" *Biochem. J.* **116**, 641-645.
- Jakobsen, J., Nedergaard, M., Aarslew-Jensen, M. and Diemer, N.H. (1990) "Regional brain glucose metabolism and blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats" *Diabetes* **39**, 437-440.
- Justice, A., Feldman, S.M. and Brown, L.L. (1989) "The nucleus coeruleus modulates local cerebral glucose utilization during noise stress in rats" *Brain Res.* **490**, 73-84.

- Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991) "Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases" *J. Biol. Chem.* **266**, 15555-15558.
- Kiessling, M., Xie, Y. and Kleihues, P. (1984) "Regionally selective inhibition of cerebral protein synthesis in the rat brain during hypoglycemia and recovery" *J. Neurochem.* **43**, 1507-1514.
- Kintner, D., Costello, D.J., Levin, A.B. and Gilboe, D.D. (1980) "Brain metabolism after 30 minutes of hypoxic or anoxic perfusion or ischemia" *Am. J. Physiol.* **239**, 501-509.
- Kitamura, K. and Uyeda, K. (1988) "Purification and characterization of myocardial 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **263**, 9027-9033.
- Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H. and Uyeda, K. (1988) "Phosphorylation of myocardial 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C" *J. Biol. Chem.* **263**, 16796-16801.
- Kitamura, K., Uyeda, K., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1989) "Purification and characterization of rat skeletal muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **264**, 9799-9806.
- Knull, H.R., Taylor, W.F. and Wells, W.W. (1973) "Effects of energy metabolism on *in vivo* distribution of hexokinase in brain" *J. Biol. Chem.* **248**, 5414-5417.
- Krebs, H.A. (1967) "Rate control of the tricarboxylic acid cycle" in *Advances in Enzyme Regulation* **8**, 335-353.
- Krebs, H.A. and Kornberg, H.L. (1957) "Energy transformation in living matter" Springer Verlag, Berlin.
- Kretsmer, M. and Fraenkel, D.G. (1991) "Yeast 6-phosphofructo-2-kinase: sequence and mutant" *Biochemistry* **30**, 10663-10672.
- Kummel, L. and Pilkis, S.J. (1990) "Multihormonal regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression in primary cultures of rat hepatocytes" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **169**, 406-413.
- Kuwajima, M. and Uyeda, K. (1982) "The tissue distribution of fructose 2,6-bisphosphate and fructose-6-phosphate,2-kinase in rats and the effect of starvation, diabetes and hypoglycemia on hepatic fructose 2,6-bisphosphate and fructose-6-phosphate,2-kinase" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **104**, 84-88.
- Lajtha, A.L., Maker, H.S. and Clarke, D.D. (1979) "Metabolism and transport of carbohydrates and amino acids" in *Basic Neurochemistry*, Siebert ed., 329-353.
- Laloux, M., Van Schaftingen, E., François, J. and Hers, H.G. (1985) "Phosphate dependency of phosphofructokinase 2" *Eur. J. Biochem.* **148**, 155-159.
- Lange, A.J., Kummel, L., El-Maghrabi, M.R., Tauler, A., Colosia, A., Marker, A. and Pilkis, S.J. (1989) "Sequence of 5'-flanking region of the rat 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene: regulation by glucocorticoids" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **162**, 753-760.

- Lange, A.J., El-Maghrabi, R.M. and Pilkis, S.J. (1991) "Isolation of bovine liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase cDNA: bovine liver and heart forms of the enzyme are separate gene products" *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 258-263.
- Lange, A.J., Espinet, C., Hall, R., El-Maghrabi, M.R., Vargas, A.M., Miksicek, R.J., Granner, D.K. and Pilkis, S.J. (1992) "Regulation of gene expression of rat skeletal muscle/liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **267**, 15673-15680.
- Lear, J.L. (1990) "Glycolysis: link between PET and proton MR spectroscopic studies of the brain" *Radiology* **174**, 328-330.
- LeFevre, P.G. and Peters, A.A. (1966) "Evidence of mediated transfer of monosaccharides from blood to brain in rodents" *J. Neurochem.* **13**, 35-46.
- Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M. and Rousseau, G.G. (1990) "Identification of regulatory sequences and protein-binding sites in the liver-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1099-1106.
- Leong, S.F. and Clark, J.B. (1984a) "Regional enzyme development in rat brain" *Biochem. J.* **218**, 131-138.
- Leong, S.F. and Clark, J.B. (1984b) "Regional enzyme development in rat brain" *Biochem. J.* **218**, 139-145.
- Lewis, L.D., Ljunggren, B., Norberg, K. and Siesjö B.K. (1974) "Changes in carbohydrate substrates, amino acids and ammonia in the brain during insulin-induced hypoglycemia" *J. Neurochem.* **23**, 659-671.
- Li, L., Lin, K., Correia, J.J. and Pilkis, S.J. (1992) "Lysine 356 is a critical residue for binding the C-6 group of fructose 2,6-bisphosphate to the fructose 2,6-bisphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **267**, 16669-16675.
- Lin, K., Li, L., Correia, J.J. and Pilkis, S.J. (1992) "Glu³²⁷ is part of a catalytic triad in rat liver fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **267**, 6556-6562.
- Lively, M.O., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., D'Angelo, G., Colosia, A.D., Cravola, J., Fraser, B.A. and Pilkis, S.J. (1988) "Complete aminoacid sequence of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **263**, 839-849.
- Ljunggren, B., Norberg, K. and Siesjö, B.K. (1974) "Influence of acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia" *Brain Res.* **77**, 173-186.
- Loiseau, A.M., Rider, M.H., Foret, D., Rousseau, G.G. and Hue, L. (1988) "Rat hepatoma (HTC) cell 6-phosphofructo 2-kinase differs from that in liver and can be separated from fructose 2,6-bisphosphatase" *Eur. J. Biochem.* **175**, 27-32.
- Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. (1964) "The relationship between substrates and enzymes of glycolysis in brain" *J. Biol. Chem.* **239**, 31-42.
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X. and Schulz, D.W. (1964) "Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain" *J. Biol. Chem.* **239**, 18-30.

- Lund-Andersen, H. (1979) "Transport of glucose from blood to brain" *Physiol. Rev.* **59**, 305-352.
- Lund-Andersen, H. and Kjeldsen, C.S. (1977) "Uptake of glucose analogues by rat brain cortex slices: membrane transport versus metabolism of 2-deoxy-glucose" *J. Neurochem.* **29**, 205-211.
- Magistretti, P.J. (1988) "Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters on the central nervous system" *Diabetes and Metabolisme* **14**, 237-246.
- Mans, A.M., DeJoseph, M.R., Davis, D.W. and Hawkins, R.A. (1988) "Brain energy metabolism in streptozotocin-diabetic rats" *Biochem. J.* **249**, 57-62.
- Marchand, M.J., Maisin, L., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1992) "Activation of 6-phosphofructo-2-kinase by pp60v-src is an indirect effect" *Biochem. J.* **285**, 413-417.
- Marie, J., Kahn, A. and Boivin, P. (1976) "Pyruvate kinase isozymes in man" *Hum. Genet.* **31**, 35-45.
- Marker, A.J., Colosia, A.D., Tauler, A., Solomon, D.H., Cayre, Y., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1989) "Glucocorticoid regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression" *J. Biol. Chem.* **264**, 7000-7004.
- Martin-Sanz, P., Cascales, M. and Boscà, L. (1987) "Fructose 2,6-bisphosphate in isolated foetal hepatocytes" *F.E.B.S. Lett.* **225**, 37-42.
- Martin-Sanz, P., Cascales, M. and Boscà, L. (1992) "Characterization of 6-phosphofructo 2-kinase from foetal-rat liver" *Biochem. J.* **281**, 457-463.
- McCall, A.L., Millington, W.R. and Wurtman R.J. (1982) "Metabolic fuel and aminoacid transport into the brain in experimental diabetes mellitus" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5406-5410.
- McDonald, F.D., Chou, Q. and Buchanan, B.B. (1987) "Ion-exchange chromatography separates activities synthesizing and degrading fructose 2,6-bisphosphate from C₃ and C₄ leaves but not from rat liver" *Plant Physiol.* **85**, 13-20.
- McIlwain, H. and Bachelard, H.S. (1985) "Biochemistry and the Central Nervius System" Baltimore: Williams and Wilkins, 1-170.
- Meyer, F.B. (1989) "Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury" *Brain Res. Rev.* **14**, 227-243.
- Miller, A.L., Hawkins, R.A. and Veech, R.L. (1973) "The mitochondrial redox state of brain" *J. Neurochem.* **20**, 1393-1400.
- Minatogawa, Y. and Hue, L. (1984) "Fructose 2,6-bisphosphate in rat skeletal muscle" *Biochem. J.* **223**, 73-78.
- Miralpeix, M., Carballo, E., Bartrons, R., Crepin, K., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1992) "Oral administration of vanadate to diabetic rats restores liver 6-phosphofructo-2-kinase content and mRNA" *Diabetologia* **35**, 243-248.
- Mojena, M., Boscà, L. and Hue, L. (1985) "Effect of glutamine on fructose 2,6-bisphosphate and on glucose metabolism in HeLa cells and in chicken-embryo fibroblasts" *Biochem. J.* **232**, 521-527.

- Muir, A.R. and Peters, A. (1962) "Quintuple layered membrane junctions at terminal bars between endothelial cells" *J. Cell. Biol.* **12**, 443-447.
- Nagamatsu, S., Kornhauser, J.H., Burant, C.F., Seino, S., Mayo, K.E. and Bell, G.I. (1992) "Glucose transporter expression in brain" *J. Biol. Chem.* **267**, 467-472.
- Nahas, N. and Abdul-Ghani, A.S. (1989) "Species-directed variation and non uniform distribution of glycogen in mammalian brains during starvation, diabetes and anesthesia" *Neurochem. Int.* **14**, 19-24.
- Nelson, S.R., Schulz, D.W., Passonneau, J.V. and Lowry, O.H. (1968) "Control of glycogen levels in brain" *J. Neurochem.* **15**, 1271-1279.
- Newgard, C.B., Hwang, P.K. and Fletterick, R.J. (1989) "The family of glycogen phosphorylases: structure and function" in *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 69-99.
- Newsholme, E.A., Sudgen, P.H. and Williams, T. (1977) "Effect of citrate on the activities of 6-phosphofructokinase from nervous and muscle tissues from different animals and its relationship to the regulation of glycolysis" *Biochem. J.* **166**, 123-129.
- Norberg, K. and Siesjö, B.K. (1976) "Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia" *J. Neurochem.* **26**, 345-352.
- Obrenovitch, T.P., Bordi, L., Garofalo, O., Ono, M., Nomma, F., Bachelard, H.S. and Symon, L. (1988) "In situ freezing of the brain for metabolic studies" *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **8**, 742-749.
- Oldendorf, W.H. (1971) "Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines and hexoses after arterial injection" *Am. J. Physiol.* **221**, 1629-1639.
- Oldendorf, W.H. and Szabo, J. (1976) "Amino acid assignment to one of the three blood-brain barrier amino acid carriers" *Am. J. Physiol.* **230**, 94-98.
- Oldendorf, W.H. (1977) "The blood-brain barrier" *Exp. Eye Res. (Suppl.)* **25**, 177-190.
- Ouchi, M., Dohmoto, C., Kamikashi, T., Murakami, K. and Ishibashi, S. (1975) "Mitochondrial and cytosolic hexokinases in rat brain, with special reference to the change in experimental diabetes" *Brain Res.* **98**, 410-414.
- Owen, O.E., Morgan, A.P., Kemp, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G. and Cahill, G.F. (1967) "Brain metabolism during fasting" *J. Clin. Invest.* **46**, 1589-1595.
- Pardridge, W.M. (1983) "Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier" *Physiol. Rev.* **63**, 1481-1535.
- Pardridge, W.M., Cornford, E.M., Braun, L.D. and Oldendorf, W.H. (1975) "Transport of choline and choline analogues through the blood-brain barrier" Barbeau, A., Growdon, J.H. and Wurtzman, R.J. eds., *Nutrition and the brain* vol **5**, 25-34.
- Pardridge, W.M. and Oldendorf, W.H. (1975) "Kinetics of blood-brain barrier transport of hexoses" *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 377-392.
- Pardridge, W.M. and Oldendorf, W.H. (1977) "Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier" *J. Neurochem.* **28**, 5-12.

- Pardridge, W.M., Triguero, D. and Farrell C.R. (1990) "Downregulation of blood-brain barrier glucose transporter in experimental diabetes" *Diabetes* **39**, 1040-1044.
- Parry, D.M. and Pedersen, P.L. (1990) "Glucose catabolism in brain" *J. Biol. Chem.* **265**, 1059-1066.
- Passonneau, J.V. and Lowry, O.H. (1963) "P-fructokinase and the control of the citric acid cycle" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 372-379.
- Passonneau, J.V., Lowry, O.H. Schulz, D.W. and Brown, J.G. (1969) "Glucose 1,6-bisphosphate formation by phosphoglucomutase in mammalian tissues" *J. Biol. Chem.* **244**, 902-909.
- Patel, M.S. (1979) "Influence of neonatal hypothyroidism on the development of the ketone body-metabolizing enzymes in rat brain" *Biochem. J.* **184**, 169-172.
- Pauwels, P.J. and Trouet, A. (1984) "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of glycolysis in various types of cultivated brain cells" *Neurosci. Lett.* **46**, 173-177.
- Pelligrino, D., Almquist, L.O. and Siesjö, B.K. (1981) "Effects of insulin-induced hypoglycemia on intracellular pH and impedance in the cerebral cortex of the rat" *Brain Res.* **221**, 129-147.
- Pelligrino, D.A., Lipa, M.D. and Albrecht, R.F. (1990) "Regional blood-brain glucose transfer and glucose utilization in chronically hyperglycemic, diabetic rats following acute glycemic normalization" *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 774-780.
- Phelps, C.H. (1975) "An ultrastructural study of methionine sulphoximina-induced glycogen accumulation in astrocytes of the mouse cerebral cortex" *J. Neurocytol.* **4**, 479-490.
- Phelps, M.E., Huang, S.C., Hoffman, E.J., Selin, L., Sokoloff, L. and Kuhl, D.E. (1979) "Tomographic measurement of local cerebral metabolic rate in humans with (F-18) 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method" *Ann. Neurol.* **6**, 371-388.
- Pilkis, S.J., Chrisman, T.D., El-Maghrabi, M.R., Colosia, A., Fox, E., Pilkis, J. and Claus, T. (1983) "The action of insulin on hepatic fructose 2,6-bisphosphate metabolism" *J. Biol. Chem.* **258**, 1495-1503.
- Pilkis, S.J., Lively, M.O. and El-Maghrabi, M.R. (1987) "Active site sequence of hepatic fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **262**, 12672-12675.
- Pilkis, S.J. and El-Maghrabi, M.R. (1988) "Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis" *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 755-783.
- Pilkis, S.J. and Claus, T.H. (1991) "Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes" *Ann. Rev. Nutr.* **11**, 465-515.
- Pulsinelli, W.A. (1985) "Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics" in *Progress in Brain Research* **63**, Elsevier Ed., Amsterdam pp 29-38.
- Redies, C., Hoffer, L.J., Beil, C., Marliss E.B., Evans, A.C., Lariviere, F., Marrett, S., Meyer, E., Diksic, M., Gjedde, A. and Hakim, A.M. (1989) "Generalized decrease in brain glucose metabolism during fasting in humans studied by PET" *Am. J. Physiol.* **256**, 805-810.

- Reese, T.S. and Karnovsky, M.J. (1967) "Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase" *J. Cell Biol.* **34**, 207-217.
- Reivich, J. and Alavi, R. (1983) "PET studies of local cerebral glucose metabolism in humans in physiological and pathophysiological conditions" *Adv. Metab. Disord.* **10**, 135-176.
- Rider, M.H., Foret, D. and Hue, L. (1985) "Comparison of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo-2-kinase" *Biochem. J.* **231**, 193-196.
- Rider, M.H. and Hue, L. (1986) "Phosphorylation of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase C and comparison of the fructose 2,6-bisphosphatase activity of the two enzymes" *Biochem. J.* **240**, 57-61.
- Rider, M.H., Vandamme, J., Lebeau, E., Vertommen, D., Vidal, H., Rousseau, G.G., Vandekerckove, J. and Hue, L. (1992) "The two forms of bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase result from alternative splicing" *Biochem. J.* **285**, 405-411.
- Rosa, J.L., Ventura, F., Carreras, J. and Bartrons, R. (1990) "Fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase during liver regeneration" *Biochem. J.* **270**, 645-649.
- Rosa, J.L., Tauler, A., Lange, A., Pilkis, S.J. and Bartrons, R. (1992) "Transcriptional and posttranscriptional regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase during liver regeneration" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3746-3750.
- Rose, I.A., Warms, J.V.B. and Kosow (1975) "Specificity for the glucose 6-phosphate inhibition site of hexokinase" *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 729-735.
- Ruderman, N. B., Ross, P.S., Berger, M. and Goodman, M.N. (1974) "Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats" *Biochem. J.* **138**, 1-10.
- Sakakibara, R., Kitajima, S. and Uyeda, K. (1984) "Limited proteolysis and photoaffinity labeling with 8-azido-ATP of fructose-6-phosphate 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **259**, 8366-8371.
- Sakata, J. and Uyeda, K. (1990) "Bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4951-4955.
- Sakata, J. and Uyeda, K. (1991) "Characterization of two isozymic forms of heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**, 470-474.
- Sakata, J., Abe, Y. and Uyeda, K. (1991) "Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **266**, 15764-15770.
- Sanger, F., Miklen, S. and Coulson, A.R. (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Schubert, C., Goltzsch, W. and Hoffman, E. (1983) "Perinatal changes of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **113**, 672-677.

Schwartz, J.H. (1991) "The cytology of neurons" in Principles of Neural Science, 3th ed., Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M. ed., Elsevier, New York.

Sener, A., Van Schaftingen, E., Van den Winkel, Pipeleers, D.G., Malisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. and Hers, H.G. (1984) "Effects of glucose and glucagon on the fructose 2,6-bisphosphate content of pancreatic islets and purified pancreatic B-cells" *Biochem. J.* **221**, 759-764.

Siebert, G., Gessner, B. and Klasser, M. (1986) "Energy supply of the central nervous system" *Bibliothca. Nutr. Dieta* **38**, 1-26.

Siesjö, B.K., Folbergrová, J. and MacMillan, V. (1972) "The effect of hypercapnia upon intracellular pH in the brain, evaluated by the bicarbonate-carbonic acid method and from creatine phosphokinase equilibrium" *J. Neurochem.* **19**, 2483-2495.

Siesjö, B.K. (1981) "Cell damage in the brain: a speculative synthesis" *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**, 155-185.

Siesjö, B.K. and Agardh, C.D. (1982) "Hypoglycemia" in *Handbook of Neurochemistry*, 353-379.

Siesjö, B.K. (1988) "Hypoglycemia, brain metabolism and brain damage" *Diabetes/Metabolism Rev.* **4**, 113-144.

Simon, R.P., Swan, J.M., Griffith, T. and Meldrum, B.S. (1984) "Blockade of NMDA receptors may protect against ischemic damage in the brain" *Science* **226**, 850-852.

Sivitz, W.I., DeSautel, S.L., Kayano, T., Bell, G.I. and Pessin, J.E. (1989) "Regulation of glucose transporter mRNA in insulin-deficient states" *Nature* **340**, 72-74.

Sivitz, W.I., DeSautel, S.L., Walker, P.S. and Pessin, J.E. (1989) "Regulation of glucose transporter in developing rat brain" *Endocrinology*, **124**, 1875-1880.

Sobrino, F. and Gualberto, A. (1985) "Hormonal regulation of fructose 2,6-bisphosphate levels in epididymal adipose tissue of rat" *F.E.B.S. Lett.* **182**, 327-330.

Sobrino, F., Rider, M.H., Gualberto, A. and Hue, L. (1987) "Fructose 2,6-bisphosphate in rat erythrocytes" *Biochem. J.* **244**, 235-238.

Sokoloff, L. (1973) "Metabolism of ketone bodies by the brain" *Ann. Rev. Medicin.*, 271-280.

Sokoloff, L. (1977) "Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system" *J. Neurochem.* **29**, 13-26.

Sokoloff, L. (1989) "Circulation and energy metabolism of the brain" *Basic Neurochemistry* 4th Ed., Siegel G.J. ed., Raven Press, New York, 565-590.

Sols, A. (1981) "Multimodulation of enzyme activity" in *Current Topics in Cellular Regulation* **19**, 77-101.

Staal, G.E.J., Kalff, A., Heesbeen, E.C., vanVeelen, C.W.M. and Rijksen, G. (1987) "Subunit composition, regulatory properties and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas" *Cancer Res.* **47**, 5047-5051.

- Stewart, M.B., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1985) "Evidence for a phosphoenzyme intermediate in the reaction pathway of rat hepatic fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* **260**, 12935-12941.
- Stumpf, B. and Kraus, H. (1979) "Regulatory aspects of glucose and ketone body metabolism in infant rat brain" *Pediatr. Res.* **13**, 585-590.
- Taniyama, M., Kitamura, K., Thomas, H., Lawson, J.W.R. and Uyeda, K. (1988) "Isoenzymes of fructose 6-phosphate,2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase in rat and bovine heart, liver and skeletal muscle" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **157**, 949-954.
- Tauler, A., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1987) "Functional homology of 6-phosphofructo-2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase, phosphoglycerate mutase, and 2,3-bisphosphoglycerate mutase" *J. Biol. Chem.* **262**, 16808-16815.
- Tauler, A., Lin, K. and Pilkis, S.J. (1990) "Hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: use of site-directed mutagenesis to evaluate the roles of His-258 and His-392 in catalysis" *J. Biol. Chem.* **265**, 15617-15622.
- Taylor, D.J., Evanson, J.M. and Wooley, D.E. (1990) "Contrasting effects of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on cytokine and phorbol ester stimulation of fructose 2,6-bisphosphate and prostaglandin E production by fibroblasts in vivo" *Biochem. J.* **269**, 573-577.
- Tews, J.K., Carter, S.H. and Stone, W.E. (1965) "Chemical changes in the brain during insulin hypoglycemia and recovery" *J. Neurochem.* **12**, 679-693.
- Thurston, J.H., Haubert, R.E., Jones, E.M. and Ater, J.L. (1974) "Effects of alloxan diabetes, anti-insulin serum diabetes, and non-diabetic dehydration on brain carbohydrate and energy metabolism in young mice" *J. Biol. Chem.* **250**, 1751-1758.
- Tsacopoulos, M., Evequoz-Mercier, V., Perrottet, P. and Buchner E. (1988) "Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8727-8731.
- Van Schaftingen, E., Hue, L. and Hers, H.G. (1980) "Fructose 2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of PFK" *Biochem. J.* **192**, 897-901.
- Van Schaftingen, E., Davies, D.R. and Hers, H.G. (1981) "Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic-AMP-dependent protein kinase" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **103**, 362-368.
- Van Schaftingen, E., Davies, D.R. and Hers, H.G. (1982) "Fructose 2,6-bisphosphatase from rat liver" *Eur. J. Biochem.* **124**, 143-149.
- Van Schaftingen, E., Bartrons, R. and Hers, H.G. (1984) "The mechanism by which ethanol decreases the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in the liver" *Biochem. J.* **222**, 511-518.
- Van Schaftingen, E. and Hers, H.G. (1986) "Purification and properties of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from chicken liver and pigeon muscle" *Eur. J. Biochem.* **159**, 359-365.
- Van Schaftingen, E. (1987) "Fructose 2,6-bisphosphate" *Adv. Enzymology* **59**, 315-395.

- Van Schaftingen, E., Opperdoes, F.R. and Hers, H.G. (1987) "Effects of various metabolic conditions and of trivalent arsenical melarsen oxide on the intracellular levels of fructose 2,6-bisphosphate and of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*" Eur. J. Biochem. **166**, 653-658.
- Veech, R.L., Harris, H.L., Veloso, D. and Veech, E.H. (1973) "Freeze-blowing: a new technique for the study of the brain *in vivo*" J. Neurochem. **20**, 183-188.
- Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Gil, J. and Bartrons, R. (1991) "6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in rat brain" Biochem. J. **276**, 455-460.
- Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Gil, J., Tauler, A. and Bartrons, R. (1991b) "6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: kinetic changes induced by phosphorylation" in Cellular Regulation by protein phosphorylation, L.M.G. Heilmeyer ed., NATO-ASI Series, Vol H **56**, 131-135.
- Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Pilkis, S.J. and Bartrons R. (1992) "Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: evidence for a neural-specific isozyme" J. Biol. Chem. **267**, 17939-17943.
- Vora, S., Oskam, R. and Staal, G.E.J. (1985) "Isoenzymes of phosphofructokinase in the rat" Biochem. J. **229**, 333-341.
- Wakelam, M.J.O., Emmerich, M. and Pette, D. (1982) "The control of glucose 1,6-bisphosphatase by Ca^{2+} and calmodulin" Biochem. J. **208**, 517-519.
- Walker, P.S., Donovan, J.A., Van Ness, B.G., Fellows, R.E., and Pessin, J.E. (1988) "Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells" J. Biol. Chem. **263**, 15594-15601.
- Wall, S.R., Van den Hove, M.F., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1989) "Thyroid hormone stimulates expression of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver" F.E.B.S. Lett. **257**, 211-214.
- Watanabe, H. and Passonneau, J.V. (1974) "The effect of trauma on cerebral glycogen and related metabolites and enzymes" Brain Res. **66**, 147-159.
- Watanabe, H. and Ishii, S. (1976) "The effect of brain ischemia on the levels of cyclic AMP and glycogen metabolism in gerbil brain *in vivo*" Brain Res. **102**, 385-389.
- Wiegand, G. and Remington, S.J. (1986) "Citrate synthase: structure, control, and mechanism" Ann. Rev. Biophys. Chem. **15**, 97-117.
- Wieloch, T. (1971) "Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an NMDA antagonist" Science **230**, 681-683.
- Wieloch, T. (1985) "Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability" in Progress in Brain Research **63**, Elsevier Ed., Amsterdam, pp 69-85.
- Williamson, J.R. and Cooper, R.H. (1980) "Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems" F.E.B.S. Lett. **117**, 73-85.
- Wilson, J.E. (1980) "Brain hexokinase, the prototype ambiquitous enzyme" in Current Topics in Cellular Regulation **16**, Academic Press, New York, 1-44.

- Wu, P.H. and Phillis, J.W. (1982) "Uptake of adenosine by isolated brain capillaries" *J. Neurochem.* **38**, 687-690.
- Xie, G. and Wilson, J.E. (1988) "Rat brain hexokinase: the hydrophobic N-terminus of the mitochondrially bound enzyme is insert in the lipid bilayer" *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 803-810.
- Yip, V., Pusateri, E., Carter, J., Rose, I.A. and Lowry, O.H. (1988) "Distribution of the glucose 1,6-bisphosphate system in brain and retina" *J. Neurochem.* **50**, 595-602.
- Yudilevich, D.L. and De Rose, N. (1971) "The specificity of amino acid and sugar carriers in the capillaries of the dog brain studied in vivo by rapid indicator dilution" *Am. J. Physiol.* **220**, 841-846.

Publicacions

6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in rat brain

Francesc VENTURA, Jose Luis ROSA, Santiago AMBROSIO, Joan GIL and Ramon BARTRONS

Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques, Zona Universitària Bellvitge, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet, Spain

The concentration of fructose 2,6-bisphosphate in the brain remained stable during starvation and early stages of ischaemia, but decreased in diabetes or after lengthened ischaemia. 6-Phosphofructo-1-kinase activity was also decreased in diabetic and ischaemic animals, whereas 6-phosphofructo-2-kinase was not modified. The concentration of the bisphosphorylated metabolite seems to be remarkably constant under a wide variety of experimental conditions, suggesting that it plays an essential role in the basal activation of 6-phosphofructo-1-kinase. Purified 6-phosphofructo-2-kinase also showed fructose-2,6-bisphosphatase activity with an activity ratio similar to that of the purified heart isoenzyme. The brain enzyme also has a net charge similar to that of the heart isoenzyme. Its activity is not modified by *sn*-glycerol 3-phosphate, and it is more sensitive to citrate than the liver or muscle isoenzyme. Moreover, the enzyme from brain, similarly to that from heart and muscle, is not modified by the cyclic AMP-dependent protein kinase or protein kinase C. A near-full-length cDNA probe from liver hybridized with RNA from brain and heart. In both cases, a major band of 6.8 kb of RNA and a minor one of 4 kb of RNA were detected. All these properties support the hypothesis that brain contains a different isoenzymic form from that of liver and muscle, and it is probably related to the heart isoform.

INTRODUCTION

Fru-2,6- P_2 is a powerful activator of PFK-1 and an inhibitor of fructose-1,6-bisphosphatase, and it is present in all mammalian tissues. It is involved in the glucose-induced stimulation of glycolysis, not only in liver but also in other tissues. Its synthesis and breakdown are catalysed by PFK-2 and FBPase-2 respectively. These two activities belong to separate domains of each subunit of the same homodimeric protein. The liver bifunctional enzyme integrates a number of metabolic and hormonal signals. It is phosphorylated by the cyclic AMP-dependent protein kinase, modulated by different effectors and also regulated by its control expression (Van Schaftingen, 1987; Hue & Bartrons, 1985; Hue & Rider, 1987; Pilkis & El-Maghrabi, 1988).

Biochemical and immunological data also suggest the existence of distinct PFK-2/FBPase-2 isoenzymes: the liver L type, the muscle M type and the heart H type (Hue & Rider, 1987). The L and M types have a common sequence of 438 amino acids which differ only at the *N*-terminus. In the L isoenzyme, the divergent sequence is 32 residues long and includes the serine phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase (Lively *et al.*, 1988; Taniyama *et al.*, 1988; Darville *et al.*, 1989). The bovine heart H type has a sequence of 530 amino acids and, in contrast with liver and muscle isoenzymes, it is phosphorylated by protein kinase C and also by cyclic AMP-dependent protein kinase. The phosphorylation of the enzyme seems not to alter its activity (Rider & Hue, 1986) or at least produces only slight kinetic changes (Kitamura *et al.*, 1988). Distinct mRNAs coding for PFK-2/FBPase-2 have been described: a 2.1-2.2 kb mRNA from rat liver, a 1.9 kb mRNA from rat skeletal muscle and a 6.8 kb mRNA from rat heart have been found (Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1989). Furthermore, a 4 kb mRNA from bovine heart has been reported (Sakata & Uyeda, 1990).

Fru-2,6- P_2 is present in various types of cultivated brain cells

at a concentration similar to that in hepatocytes (Pauwels & Trouet, 1984), being also a positive allosteric effector of brain PFK-1 (Foe & Kemp, 1985; Vora *et al.*, 1985; Dunaway *et al.*, 1988). The bisphosphorylated metabolite seems to increase transiently in parallel with Fru-1,6- P_2 and lactate formation in the early stages of ischaemia (Yamamoto *et al.*, 1990), although Ogushi *et al.* (1990) have not found changes after stimulation of brain glycolysis.

The aim of the present work is to study the metabolism of Fru-2,6- P_2 in different metabolic states and to characterize the bifunctional enzyme PFK-2/FBPase-2, in order to illuminate the role of this metabolite in the control of brain glycolysis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

[γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol), [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol) and nylon membranes were from Amersham. The Mono Q column was from Pharmacia. Streptozotocin was purchased from Sigma. Enzymes and other biochemical reagents were from either Boehringer or Sigma. cDNA²⁸¹¹⁰⁰ (Colosia *et al.*, 1988), which was used as a probe, was kindly provided by Dr. A. Tauler. Purified protein kinase C from rat brain was kindly given by Dr. E. Rozengurt (Imperial Cancer Research Fund, London, U.K.).

Treatment of animals

Male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were used. Diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin (60 mg/kg) dissolved in 50 mM-sodium citrate (pH 4.5) plus 150 mM-NaCl and allowed to develop for 2 weeks. Animals were killed by decapitation and the heads frozen in liquid N_2 , or by microwave radiation (Toshiba TMW-6402A), i.e. they received a 4.5 kW dose for 0.8 s either immediately or after a measured time interval in ischaemic animals. Afterwards, brains were removed

Abbreviations used: Fru-6- P , fructose 6-phosphate; Glu-6- P , glucose 6-phosphate; Glu-1,6- P_2 , glucose 1,6-bisphosphate; Fru-1,6- P_2 , fructose 1,6-bisphosphate; Fru-2,6- P_2 , fructose 2,6-bisphosphate; PFK-1, 6-phosphofructo-1-kinase (EC 2.7.1.11); PFK-2, 6-phosphofructo-2-kinase (EC 2.7.1.105); FBPase-2, fructose-2,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.46); DTT, dithiothreitol; PEG, poly(ethylene glycol).

* To whom correspondence should be addressed, at: Unitat de Bioquímica, Facultat d'Odontologia, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet, Spain.

and frozen in solid CO₂. Blood samples were taken and immediately deproteinized with ZnSO₄ and Ba(OH)₂ as described by Somogyi (1952).

Assay of metabolites

The concentrations of plasma glucose (Kunst *et al.*, 1984) and β -hydroxybutyrate (Williamson & Mellanby, 1974) were measured enzymically. Fru-2,6-P₂ was extracted and determined as described by Van Schaftingen *et al.* (1982). The content of Glu-1,6-P₂ was measured spectrophotometrically (Passonneau *et al.*, 1969). Citrate was assayed fluorimetrically (Möllering, 1984).

Enzyme assays

PFK-1 was extracted from frozen brains in 10 vol. of ice-cold 250 mM-mannitol/10 mM-Hepes/2.5 mM-MgCl₂/1 mM-KF/0.5 mM-EDTA/1 mM-DTT, at pH 7.4, and centrifuged at 40000 g for 10 min at 4 °C. PFK-1 was measured in the cytosolic fraction at pH 8.0, as described by Staal *et al.* (1987).

PFK-2 activity was determined by a modification of the method described by Bartrons *et al.* (1983). Brain samples were homogenized in 10 vol. of ice-cold 20 mM-P_i/100 mM-KF/10 mM-EDTA/1 mM-DTT/3% poly(ethylene glycol) 6000 (PEG), at pH 7.1, and centrifuged at 40000 g for 10 min at 4 °C. The supernatants after filtration on Sephadex G-25 (fine grade) were incubated at 30 °C in 50 mM-Hepes buffer (pH 7.1), containing 50 mM-KCl, 5 mM-MgATP, 5 mM-Fru-6-P, 17.5 mM-Glu-6-P, 2 mM-MgCl₂, 1 mM-DTT and 1 mM-P_i.

[2-³²P]Fru-2,6-P₂ was synthesized as described by El-Maghrabi *et al.* (1982). FBPase-2 activity was measured by the production of [³²P]P_i from [2-³²P]Fru-2,6-P₂. The reaction was carried out at 30 °C in 50 mM-Hepes buffer (pH 7.5), containing 50 mM-KCl, 5 mM-P_i, 2 mM-EDTA, 1 mM-DTT, 2 mM-MgCl₂, 0.1 mM-NADP⁺, 9 units of phosphoglucosomerase/ml, 4 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase/ml and 5 μ M-Fru-2,6-P₂ (1 500 000 c.p.m./assay). Blanks typically did not exceed 0.2% of the applied radioactivity.

Partial purification of brain, liver, heart and muscle PFK-2

The enzymes were purified by a two-step procedure. Tissue samples were homogenized in 5 vol. of 50 mM-Tris/phosphate, containing 100 mM-KCl, 1 mM-EGTA, 1 mM-DTT, 1 mM-benzamidine and 0.2 mM-phenylmethanesulphonyl fluoride, at pH 8.0. After centrifugation at 40000 g for 20 min, the supernatants were fractionated with 6% (w/v) PEG 6000 and the resulting supernatants with 15% (w/v) PEG 6000. The pellets (6–21% fraction), dissolved in the homogenizing medium, were applied to a Mono Q column and eluted with a linear gradient of 0–500 mM-NaCl in the same medium. Fractions containing PFK-2 activity were pooled and stored at –80 °C in 20% (v/v) glycerol.

Treatment of PFK-2 with the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C

Purified PFK-2 from brain, heart, liver or muscle was incubated at 30 °C for 20 min with the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase (1 m-unit/ml) in a medium containing 100 mM-Hepes (pH 7.1), 1 mM-DTT, 0.1% BSA and 1 mM-MgATP. For the protein kinase C assay, enzymes were pre-incubated for 20 min at 30 °C with 1 unit of immobilized alkaline phosphatase. Afterwards, PFK-2 enzymes were incubated for 20 min at 30 °C in the presence or absence of protein kinase C (1 m-unit/ml) in 0.1 ml of a medium containing 100 mM-Hepes (pH 7.1), 5 mM-MgCl₂, 2 mM-DTT, 5 mM-P_i, 1 mM-MgATP,

2 mM-CaCl₂, 50 μ g of phosphatidylserine/ml and 2 μ g of diolcin/ml. In both cases, samples (40 μ l) were assayed for PFK-2 activity as described above at either 5 mM-Fru-6-P and 5 mM-MgATP (saturating conditions) or 0.1 mM-Fru-6-P and 0.5 mM-MgATP (subsaturating conditions).

Isolation of RNA and Northern-blot analysis

Total RNA was extracted from frozen rat tissues by the LiCl/urea method (Auffray & Rougeon, 1980). RNA was denatured and electrophoresis was performed on 1.5% agarose gels in the presence of ethidium bromide at 1 μ g/ml. RNAs were transferred overnight to a nylon membrane in 10 \times SSC (SSC = 0.15 M-NaCl/0.015 M-sodium citrate, pH 7.4). After transfer, RNA was fixed by irradiating the membrane with u.v. light for 5 min. The filters were prehybridized for 6 h at 42 °C in 50% (v/v) formamide, 2 \times PSE (PSE = 0.01 M-Pipes/0.4 M-NaCl/1 mM-EDTA at pH 6.4), 0.5% (w/v) SDS, 5 \times Denhart's solution (Denhart's solution = 0.2 g of Ficoll/1 + 0.2 g of poly(vinyl pyrrolidone)/1 + 0.2 g of BSA/1) and 0.5 mg of heat-denatured herring sperm DNA/ml. Hybridization was allowed to proceed overnight at 42 °C in the same medium, the labelled cDNA probe (1 \times 10⁶–2 \times 10⁸ c.p.m./ml) being added. Filters were washed twice in 2 \times SSC at room temperature for 5 min and twice in 0.1 \times SSC plus 0.1% SDS at 50 °C for 30 min.

Other methods

Protein was determined (Bradford, 1976) with BSA as a standard. Protein kinase C activity was assayed with histone III-S as a substrate. One unit of enzyme activity catalyses the formation of 1 μ mol of product/min under the specified assay conditions. Statistical significance of differences was assessed by Student's unpaired *t* test.

RESULTS

Brain metabolites and enzyme activities

In order to control the starved and diabetic states of the animals we monitored the blood levels of both glucose and β -hydroxybutyrate. Glycaemia was increased 4-fold in streptozotocin-diabetic rats, whereas starved animals exhibited a continuous decrease (more than 50% at 120 h of starvation) in blood glucose concentration. Plasma levels of β -hydroxybutyrate were increased in both situations (results not shown).

Fru-2,6-P₂ decreased similarly in both non-ketotic (Table 1) and ketotic diabetic animals (4.5 \pm 0.1 nmol/g, *n* = 4). The concentration of this metabolite also decreased after lengthened ischaemia, but was not significantly modified during either the early stages of ischaemia or starvation (Table 1). Citrate increased during diabetes and starvation, but decreased during ischaemia (results not shown). No significant differences were found in the Fru-2,6-P₂ concentrations between the two different stopping methods, namely liquid N₂ (5.9 \pm 0.3 nmol/g, *n* = 5) and microwave radiation (Table 1).

As shown in Table 1, brains from diabetic animals had significantly lower PFK-1 activities, whereas no major differences in these activities were obtained in starved animals. A fall in the activity (60% of control), which remained after gel filtration, was also found in ischaemic animals.

PFK-2 activities obtained from control brains were about 10 times lower than those from rat liver (Bartrons *et al.*, 1983). Brain FBPase-2 (0.05 m-unit/g of tissue) represented one-tenth of the kinase activity and was not modified by 5 mM-*sn*-glycerol 3-phosphate (results not shown). No significant differences with respect to control values were observed in either kinase or

Rat brain 6-phosphofructo-2-kinase

457

Table 1. Brain metabolites and enzyme activities

The values represent means \pm S.E.M. for the number of animals in parentheses, except for Fru-2,6-P₂ where the number of animals measured was nine for diabetic and six for 120 h-starved rats. Statistically significant differences with respect to control animals are indicated by: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. N.D., not determined.

Experimental condition		Fru-2,6-P ₂ (nmol/g)	PFK-1 (units/g)	PFK-2 (m-unit/g)	FBPase-2 (m-unit/g)	PFK-2/FBPase-2 activity ratio
Control	(6)	5.8 \pm 0.4	32.8 \pm 1.0	0.50 \pm 0.05	0.05 \pm 0.01	11.7 \pm 0.6
Diabetes	(4)	4.7 \pm 0.2**	26.5 \pm 1.3**	0.57 \pm 0.08	0.08 \pm 0.03	9.6 \pm 2.8
120 h starvation	(4)	6.0 \pm 0.5	34.8 \pm 1.4	0.56 \pm 0.06	0.07 \pm 0.02	11.1 \pm 4.5
Ischaemia (1 min)	(5)	5.7 \pm 0.4	34.1 \pm 2.3	0.55 \pm 0.07	N.D.	N.D.
Ischaemia (5 min)	(4)	4.7 \pm 0.3*	30.5 \pm 0.7	0.46 \pm 0.05	N.D.	N.D.
Ischaemia (10 min)	(4)	3.1 \pm 0.5**	21.7 \pm 1.8***	0.43 \pm 0.11	0.04 \pm 0.01	11.0 \pm 2.6

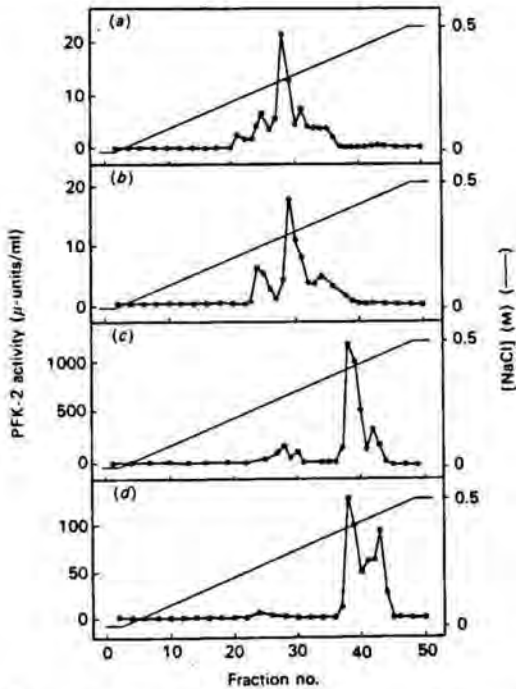


Fig. 1. Elution profiles of (a) brain, (b) heart, (c) liver and (d) muscle PFK-2 from the Mono Q column

PEG fractions (6–21%) of rat tissues were applied to the Mono Q column (1 ml). Fractions of volume 0.5 ml were collected after addition of the specific elution buffer. Pooled fractions contained 0.55, 0.30, 3.4 and 0.53 m-unit/mg of protein for brain, heart, liver and muscle respectively. Another two experiments were done with similar results.

phosphatase activities in streptozotocin-diabetic or starved animals. A significant decrease in PFK-2 and an increase in FBPase-2 activities were found after ischaemia, giving a decreased activity ratio. These activity changes disappeared after filtration on Sephadex G-25 (fine grade).

Properties of brain PFK-2

To characterize the main properties of brain PFK-2, the enzyme was partially purified as described above. Rat liver, muscle and heart PFK-2, the kinetic properties of which are well known, were also purified in parallel with the brain enzyme. The elution profile from the Mono Q column (Fig. 1) shows that liver

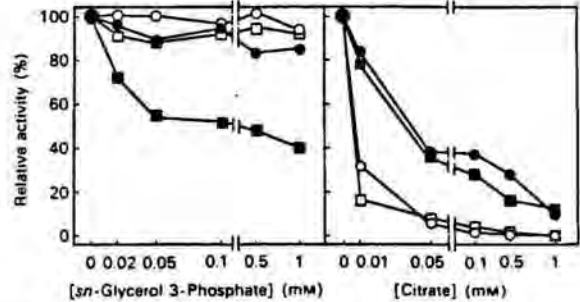


Fig. 2. Effects of *sn*-glycerol 3-phosphate and citrate on brain, heart, liver and muscle PFK-2

Purified brain, heart, liver and muscle PFK-2 were assayed in 50 mM-Hepes/100 mM-KCl/20 mM-KF/1 mM-DTT in the presence of 0.1 mM-Fru-6-P, 0.5 mM-MgATP and the indicated concentrations of *sn*-glycerol 3-phosphate or citrate, at pH 7.1. The specific activities corresponding to 100% values were 0.063 for brain (□), 0.029 for heart (○), 0.87 for liver (■) and 0.087 m-unit/mg of protein for muscle (●). The values are means of two separate experiments.

and muscle PFK-2 were eluted in two peaks at about 0.4 M-NaCl. In contrast, brain PFK-2 was eluted at 0.2 M-NaCl, displaying a similar behaviour to its heart counterpart. Both PFK-2 and FBPase-2 activities were eluted in the same fractions from the Mono Q column. Purified brain PFK-2/FBPase-2 showed an activity ratio of 70, similar to that of the purified bovine heart isoenzyme (Rider & Hue, 1986). Purified brain and liver PFK-2 also differed in their response to *sn*-glycerol 3-phosphate and citrate at concentrations within the physiological range. Whereas the activity of the liver enzyme was markedly inhibited by *sn*-glycerol 3-phosphate, the brain enzyme, similarly to the muscle or heart isoenzyme, was little affected by concentrations of up to 1 mM. Furthermore, the brain and heart PFK-2 activities were more sensitive to inhibition by citrate (Fig. 2).

It has been reported that liver PFK-2 is inactivated by the catalytic subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase, whereas enzymes from other tissues are insensitive to this modification. Table 2 shows that, whereas liver PFK-2 is inhibited by treatment with the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, the brain enzyme, together with the muscle and heart counterparts, are not modified at all. In order to determine whether the absence of inactivation in brain PFK-2 could result from the fact that the enzyme was in a fully phosphorylated

Table 2. Effect of treatment of PFK-2 with the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase

Purified brain, heart, liver or muscle PFK-2 was incubated at 30 °C for 20 min in the presence or absence of catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase (0.1 m-unit) in a final volume of 0.1 ml containing 100 mM-Hepes (pH 7.1), 1 mM-DTT, 0.1% BSA and 1 mM-MgATP. PFK-2 activities were assayed as described in the Materials and methods section. The values are means of two separate experiments.

Addition	PFK-2 activity (mU/mg of protein)			
	Brain	Heart	Liver	Muscle
None	0.49	0.18	4.03	0.65
+ catalytic subunit	0.46	0.17	0.98	0.60

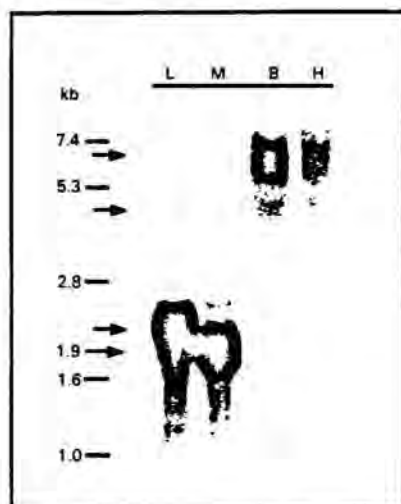


Fig. 3. Northern-blot analysis

Total RNA (40 µg per lane) from liver (L), muscle (M), brain (B) and heart (H) were hybridized with [³²P]cDNA²³¹⁴⁰⁰. Arrows point to the RNA species consistently seen. Numbers on the left correspond to the RNA markers. Data are representative of three different experiments.

form, brain PFK-2 was incubated with glucose, MgADP, hexokinase and the catalytic subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase to dephosphorylate the enzyme (El-Maghrabi *et al.*, 1980; Loiseau *et al.*, 1988); no activation of PFK-2 was observed.

Since brain PFK-2 seems to display similar chromatographic and kinetic properties to that of heart (Figs. 1 and 2, and Table 2) and bearing in mind that previous studies have shown that heart PFK-2 could be phosphorylated by protein kinase C (Rider & Hue, 1986; Kitamura *et al.*, 1988; Sakata & Uyeda, 1990), we have analysed the effects of protein kinase C on the PFK-2 activity of brain, heart, liver and muscle isoenzyme forms. Purified enzymes were preincubated for 20 min with 1 unit of agarose-bound alkaline phosphatase for dephosphorylation, and then incubated with protein kinase C. We found no changes in activity in any of them, at either subsaturating or saturating concentration of substrates (results not shown).

Expression of distinct mRNAs for PFK-2/FBPase-2 in rat tissues

Northern blots of total RNA from rat tissues were hybridized with probe cDNA²³¹⁴⁰⁰ (Colosia *et al.*, 1988). All tissues studied displayed a strong signal which persisted under high-stringency conditions. Fig. 3 shows a signal with 2.1 kb RNA from liver and 1.9 kb RNA from muscle. RNA from brain and heart shows a major band of about 6.8 kb RNA and a minor band of 4 kb. The relative intensity of these signals did not change appreciably under high-stringency conditions.

DISCUSSION

Metabolic studies of brain have shown that glucose under most circumstances is the primary source of fuel (McIlwain & Bachelard, 1985). It is well known that acute modifications in substrate supplies such as those produced in starvation, diabetes or ischaemia promote changes in brain metabolism. These changes mainly affect glycolytic flux through modifications of the main regulatory enzymes.

During starvation and diabetes, ketone bodies increase appreciably and may become a significant substrate for the brain, partly replacing glucose as fuel for brain metabolism (Siesjö, 1988; Owen *et al.*, 1967; Ruderman *et al.* 1974). It has been suggested that ketone-body oxidation will restrict the rate of glucose utilization through citrate inhibition of PFK-1 during periods of carbohydrate deprivation, starvation or diabetes (Owen *et al.*, 1967; Ruderman *et al.*, 1974; Newsholme *et al.*, 1977). The results now reported show that, whereas Fru-2,6-P₂ and PFK-1 are decreased during diabetes, neither of them changes significantly during starvation. On the other hand, citrate is increased in both situations. The decrease in Fru-2,6-P₂ levels observed in diabetic animals is probably a consequence of the inhibition of PFK-2 by citrate (see Fig. 2), since no changes in either kinase or phosphatase activities were found. Brain PFK-1 (Newsholme *et al.*, 1977; Dunaway, 1983; Foe & Kemp, 1985; Vora *et al.*, 1985) and PFK-2 (Fig. 2) isoenzymes are very sensitive to citrate inhibition, which, in addition to the fall in Fru-2,6-P₂ levels, could explain the decreased rate of glycolysis in rat brain when ketone bodies are oxidized (Ruderman *et al.*, 1974; Newsholme *et al.*, 1977). The PFK-1 and PFK-2 isoenzymes that are more sensitive to citrate inhibition are from the same tissues (brain and heart).

During ischaemia there is rapid deterioration in the energy charge, and the tissue levels of both glycolytic substrates and intermediates are decreased (Lowry *et al.*, 1964). Pauwels & Trouet (1984) found no predominant role of Fru-2,6-P₂ at the onset of anaerobic glycolysis in various types of cultivated brain cells, concluding that it seemed not to be responsible for immediate changes in glycolytic flux. Yamamoto *et al.* (1990) reported that, in the early stages of ischaemia, Fru-2,6-P₂ content increases transiently in parallel with Fru-1,6-P₂ and lactate formation, decreasing steadily after lengthened ischaemia without changes in the PFK-2 activity. These results suggest that Fru-2,6-P₂ plays a key role in the compensatory acceleration of glycolysis under ischaemic conditions *in vivo*. In contrast, Ogushi *et al.* (1990) found that there was no change in Fru-2,6-P₂ during initiation of rapid glycolysis in the brain. Our results show that the metabolite content was similarly unchanged in the first 1 min of ischaemia, but decreased thereafter (Table 1). The variations in the metabolite concentrations (Fru-6-P, AMP and IMP), the large fall in ATP levels and the change in the activity ratio of PFK-2/FBPase-2 induced by allosteric modulators, would explain the decrease in Fru-2,6-P₂ content. A good correlation is

obtained for the two metabolites below $1 \mu\text{mol}$ of ATP/g ($r = 0.82$; $P < 0.0001$) (results not shown).

Glu-1,6- P_2 has also been identified as a modulator of the activities of all three of the potentially rate-limiting enzymes of glycolysis (Beitner, 1985). The level of Glu-1,6- P_2 is not modified during starvation or diabetes, and is more affected than Fru-2,6- P_2 during ischaemia (results not shown) (Passonneau *et al.*, 1969), probably as a result of the concomitant rise in IMP and Ca^{2+} , both activators of glucose-1,6-bisphosphatase (Wakelam & Emmerich, 1982; Guha & Rose, 1983). The activation of PFK-1 that occurs during the early stages of ischaemia takes place when Glu-1,6- P_2 concentration is falling, and the activation seems best explained by other factors such as AMP, Fru-2,6- P_2 , P_i or ribose 1,5-bisphosphate, which are much better activators of PFK-1 than is Glu-1,6- P_2 (Rose & Warms, 1974; Yip *et al.*, 1988; Ogunni *et al.*, 1990).

Because the brain is not subjected to the tremendous differences in energy demands that are observed in other tissues, it maintains a fairly constant high rate of glucose metabolism. Similarly to glycogen (Nahas & Abdul-Ghani, 1989) and Glu-1,6- P_2 , the concentration of Fru-2,6- P_2 seems to be remarkably constant under a wide variety of physiological and experimental conditions. Its levels probably have an essential role in the basal activation of brain PFK-1.

Rat brain PFK-2/FBPase-2 also seems to remain essentially constant in all the experimental conditions studied. The PFK-2 and FBPase-2 activities were co-eluted in the same fractions, suggesting that the enzyme is also bifunctional in this tissue, which agrees with El-Maghrabi *et al.* (1986). Its FBPase-2 activity is 70 times smaller than the PFK-2 activity, accounting probably for the relatively high levels of the metabolite, although the enzyme activity is 10 times lower than in the liver. Chromatographic results showed that brain PFK-2/FBPase-2 has a molecular form with a net charge similar to that of the heart tissue. The brain enzyme is not inhibited by *sn*-glycerol 3-phosphate and is more sensitive to citrate than the liver or muscle isoenzyme. Heart PFK-2 is phosphorylated by protein kinase C to the extent of about 1 mol/mol of enzyme subunit, whereas liver PFK-2 is a relatively poor substrate. This phosphorylation does not alter the activity of the enzyme (Rider & Hue, 1986). In contrast, Kitamura *et al.* (1988) have shown that the purified heart PFK-2/FBPase-2 can be slightly activated by phosphorylation through cyclic AMP-dependent protein kinase or protein kinase C. The phosphorylation sites of the heart isoenzyme were located near the C-terminus (Sakata & Uyeda, 1990), whereas the phosphorylation site of the liver isoenzyme is known to be located near the N-terminus (Lively *et al.*, 1988; Darville *et al.*, 1989). The enzymic activity from brain PFK-2, similarly to that of heart or muscle (Rider & Hue, 1986; Rider, 1987), is not modified on incubation with cyclic AMP-dependent protein kinase or with Ca^{2+} - and phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C).

RNA from brain and heart shows a major band of about 6.8 kb and a minor one of 4 kb, agreeing with previous results (Sakata & Uyeda, 1990; Crepin *et al.*, 1989). Total RNA used for Northern-blot assays may contain precursor as well as mature RNA. This fact might explain the two species detected in brain and heart RNA. However, the shorter RNA detected is 4 kb, which is too big to code the 530 amino acids of bovine heart PFK-2/FBPase-2 (Sakata & Uyeda, 1990). It would suggest that a polypeptide coding for the enzyme could be processed post-translationally, or that cDNA^{2k1400} strongly cross-hybridizes with other related transcripts present in these tissues.

All these properties support the view that the brain contains a different isoenzyme form from that of liver or muscle and that it is probably related to the isoenzyme from heart.

We are indebted to M. Miralpeix, J. Rodrigues, E. Carballo and A. Tauler for their help and for many valuable suggestions during the course of this project. We also thank C. Ortuño for his skilful technical assistance. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social and Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM-89-0049). F.V. and J.L.R. are recipients of research fellowships (F.P.I.) from the Ministry of Education of Spain.

REFERENCES

- Auffray, C. & Rougeon, F. (1980) *Eur. J. Biochem.* **107**, 303-314
- Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E. & Hers, H. G. (1983) *Biochem. J.* **136**, 115-124
- Beitner, R. (1985) in *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Beitner, R., ed.), vol. 4, pp. 1-27, CRC Press, Boca Raton, FL
- Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Colosia, A. D., Marker, A. J., Lange, A. J., El-Maghrabi, M. R., Granner, D. K., Tauler, A., Pilkis, J. & Pilkis, S. J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18669-18677
- Crepin, K. M., Darville, M. I., Hue, L. & Rousseau, G. G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 433-440
- Darville, M. I., Crepin, K. M., Hue, L. & Rousseau, G. G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 6543-6547
- Dunaway, G. A. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* **52**, 75-91
- Dunaway, G. A., Kasten, T. P., Sebo, T. & Trapp, R. (1988) *Biochem. J.* **251**, 677-683
- El-Maghrabi, M. R., Haston, W. S., Flockhart, D. A., Claus, T. H. & Pilkis, S. J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 668-675
- El-Maghrabi, M. R., Claus, T. H., Pilkis, J., Fox, E. & Pilkis, S. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7603-7607
- El-Maghrabi, M. R., Correia, J. J., Heil, P. J., Pate, T. M., Cobb, C. E. & Pilkis, S. J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5005-5009
- Foe, L. G. & Kemp, R. G. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 726-730
- Guha, S. K. & Rose, Z. B. (1983) *Biochemistry* **22**, 1356-1361
- Hue, L. & Bartrons, R. (1985) in *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Beitner, R., ed.), vol. 1, pp. 29-44, CRC Press, Boca Raton, FL
- Hue, L. & Rider, M. H. (1987) *Biochem. J.* **245**, 313-324
- Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H. & Uyeda, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16796-16801
- Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), vol. 6, pp. 163-172, Verlag Chemie, Weinheim
- Lively, M. O., El-Maghrabi, M. R., Pilkis, J., D'Angelo, G., Colosia, A. D., Ciavola, J. A., Fraser, B. A. & Pilkis, S. J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 839-849
- Loiseau, A. M., Rider, M. H., Foret, D., Rousseau, G. G. & Hue, L. (1988) *Eur. J. Biochem.* **175**, 27-32
- Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X. & Schulz, D. W. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 18-30
- McIlwain, H. & Bachelard, H. S. (1985) *Biochemistry and the Central Nervous System*, Churchill Livingstone, New York
- Möllering, H. (1984) in *Methods in Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), vol. 7, pp. 2-12, Verlag Chemie, Weinheim
- Nahas, N. & Abdul-Ghani, A. S. (1989) *Neurochem. Int.* **14**, 19-24
- Newsholme, E. A., Sugden, P. H. & Williams, T. (1977) *Biochem. J.* **166**, 123-129
- Ogushi, S., Lawson, J. W. R., Dobson, G. P., Veech, R. L. & Uyeda, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10943-10949
- Owen, O. E., Morgan, A. P., Kemp, H. G., Sullivan, J. M., Herrera, M. G. & Cahill, G. F. (1967) *J. Clin. Invest.* **46**, 1589-1595
- Passonneau, J. V., Lowry, O. H., Schulz, D. W. & Brown, J. G. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 902-909
- Pauwels, P. J. & Trouet, A. (1984) *Neurosci. Lett.* **46**, 173-177
- Pilkis, S. J. & El-Maghrabi, M. R. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 755-783
- Rider, M. H. (1987) *Biochem. Soc. Trans.* **15**, 988-991
- Rider, M. H. & Hue, L. (1986) *Biochem. J.* **240**, 57-61
- Rose, I. A. & Warms, J. V. B. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 1333-1340
- Ruderman, N. B., Ross, P. S., Berger, M. & Goodman, M. N. (1974) *Biochem. J.* **138**, 1-10
- Sakata, J. & Uyeda, K. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4951-4955
- Siesjö, B. K. (1988) *Diabetes Metab. Rev.* **4**, 113-144
- Somogyi, M. (1952) *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23

- Staal, G. E. J., Kalff, A., Heesbeen, E. C., van Veelen, C. W. M. & Rijksen, G. (1987) *Cancer Res.* **47**, 5047-5051
- Taniyama, M., Kitamura, K., Thomas, H., Lawson, J. W. R. & Uyeda, K. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 949-954
- Van Schaftingen, E. (1987) *Adv. Enzymol.* **59**, 315-395
- Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R. & Hers, H. G. (1982) *Biochem. J.* **129**, 191-195
- Vora, S., Oskam, R. & Staal, G. E. J. (1985) *Biochem. J.* **229**, 333-341
- Wakelam, M. J. O. & Emmerich, M. (1982) *Biochem. J.* **208**, 517-519
- Williamson, D. H. & Mellanby, J. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), pp. 1836-1839, Academic Press, New York
- Yamamoto, M., Hamasaki, N., Maruta, Y. & Tomonaga, M. (1990) *J. Neurochem.* **54**, 592-597
- Yip, V., Pusateri, M. E., Carter, J., Rose, I. A. & Lowry, O. H. (1988) *J. Neurochem.* **50**, 594-602

Received 16 July 1990/4 December 1990; accepted 13 December 1990

Journal of Neurochemistry
Raven Press, Ltd., New York
© 1991 International Society for Neurochemistry

Fructose 2,6-Bisphosphate in Hypoglycemic Rat Brain

Santiago Ambrosio, Francesc Ventura, Jose Luis Rosa, and Ramon Bartrons

Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona,
Zona Universitària de Bellvitge, Barcelona, Spain

Abstract: Fructose 2,6-bisphosphate has been studied during hypoglycemia induced by insulin administration (40 IU/kg). No changes in content of cerebral fructose 2,6-bisphosphate were found in mild hypoglycemia, but the level of this compound was markedly decreased in hypoglycemic coma and recovered after 30 min of glucose administration. To correlate a possible modification of the concentration of the metabolite with selective regional damage occurring during hypoglycemic coma, we have analyzed four cerebral areas (cortex, striatum, cerebellum, and hippocampus). Fructose 2,6-bisphosphate concentrations were similar in the four areas analyzed; severe hypoglycemia decreased levels of the metabolite to the same extent in all the brain areas studied. The decrease in content

of fructose 2,6-bisphosphate was not always accompanied by a parallel decrease in ATP levels, a result suggesting that the low levels of the bisphosphorylated metabolite during hypoglycemic coma could be due to the decreased 6-phosphofructo-2-kinase activity, mainly as a consequence of the fall in concentration of its substrate (fructose 6-phosphate). These results suggest that fructose 2,6-bisphosphate could play a permissive role in cerebral tissue, maintaining activation of 6-phosphofructo-1-kinase and glycolysis. **Key Words:** Fructose 2,6-bisphosphate—6-Phosphofructo-1-kinase—6-Phosphofructo-2-kinase—Hypoglycemia. Ambrosio S. et al. Fructose 2,6-bisphosphate in hypoglycemic rat brain. *J. Neurochem.* 57, 200–203 (1991).

Fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), the most powerful activator known of 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1; EC 2.7.1.11) and the most powerful inhibitor known of fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11), is present in all mammalian tissues. It is involved in the glucose-induced stimulation of glycolysis, not only in the liver but also in other tissues. Its synthesis and breakdown are catalyzed by 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2; EC 2.7.1.105) and fructose-2,6-bisphosphatase (FBPase-2; EC 3.1.3.46), respectively.

Fru-2,6-P₂ is also a positive allosteric effector of brain PFK-1 (Foe and Kemp, 1984; Vora et al., 1985; Dunaway et al., 1988). It is present in various types of cultured brain cells at a concentration similar to that in hepatocytes (Pauwels and Trouet, 1984).

The influence of hypoglycemia on the brain has been intensively explored (Siesjö, 1988). Because the brain's own carbohydrate reserves can support oxidative metabolism for only a few minutes, the brain is very much dependent on a constant supply of glucose from the blood. Many metabolic disturbances have been de-

scribed in this status, including the decrease in content of glycolytic metabolites (Lewis et al., 1974).

The aim of the present work is to study the cerebral levels of Fru-2,6-P₂ and the activities responsible for its synthesis and breakdown during hypoglycemia.

MATERIALS AND METHODS

Animal and tissue preparation

Male Sprague-Dawley rats (weighing 200–250 g) were used. Animals were injected subcutaneously with 40 IU/kg of insulin (Actrapid HM; Novo Industri, Denmark) and were deprived of food. Control rats received an equal volume of saline solution (0.9% NaCl s.c.). One group of animals, with normal behavior, was killed 1 h after they received the insulin (mildly hypoglycemic), and another group was killed after 3–4 h, when the animals were unconscious, with no righting reflex or response to any external stimuli, a stage that was defined as hypoglycemic coma, as in Gorell et al. (1977). A third group of animals in hypoglycemic coma had recovery induced with oral (2 ml) and subcutaneous (1 ml) administration of 25% glucose; the animals then were killed without

Received October 10, 1990; revised manuscript received December 3, 1990; accepted December 18, 1990.

Address correspondence and reprint requests to Dr. R. Bartrons at Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona, Zona Universitària de Bellvitge, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain.

Abbreviations used: FBPase-2, fructose-2,6-bisphosphatase; Fru-2,6-P₂, fructose 2,6-bisphosphate; PFK-1, 6-phosphofructo-1-kinase; PFK-2, 6-phosphofructo-2-kinase.

Fru-2,6-P₂ IN HYPOGLYCEMIC BRAIN

201

delay after they became conscious and recovered movement (between 30 min and 1 h). A fourth group had recovery induced and was killed after refeeding for 1 week, to examine possible regional nonreversible modifications.

We have used two different experimental approaches to obtain the brain samples: liquid N₂ and microwave irradiation. In the first method, rats were killed by decapitation, and heads were frozen in liquid N₂. Animals killed by microwave irradiation were placed in a microwave oven (Toshiba model TMW-6402A) and received 4.5 kW of radiation for 0.8 s. Brain dissection was done by the classical method described by Glowinski and Iversen (1966).

Assay of metabolites and enzymes

Blood samples were taken and immediately deproteinized with 0.33 M HClO₄ for glucose content determination, according to the technique of Kunst et al. (1984). Fru-2,6-P₂ was extracted and quantified as described by Van Schaftingen et al. (1982). Nucleotides were quantified by HPLC.

PFK-1 was extracted from frozen brains in 10 volumes of ice-cold 250 mM mannitol, 10 mM HEPES, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM KF, 0.5 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol (pH 7.4) and centrifuged at 40,000 g for 10 min at 4°C. PFK-1 activity was measured in the cytosolic fraction at pH 8.0, as described by Staal et al. (1987). PFK-2 activity was determined by a modification of the method described by Bartrons et al. (1983). Brain samples were homogenized in 10 volumes of ice-cold 20 mM P_i, 100 mM KF, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 3% polyethyleneglycol 6000 (pH 7.1) and centrifuged at 40,000 g for 10 min at 4°C. The supernatants were incubated at 30°C in 50 mM HEPES buffer (pH 7.1) containing 50 mM KCl, 5 mM ATP-Mg, 5 mM fructose 6-phosphate, 17.5 mM glucose 6-phosphate, 2 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 1 mM P_i.

FBPase-2 activity was measured by the production of [³²P]P_i from [2-³²P]Fru-2,6-P₂. [2-³²P]Fru-2,6-P₂ was synthesized according to the procedure of El-Maghrabi et al. (1982). The reaction was carried out at 30°C in 50 mM HEPES buffer (pH 7.5) containing 50 mM KCl, 5 mM P_i, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM NADP, 9 U/ml of phosphoglucosomerase, 4 U/ml of glucose 6-phosphate dehydrogenase, and 5 μM Fru-2,6-P₂ (900,000 cpm/assay). Blanks typically did not exceed 0.1% of the applied radioactivity.

Statistics

Statistical differences were evaluated with Student's *t* test.

RESULTS

To control the degree of hypoglycemia caused by insulin administration, we measured the plasma glucose concentration. In control animals, the plasma glucose concentration was 6.0 ± 0.2 mmol/L (n = 10). One hour after the rats received insulin, 40 IU/kg s.c., the plasma glucose concentration decreased to 2.6 ± 0.1 mmol/L (n = 8), with the animals exhibiting normal behavior or presenting only symptoms of stupor. After 3–4 h, the plasma glucose values were 1.1 ± 0.3 mmol/L (n = 8), and the animals had convulsions and immediately became unconscious. Administration of 25% (wt/vol) glucose (2 ml p.o. and 1 ml s.c. at the same time) to the animals of this last group produced partial recovery of the plasma glucose concentration (4.0 ± 0.5

mmol/L) (n = 5) after 30 min, and these rats behaved like control animals.

As shown in Fig. 1, brain Fru-2,6-P₂ levels were not significantly altered in mild hypoglycemia, whereas in hypoglycemic coma they were markedly decreased (45% of control values). The hepatic levels of the bisphosphorylated metabolite decreased in both experimental conditions, falling to 13% of basal values in hypoglycemic coma. No significant differences were found in Fru-2,6-P₂ levels using the two different stopping methods, liquid N₂ and microwave irradiation (data not shown).

Fru-2,6-P₂ was analyzed in the cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum. Similar basal levels of the metabolite were found in the four areas. The insulin-induced coma affected all the areas studied similarly, with the concentration of Fru-2,6-P₂ recovering after 1 week of normal feeding (Fig. 2).

The brain concentration of Fru-2,6-P₂ recovered 30–60 min after glucose administration (Table 1). As shown in Table 1, brains from animals in hypoglycemic coma had slightly lower PFK-2 activities relative to the controls, with the activity recovering between 30 min and 1 h after glucose administration. No major differences in the activities of PFK-1 and FBPase-2 were observed in the different groups of animals.

DISCUSSION

It is well known that glucose is the main fuel for the brain under normal conditions. Signs of cerebral dysfunction appear when the arterial glucose level falls to nearly 50% of its normal concentration in humans or experimental animals. No cerebral energy deficit can be detected, however, until the arterial glucose concentration falls to <20% of basal levels, when the EEG

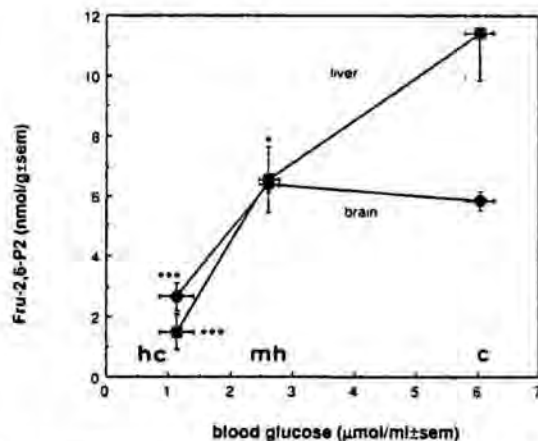


FIG. 1. Cerebral and hepatic concentrations of Fru-2,6-P₂ at different blood glucose levels. Data are mean ± SEM (bars) values, grouped as control (c; n = 10), mildly hypoglycemic (mh; n = 8), and hypoglycemic coma (hc; n = 8). Results significantly different from control values are indicated: **p* < 0.05; ****p* < 0.001.

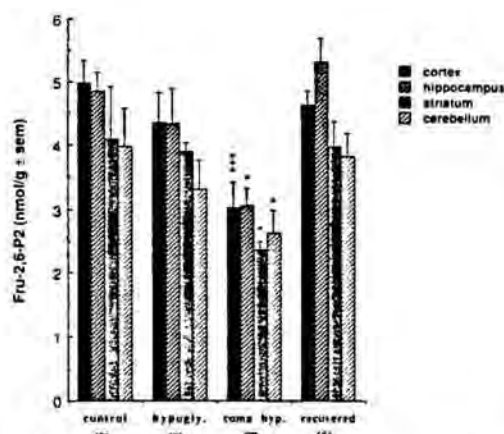


FIG. 2. Fru-2,6-P₂ levels in regional brain areas at different stages of insulin-induced hypoglycemia (hypogly.) and refeeding 7 days after hypoglycemic coma (coma hyp.). Data are mean \pm SEM (bars) values for the number of animals given in parentheses. Results significantly different from control values are indicated: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

becomes isoelectric and consciousness is lost. In this condition the animal enters hypoglycemic coma, and, when the coma is prolonged, irreversible regional cell damage may be produced (Lewis et al., 1974; Auer et al., 1984).

It has also been established that pronounced hypoglycemia leads to depletion of the tissue concentrations of both glycolytic substrates and end products (Lewis et al., 1974; Gorell et al., 1977; Siesjö, 1988). Our results show that brain Fru-2,6-P₂ content is decreased after severe hypoglycemia, like other metabolite depletions (Siesjö, 1988), whereas it is not affected during mild hypoglycemia. This suggests that in this condition glycolysis is functioning, providing sufficient substrates for the energy requirements. The decrease in Fru-2,6-P₂ concentration observed in hypoglycemic coma would probably be due to the decrease in content of its substrate, fructose 6-phosphate (Lewis et al., 1974), in addition to the decreased PFK-2 activity (Table 1).

During mild hypoglycemia the hepatic levels of Fru-2,6-P₂ are reduced to <50%. The hepatic concentration of Fru-2,6-P₂ is almost linear with plasma glucose levels. It is reduced to 13% when the plasma glucose concentration is reduced to 18%. The decrease of Fru-2,6-P₂ level in the liver by the inhibition of PFK-2 produced by phosphorylation has been described previously (Gil et al., 1986).

We have also analyzed Fru-2,6-P₂ levels in several brain regions to correlate a possible modification in content of the metabolite with the selective regional damage described in hypoglycemic coma (Auer et al., 1984; Siesjö, 1988). Fru-2,6-P₂ concentrations were similar in the four areas analyzed, although cerebellum and striatum showed a nonsignificantly lower concentration (Fig. 2). Severe hypoglycemia reduced the Fru-2,6-P₂ level to the same extent (nearly 40%) in all the brain areas examined. According to these results, a regional brain difference does not seem to exist in the levels of Fru-2,6-P₂ in either normoglycemic or hypoglycemic conditions. Furthermore, and in agreement with Ratcheson et al. (1981), during hypoglycemia, ATP levels were not modified in cerebellum but were reduced in cortical areas more than in hippocampus and striatum (data not shown). The lack of correlation, at least in some areas, between ATP levels and Fru-2,6-P₂ content decrease seems to indicate that the modifications of Fru-2,6-P₂ levels must not be due to a fall in energy state, but they may implicate the fructose 6-phosphate supply and PFK-2 activity.

Fru-2,6-P₂ has previously been shown to be present in cultures of brain cells (Pauwels and Trouet, 1984), although it seemed not to be responsible for immediate changes in glycolytic flux. Recently, Yamamoto et al. (1990) have described a slight increase in content of the bisphosphorylated metabolite during the early stages of cerebral ischemia and a decrease after chronic anoxic conditions, a result suggesting that Fru-2,6-P₂ plays a key role in the compensatory acceleration of glycolysis under ischemic conditions in vivo. During mild hypoglycemia the metabolite could also play a significant role as a stimulator of PFK-1 and, in so doing, activate glycolytic flux, with its content de-

TABLE 1. Concentration of Fru-2,6-P₂ and enzymatic activities in brain of normal, comatose, and recovered animals

	Fru-2,6-P ₂ (nmol/g)	PFK-1 (U/g)	PFK-2 (mU/g)	FBPase-2 (mU/g)
Control	5.8 \pm 0.4 (6)	21.2 \pm 2.1 (6)	0.69 \pm 0.07 (6)	0.042 \pm 0.002 (5)
Hypoglycemic coma	3.5 \pm 0.4 (8) ^a	21.0 \pm 2.0 (5)	0.48 \pm 0.08 (8) ^b	0.041 \pm 0.004 (5)
Hypoglycemic coma + glucose	4.5 \pm 0.5 (5)	19.0 \pm 1.3 (5)	0.77 \pm 0.06 (5) ^c	0.045 \pm 0.010 (4)

Recovery was induced in animals in hypoglycemic coma by oral and subcutaneous administration of glucose, as indicated in Materials and Methods, and the rats were killed between 30 min and 1 h after glucose administration. Data are mean \pm SEM values for the number of animals given in parentheses. One unit of enzyme activity represents 1 μ mol of substrate converted/min/g of wet tissue.

^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$ relative to control values.

^c $p < 0.01$ relative to hypoglycemic coma values.

Fru-2,6-P₂ IN HYPOGLYCEMIC BRAIN

203

ing after the glucose concentration falls to <2 mM (Fig. 1).

In conclusion, the results reported here show that the level of Fru-2,6-P₂ is reduced during hypoglycemic coma and recovers after glucose administration (Table 1 and Fig. 2). This seems to indicate that the concentration of the metabolite follows the cerebral glucose concentration (Agardh et al., 1978), recovering at the same time as glycolytic flux is activated. This suggests that the metabolite plays a permissive role in cerebral tissue, overcoming ATP inhibition and maintaining PFK-1 in an activated state.

Acknowledgment: We are indebted to Carles Ortuño for his technical assistance. We are also indebted to the C.S.I.C. of Barcelona for the use of a microwave oven. F. Ventura and J. L. Rosa are the recipients of a research fellowship (FPI) from the Ministry of Education of Spain. This work has been supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social and Dirección General de Investigación Científica y Técnica.

REFERENCES

- Agardh C. D., Folbergrová J., and Siesjö B. K. (1978) Cerebral metabolic changes in profound, insulin-induced hypoglycemia, and in the recovery period following glucose administration. *J. Neurochem.* **31**, 1135-1142.
- Auer R. N., Olsson Y., and Siesjö B. K. (1984) Hypoglycemic brain injury in the rat. *Diabetes* **33**, 1090-1098.
- Bartrons R., Hue L., Van Schaftingen E., and Hers H. G. (1983) Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **136**, 115-124.
- Dunaway G. A., Kasten T. P., Sebo T., and Trapp R. (1988) Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem. J.* **251**, 677-683.
- El-Maghrabi M. R., Claus T. H., Pilgis J., Fox E., and Pilgis S. J. (1982) Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **257**, 7603-7607.
- Foe L. G. and Kemp R. G. (1984) Isozyme composition and phosphorylation of brain phosphofructokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 503-511.
- Gil J., Carreras J., and Bartrons R. (1986) Effects of diabetes on fructose 2,6-P₂, glucose 1,6-P₂ and 6-phosphofructo 2-kinase in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 498-503.
- Glowinski J. and Iversen L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochem.* **13**, 655-669.
- Gorell J. M., Law M. M., Lowry O. H., and Ferrendelli J. A. (1977) Levels of cerebral cortical glycolytic and citric acid cycle metabolites during hypoglycemic stupor and its reversal. *J. Neurochem.* **29**, 187-191.
- Kunst A., Draeger B., and Ziegenhorn J. (1984) UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, in *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 6 (Bergmeyer H. U., ed), pp. 163-172. Verlag-Chemie, Weinheim.
- Lewis L. D., Ljunggren B., Norberg K., and Siesjö B. K. (1974) Changes in carbohydrate substrates, amino acids, and ammonia in the brain during insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* **23**, 659-671.
- Norberg K. and Siesjö B. K. (1976) Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* **26**, 345-352.
- Pauwels P. J. and Trouet A. (1984) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of glycolysis in various types of cultivated brain cell. *Neurosci. Lett.* **46**, 173-177.
- Ratcheson R. A., Blank A. C., and Ferrendelli J. A. (1981) Regionally selective metabolic effects of hypoglycemia in brain. *J. Neurochem.* **36**, 1952-1958.
- Siesjö B. K. (1988) Hypoglycemia, brain metabolism and brain damage. *Diabetes Metab. Rev.* **4**, 113-144.
- Staal G. E. J., Kalf A., Heesbeen E. C., van Veelen C. W. M., and Rijkssen G. (1987) Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas. *Cancer Res.* **47**, 5047-5051.
- Van Schaftingen E., Lederer B., Bartrons R., and Hers H. G. (1982) A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *Biochem. J.* **129**, 191-195.
- Vora S., Oskam R., and Staal G. E. J. (1985) Isoenzymes of phosphofructokinase in the rat. *Biochem. J.* **229**, 333-341.
- Yamamoto M., Hamasaki N., Maruta Y., and Tomonaga M. (1990) Fructose 2,6-bisphosphate changes in rat brain during ischemia. *J. Neurochem.* **54**, 592-597.

6-PHOSPHOFRUCTO 2-KINASE/FRUCTOSE 2,6-BISPHOSPHATASE:
KINETIC CHANGES INDUCED BY PHOSPHORYLATION

Authors: VENTURA, F., ROSA J.L., AMBROSIO, S., GIL, J., TAULER, A. and BARTRONS, R.

Unitat de Bioquímica. Departament de Ciències
Fisiològiques. Universitat de Barcelona

INTRODUCTION:

Fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) is a potent stimulator of 6-phosphofructo 1-kinase which has been identified in all eukaryotic cells. Its synthesis and breakdown are catalyzed by 6-phosphofructo 2-kinase (PFK-2) and fructose 2,6-bisphosphatase (FBPase-2), respectively. These two activities belong to separate domains of the same homodimeric protein (Van Schaftingen, 1987; Pilkis & EL-Maghrabi, 1988). Differences between tissues in the PFK-2/FBPase-2 activity ratio, kinetic and antigenic properties have suggested the existence of several PFK-2/FBPase-2 isoenzymes (Hue & Rider, 1987; Taniyama et al., 1988). The liver "L" and the muscle "M" isozymes have a common sequence of 438 aminoacids and differ at the N-terminus. In the "L" type, the divergent sequence is 32 residues long and contains the serine phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA). The "M" type has a divergent sequence of 10 residues, containing a protein kinase C (PKC) target (Lively et al., 1988; Darville et al., 1989). The bovine heart "H" isozyme has a well-conserved sequence of 530 aminoacids, differing only at the N and C-terminus. Interestingly, it has phosphorylation targets for both PKA and PKC at the C-terminus (Sakata & Uyeda, 1990).

We have now studied the brain, heart, muscle and liver PFK-2/FBPase-2, comparing their kinetic properties and the influence of phosphorylation by both cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C.

RESULTS AND DISCUSSION:

PFK-2 from brain, heart, liver and muscle were purified by polyethylene glycol fractionation and Mono-Q high performance liquid chromatography. The physical behaviour of PFK-2 differed between brain and heart activities respect to the liver and muscle counterparts. Brain and heart PFK-2 activities were eluted at 0.2 M NaCl, whereas liver and muscle were eluted in two peaks at about 0.4 M NaCl (Fig 1). The second peak eluted from Mono-Q column represents a phosphorylated form of the enzyme, since incubation of the fraction corresponding to the second peak with alkaline phosphatase and replication into the column leads to its disappearance.

All PFK-2 and FBPase-2 activities were co-eluted in the same fractions although their activity ratios are quite different. Enzymes from brain and heart resemble more a kinase than a phosphatase whereas the opposite occurs for the muscle type. The purified enzymes also showed distinct responses to allosteric modulators such as citrate and glycerol 3-phosphate (Table I). PFK-2 from liver and heart are phosphorylated by PKA (Van

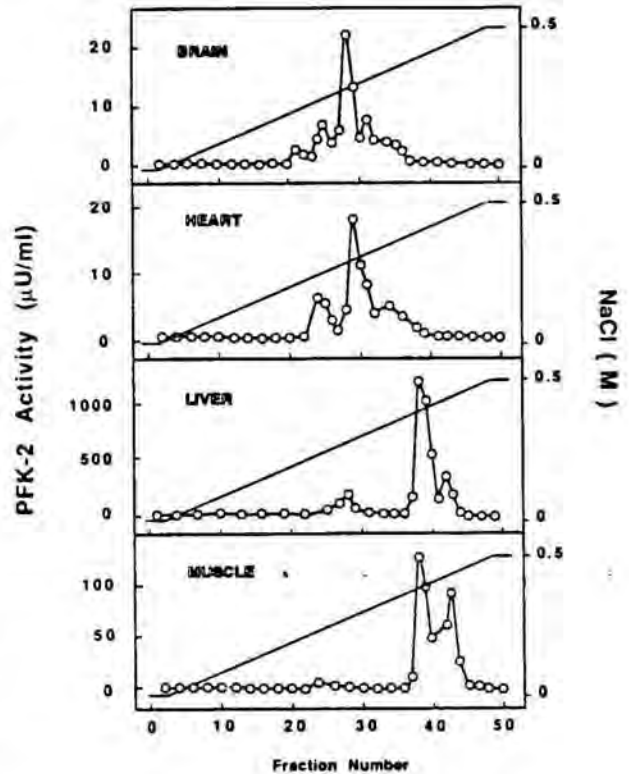


Fig 1.- ELUTION PROFILES OF BRAIN, HEART, LIVER AND MUSCLE PFK-2 FROM MONO-Q COLUMN

Polyethylene glycol fractions (6-21%) of rat tissues were applied to Mono-Q column (1ml). Fractions of 0.5 ml were collected after addition of the specific elution buffer. Pooled fractions contained: 0.55, 0.30, 3.4 and 0.53 mU/mg of protein for brain, heart, liver and muscle respectively. Other two experiments were done with similar results.

Phosphorylation effects on PFK-2/FBPase-2

Properties	Tissues			
	Liver	Muscle	Heart	Brain
PFK-2/FBPase-2 activity ratio	1-4	0.2	80	70
Phosphorylation by PKA	+	-	+	N.D.
Activity changes	+	-	+ / -	-
Phosphorylation by PKC	-	N.D.	+	N.D.
Activity changes	-	-	+ / -	-
Glycerol 3-P inhibition	+	-	-	-
Citrate inhibition	+	+	++	++

Table I.- PHOSPHORYLATION EFFECTS ON PFK-2/FBPase-2

Data were taken from (Rider & Hue, 1986; Hue & Rider, 1987; Kitamura et al., 1988 and present results). Abbreviations: +, detectable effects; -, no effects; N.D., not done.

Schaftingen, 1987; Pilakis & El-Maghrabi, 1988; Kitamura et al., 1988). However, their activity is clearly modified only for the liver isozyme, resulting in an inhibition of the kinase and activation of the phosphatase activities (Van Schaftingen, 1987; Pilakis & El-Maghrabi, 1988). In the other hand, heart PFK-2/FBPase-2 is phosphorylated by PKA and PKC (Rider & Hue, 1986; Kitamura et al., 1988). This phosphorylation does not alter the activity of the enzyme (Rider & Hue, 1986), although Kitamura et al., (1988) have shown slightly activations by phosphorylation. The phosphorylated serines in the heart PFK-2 are located near the C-terminus (Sakata & Uyeda, 1990), whereas the phosphorylation site of the liver isozyme is known to be located near the N-terminus (Lively et al., 1988; Darville et al., 1989). We have analyzed the effects of phosphorylation by PKC on the PFK-2 activity of brain, heart, liver and muscle isoforms. We found no changes in the activities in any of them, either at saturating or subsaturating concentration of substrates (Table I).

The similarity of the mRNA for the three isozyms (Sakata & Uyeda, 1990; Darville et al., 1989) suggests that they arise from the same gene by using alternative splicing. The "M" isozyne differs from the "L" form only in the first exon. This substitution yields a change in the phosphorylation targeting. The cDNA sequence of bovine heart isozyne (Sakata & Uyeda, 1990) suggests that very likely this form has been originated by another alternative splicing or arises from a close related gene. In the first case, the 1 and 14 exons would be changed (Fig. 2). Northern blot analysis of total RNA from brain showed identical pattern than that of heart RNA and clearly different from those of liver and muscle (not shown).

All these results suggest that the brain contains an isoenzymatic form related to the heart and different from the liver and muscle isozyms.

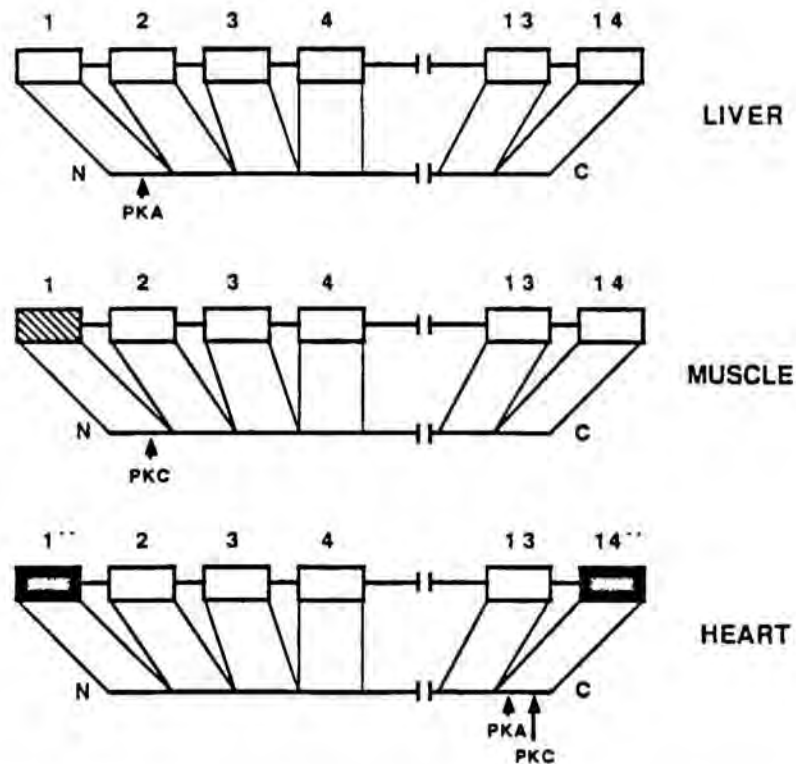


Fig 2.- HYPOTHESIZED ALTERNATIVE SPLICING OF PFK-2/FBPase-2 ISOZYMS.

Alternative splicing of the first exon for liver and muscle isozyms and the first and fourteenth exons for the heart isozyne are shown. Arrows point to the phosphorylation targets for these isozyms.

REFERENCES

- Darville, M.I., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1989) " 5' flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6543-6547
- Hue, L. and Rider, M.H. (1987) " Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues", *Biochem. J.* 245, 313-324
- Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H. and Uyeda, K. (1988) "Phosphorylation of myocardial Fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C", *J.Biol. Chem.* 263, 16796-16801
- Lively, M.O., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., D'Angelo, G., Colosia, A.D., Ciavola, J.A., Fraser, B.A. and Pilkis, S.J. (1988) "Complete amino acid sequence of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase" *J. Biol. Chem.* 263, 839-849
- Pilkis, S.J. and El-Maghrabi, M.R. (1988) "Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis", *Ann. Rev. Biochem.* 57, 755-783
- Rider, M.H. and Hue, L. (1986) " Phosphorylation of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo 2-kinase by protein kinase C and comparison of the fructose 2,6-bisphosphatase activity of the two enzymes", *Biochem. J.* 240, 57-61
- Sakata, J. and Uyeda, K. (1990) "Bovine heart fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: Complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4951-4955
- Taniyama, M., Kitamura, K., Thomas, H., Lawson, J.W.R. and Uyeda, K. (1988) " Isozymes of Fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in rat and bovine heart, liver and skeletal muscle", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 949- 954
- Van Schaftingen, E. (1987) " Fructose 2,6-bisphosphate", *Adv. Enzymology* 59, 315-395

Fructose 2,6-bisphosphate in developing rat brain

Santiago Ambrosio, Francesc Ventura and Ramon Bartrons

Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona, Barcelona (Spain)

(Accepted 31 December 1991)

Key words: Fructose 2,6-bisphosphate; Phosphofructo-2-kinase; Phosphofructo-1-kinase; Rat brain; Perinatal rat

Fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) levels and 6-phosphofructo-1-kinase and 6-phosphofructo-2-kinase activities have been studied in rat brain during development from embryonal to adult state. Fru-2,6-P₂ increases slightly from day 16 of gestation, reaching a maximum 24 h after birth, remaining quite constant during postnatal development. In contrast with 6-phosphofructo-1-kinase, which increases progressively after the first week of age, 6-phosphofructo-2-kinase remains unaltered throughout the period studied. The role of Fru-2,6-P₂ in controlling cerebral glycolysis is discussed.

Fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂) is a very powerful activator of 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1; EC 2.7.1.11) and inhibitor of fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) from different sources, playing a prominent role in the glucose-induced stimulation of glycolysis not only in the liver but also in other tissues^{8–12}. Fru-2,6-P₂ is also a positive allosteric effector of brain PFK-1⁶ and it has been demonstrated that it could play an important role in the stimulation of brain glycolysis in different physiological and pathological states^{1,18,19}.

Glycolytic enzymes develop broadly as a group in most regions of the brain. The activity of several glycolytic enzymes is low in newborn rat brains, but progressively increases throughout the first few days to weeks after birth⁹. Of these, PFK-1 reaches maximal activity around 3 weeks of age¹¹. The relationship between maximal enzyme activity and metabolic flux is complex, but the measurement of enzyme activities has often been considered a useful approach to relating metabolic potential to tissue function. To examine the developmental regulation of rat brain Fru-2,6-P₂, we have studied the activity of 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2; EC 2.7.1.105), responsible for its synthesis, from the embryonic to the adult state.

The experiments were performed on Sprague-Dawley rats fed ad libitum. Groups of two females (weighing 200–250 g) were coupled with an adult male until the presence of spermatozoa was found intravaginally. The gestational age was noted and fetuses were delivered by caesarean section after decapitation of the dam. Fetus and neonate brains were removed and immediately fro-

zen in liquid nitrogen. The brains of the dams were used as adult controls. The frozen brains were cut longitudinally. Half of each brain was homogenized in 50 mM NaOH (1:10 w/v) for Fru-2,6-P₂ analysis. The homogenates were heated at 80°C during 10 min, in order to hydrolyze the fructose-1,6-bisphosphate present in the samples, cooled and adjusted to a pH 5–6. After centrifugation at 15,000 × g for 10 min, Fru-2,6-P₂ was quantified in the supernatants as described by Van Schaftingen et al.¹⁷. The other half of the brain was homogenized in a medium containing (in mM): phosphate buffer 20, KF 100, EDTA 10, 1,4-dithiothreitol 1 and 3% of polyethylenglycol 6,000 (1:5 w/v), at pH 7.4, for analysis of enzymatic activities. The homogenates were centrifuged at 40,000 × g and 4°C for 10 min and the activities of PFK-1¹⁵ and PFK-2 were immediately measured in supernatants. PFK-2 was assayed by the production of Fru-2,6-P₂ in a mixture containing (in mM): Tris/acetate 50, magnesium acetate 10, potassium phosphate 2, ATP 7, glucose 6-phosphate 8 and fructose 6-phosphate 2, at a pH 7.8 and 30°C. After different times, samples were mixed with 1 vol. of 0.1 M NaOH and used for the determination of Fru-2,6-P₂².

As shown in Fig. 1, Fru-2,6-P₂ increases slightly from day 16 of gestation, reaching a maximum 24 h after birth. As a whole, Fru-2,6-P₂ values in the brain appear constant during the postnatal development (between 5.0 and 6.5 nmol/g of wet tissue). Fru-2,6-P₂ has been described to rise in the liver just before birth, coinciding with the beginning of glycogen mobilization, and to fall around birth, corresponding to a neonatal hypoglyce-

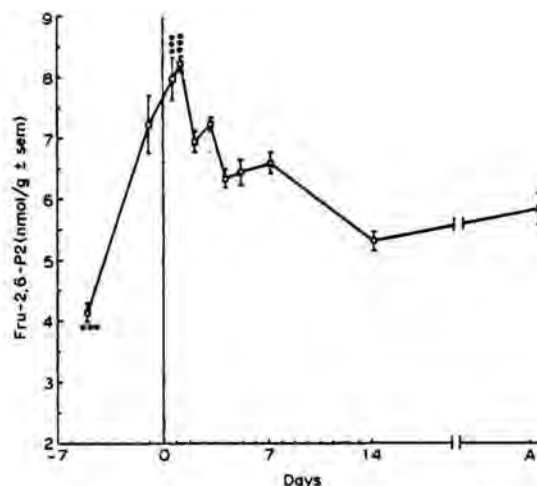


Fig. 1. Fru-2,6-P₂ content of embryonic, neonatal and adult (A) rat brains compared with the age expressed as days before (-) and after (+) birth (0). The values shown are means \pm S.E.M. for 3-4 animals. Fru-2,6-P₂ is expressed as nmol/g of whole rat brain. Significance of differences compared with adult animals. (***) $P < 0.001$.

mia^{7,13} and thus contributing to the low PFK-1 activity¹¹. In contrast, in chicken erythrocytes⁵, Fru-2,6-P₂ increases progressively after hatching, corresponding to a rise in glucose consumption.

In the rat brain, immediately after birth (1-2 days), the amount of glucose transporters decrease 5-fold¹⁴, the glucose uptake being low after birth and reaching the adult values only after 2-3 weeks. At the same time, oxygen consumption increases as well as the ability to remove glycogen¹¹. In this period the main external brain fuels are lactate and 3-hydroxybutyrate³. It has been reported that PFK-1 is inhibited in neonatal rat brain, allowing glucose to be saved for preferential use in the pentosephosphate pathway, providing hydrogen equivalents for the synthesis of myelin lipids¹⁶.

Despite these considerations, our results show that the time course of Fru-2,6-P₂ does not parallel PFK-1 activity. Fig. 2 shows that PFK-1 activity, similarly to other enzymes, increases progressively after the first week of age, as has already been described^{9,11}, the fetal activity being only about 10% of adult activity. In addition, different isoenzymatic forms of PFK-1 have been reported in fetal and adult brain⁴. In liver an isoenzymatic PFK-2 transition occurs during development. The fetal enzyme has different molecular, kinetic and regulatory properties compared to the adult form¹⁰. In con-

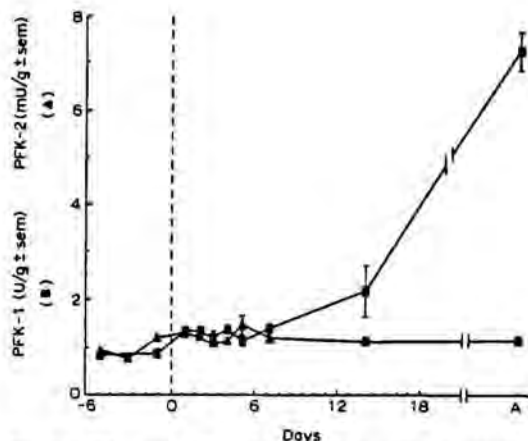


Fig. 2. PFK-1 and PFK-2 activities in embryonic, neonatal and adult (A) whole rat brains. The values are means \pm S.E.M. for 3-4 animals, of PFK-1 (U/g) and PFK-2 (mU/g). The values for PFK-1 were significantly higher ($P < 0.001$) in adult and 14-day-old animals ($P < 0.05$) and significantly lower in embryos ($P < 0.01$) than in neonates.

trast, PFK-2, recently characterized in the adult rat brain¹⁸, remains quite constant during brain development (Fig. 2). The fetal and adult brain enzymes seem to be similar, since their chromatographic separation¹⁸ by a mono-Q HPLC column shows a similar profile (data not shown). In contrast with other enzymes, such as PFK-1 (Fig. 2), hexokinase, aldolase and lactate dehydrogenase⁹, which increase their activities after birth, PFK-2 seems to maintain remarkably constant activity during brain development. No isoenzymatic transition has been described for cerebral PFK-2 during development, whereas it is clear that fetal hepatic PFK-2 is a different isoenzyme that is not inactivated by glucagon¹⁰.

The variations in Fru-2,6-P₂ concentration before birth could be related to the variations in substrate supply, favoring glycolysis in this period and decreasing soon afterwards, probably as a consequence of increased lipid metabolism and citrate accumulation. Brain PFK-2, similarly to brain PFK-1, is very sensitive to this allosteric inhibitor¹⁸. The remarkably constant Fru-2,6-P₂ concentration found in the brain during development (this paper) and in different physiological and experimental conditions^{1,18}, seems to indicate that it plays an important role in the basal activation of brain PFK-1.

This work has been supported by FISs (91/0325). We are also indebted to C. Ortuño for his technical assistance and to Drs. J. Gil and J.L. Rosa for their valuable suggestions.

1 Ambrosio, S., Ventura, F., Rosa, J.L. and Bartrons, R., Fructose 2,6-bisphosphate in hypoglycemic rat brain, *J. Neurochem.*,

57 (1991) 200-203.

2 Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E. and Hers, H.G.,

- Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes, *Biochem. J.*, 214 (1983) 829-837.
- 3 Dombrowski Jr., G.J., Swiatek, K.R. and Chao, K.L., Lactate, 3-hydroxybutyrate, and glucose as substrates for early postnatal rat brain, *Neurochem. Res.*, 14 (1989) 667-675.
 - 4 Dunaway, G.A., A review of animal phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role, *Mol. Cell. Biochem.*, 52 (1983) 75-91.
 - 5 Espinet, C., Bartrons, R. and Carreras, J., Fructose 2,6-bisphosphate and glucose 1,6-bisphosphate in erythrocytes during chicken development, *FEBS Lett.*, 209 (1986) 254-256.
 - 6 Foe, L.G. and Kemp, R.G., Isozyme composition and phosphorylation of brain phosphofructokinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 228 (1984) 503-511.
 - 7 Hamer, M.J. and Dickson, A.J., Developmental changes in hepatic fructose 2,6-bisphosphate content and phosphofructokinase-1 activity in the transition of chicks from embryonic to neonatal nutritional environment, *Biochem. J.*, 245 (1987) 35-39.
 - 8 Hue, L. and Rider, M.H., Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues, *Biochem. J.*, 245 (1987) 313-324.
 - 9 Leong, S.F. and Clark, J.B., Regional enzyme development in rat brain, *Biochem. J.*, 218 (1984) 131-138.
 - 10 Martin-Sanz, P., Cascales, M. and Bosca, L., Fructose 2,6-bisphosphate in isolated foetal hepatocytes, *FEBS Lett.*, 225 (1987) 37-42.
 - 11 McIlwain, H. and Bachelard, H.S., *Biochemistry and the Central Nervous System*, Churchill Livingstone, New York, 1985, pp. 392-397.
 - 12 Pilkis, S.J. and El-Maghrabi, M.R., Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, *Annu. Rev. Biochem.*, 57 (1988) 755-783.
 - 13 Schubert, Ch., Goltzsch, W. and Hoffman, E., Perinatal changes of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113 (1983) 672-677.
 - 14 Sivitz, W., DeSautel, S., Walker, P.S. and Pessin, J.E., Regulation of the glucose transporter in developing rat brain, *Endocrinology*, 124 (1989) 1875-1880.
 - 15 Staal, G.E.J., Kalf, A., Heesbeen, E.C., van Veelen, C.W.M. and Rijksen, G., Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas, *Cancer Res.*, 47 (1987) 5047-5051.
 - 16 Stumpf, B. and Kraus, H., Regulatory aspects of glucose and ketone body metabolism in infant rat brain, *Pediat. Res.*, 13 (1979) 585-590.
 - 17 Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R. and Hers, H.G., A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers, *Eur. J. Biochem.*, 129 (1982) 191-195.
 - 18 Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Gil, J. and Bartrons, R., 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in rat brain, *Biochem. J.*, 276 (1991) 455-460.
 - 19 Yamamoto, M., Hamasaki, N., Maruta, Y. and Tomonaga, M., Fructose 2,6-bisphosphate changes in rat brain during ischemia, *J. Neurochem.*, 54 (1990) 592-597.

Bovine Brain 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase EVIDENCE FOR A NEURAL-SPECIFIC ISOZYME*

(Received for publication, March 23, 1992)

Francesc Ventura†, Jose Luis Ross, Santiago Ambrosio, Simon J. Pilkis‡, and Ramon Bartrons¶

From the Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain and the §Department of Physiology and Biophysics, State University of New York, Stony Brook, New York 11794

Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase was purified to homogeneity and characterized. This bifunctional enzyme is a homodimer with a subunit molecular weight of 120,000, which is twice that of all other known bifunctional enzyme isozymes. The kinase/bisphosphatase activity ratio was 3.0. The K_m values for fructose 6-phosphate and ATP of the 6-phosphofructo-2-kinase were 27 and 55 μM , respectively. The K_m for fructose 2,6-bisphosphate and the K_i for fructose 6-phosphate for the bisphosphatase were 70 and 20 μM , respectively. Physiologic concentrations of citrate had reciprocal effects on the enzyme's activities, *i.e.* inhibiting the kinase (K_i of 35 μM) and activating the bisphosphatase (K_a of 16 μM). Phosphorylation of the brain enzyme was catalyzed by the cyclic AMP-dependent protein kinase with a stoichiometry of 0.9 mol of phosphate/mol of subunit and at a rate similar to that seen with the liver isozyme. In contrast to the liver isozyme, the kinetic properties of the brain enzyme were unaffected by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation, and also was not a substrate for protein kinase C. The brain isozyme formed a labeled phosphoenzyme intermediate and cross-reacted with antibodies raised against the liver isozyme. However, the NH_2 -terminal amino acid sequence of a peptide generated by cyanogen bromide cleavage of the enzyme had no identity with any known bifunctional enzyme sequences. These results indicate that a novel isozyme, which is related to other 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isozymes, is expressed specifically in neural tissues.

Fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6- P_2)¹ is the most powerful activator of 6-phosphofructo-1-kinase (EC 2.7.1.11) (PFK-1), a key regulatory enzyme of glycolysis. Its synthesis

and breakdown are catalyzed by 6-phosphofructo-2-kinase (EC 2.7.1.105) and fructose-2,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.46), respectively (1-3). These two activities belong to separate domains of each subunit of the same homodimeric protein. This bifunctional enzyme integrates a number of metabolic and hormonal signals by means of allosteric effectors and phosphorylation/dephosphorylation processes and by its transcription rate (1-9).

Several mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) isozymes have been described whose expression differs depending on the tissue (1-3, 10-14). The liver "L" and muscle "M" isozymes derive from a 55-kilobase gene by alternative splicing from two promoters (15). Its expression is controlled by ubiquitous and tissue-specific transcription factors (16) and hormones (6-7), the most important being glucocorticoids (5, 7). The heart "H" type contains a COOH-terminal extension that includes a sequence that codes for a protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylation sites (17).

Fru-2,6- P_2 is present in various types of cultivated brain cells at a concentration similar to that in hepatocytes (18), and it is also a positive allosteric effector of brain PFK-1 (19-20). The bisphosphorylated metabolite increases transiently, in parallel with fructose 1,6-bisphosphate and fructose 6-phosphate, during early stages of ischemia (21). It also decreases during hypoglycemia following the fall in fructose 6-phosphate and increases to normal levels after glucose administration (22). In the diabetes state, Fru-2,6- P_2 levels are decreased permitting the glucose-sparing effects of ketone bodies on brain glycolysis (23). However, all the changes in brain Fru-2,6- P_2 are quantitatively low, suggesting that in brain tissue Fru-2,6- P_2 remains remarkably constant under a wide variety of experimental conditions, suggesting that it plays a permissive role in cerebral glycolysis, by maintaining PFK-1 in an active state.

As a first step in understanding how brain Fru-2,6- P_2 levels are regulated, we report the isolation and characterization of a bovine brain PFK-2/FBPase-2 isozyme which has unique kinetic and structural properties compared to other known mammalian isozymes, and which is probably encoded by a heretofore undiscovered gene.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—[γ -³²P]ATP (3000 C/mmol) was from Amersham. Mono-Q and Superose 12 HR columns and Blue Sepharose were from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. Enzymes and other biochemical reagents were purchased from either Boehringer or Sigma. Pro-Blot transfer membranes were from Applied Biosystems. Purified protein kinase C from rat brain was kindly given by Dr. E. Rozengurt (Imperial Cancer Research Fund, London).

Enzyme Assays—PFK-2 activity was determined by a modification of the method described by Bartrons *et al.* (24). Samples were incu-

* This work was supported by Grant DGICYT PB91/0239 from Dirección General de Investigación Científica y Técnica and by National Institutes of Health Grant DK-38354 (to S. P.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Recipient of a research fellowship (FPI) from the Ministry of Education of Spain.

‡ To whom correspondence should be addressed.

¶ The abbreviations used are: Fru-2,6- P_2 , fructose 2,6-bisphosphate; Fru-6-P, fructose-6-P; PFK-1, 6-phosphofructo-1-kinase (EC 2.7.1.11); PFK-2, 6-phosphofructo-2-kinase (EC 2.7.1.105); FBPase-2, fructose-2,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.46); CAPS, 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid; PEG, polyethyleneglycol; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; EGTA, [ethylenedibis(oxyethylenetriolo)tetraacetic acid]; bp, base pair(s).

17940

Brain 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase

bated at 30 °C in 50 mM Hepes buffer (pH 7.1) containing 50 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mM P_i, and, unless otherwise indicated, 5 mM ATP, 5 mM fructose 6-phosphate (Fru-6-P), and 17.5 mM glucose 6-phosphate.

FBPase-2 activity was measured by the release of ³²P from [2-³²P] Fru-2,6-P₂ as described by Ventura *et al.* (23). [2-³²P] Fru-2,6-P₂ was synthesized according to El-Maghrabi *et al.* (25).

Western Blot Analysis—Immunoblot analysis were performed essentially as described by Burnette (26) with a 1:200 dilution of the polyclonal antibody raised against rat liver PFK-2/FBPase-2 (27). Bound antibodies were detected by incubation with ¹²⁵I-labeled protein A (1–2 × 10⁶ cpm/ml) for 30 min and, after washing, exposed to x-ray film.

Phosphoenzyme Assay—Phosphoenzyme autoradiograms were obtained by a modification of El-Maghrabi *et al.* (27). Briefly, purified bovine brain PFK-2/FBPase-2 (0.5–2 μg) was incubated at room temperature with 1 μM Fru-2,6-[2-³²P]P₂ (1–2 × 10⁶ cpm/assay) in 50 mM Hepes buffer (pH 7.5), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol. The reaction was stopped after 15 s by addition of 2 volumes of ice-cold 10% trichloroacetic acid. After centrifuging, the pellet was washed with 1% HCl in acetone and centrifuged again. The pellet was then redissolved in 25 μl of 0.1 M NH₄HCO₃ (pH 9.0), and the sample was analyzed by SDS-PAGE in a 8% gel.

Phosphorylation of PFK-2/FBPase-2 by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase and Protein Kinase C—Brain PFK-2/FBPase-2 was incubated for 20 min at 30 °C with the purified catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase (2 milliunits/ml) in a medium containing 100 mM Hepes (pH 7.1), 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 0.5 mM [γ-³²P]ATP-Mg (1–2 × 10⁶ cpm/nmol). For the protein kinase C assay, PFK-2/FBPase-2 was incubated for 20 min at 30 °C with protein kinase C (2 milliunits/ml) in a medium containing 100 mM Hepes (pH 7.1), 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 5 mM P_i, 0.5 mM [γ-³²P]ATP-Mg (1 × 10⁶ cpm/nmol), 2 mM CaCl₂, 50 μg of phosphatidylserine/ml, and 2 μg of diolein/ml. After the incubation, phosphorylated samples were subjected to SDS-PAGE. The gel was then dried and exposed to x-ray film.

Cyanogen Bromide Digestion and Amino Acid Sequencing—Blotted PFK-2/FBPase-2 was suspended in 100 μl of 70% formic acid, and CNBr was added to a final concentration of 5 mg/ml. The tube was flushed with nitrogen and incubated in the dark for 24 h at room temperature. The incubation mixture was diluted 10 times and dialyzed overnight against 2 mM β-mercaptoethanol. After dialysis, digested PFK-2/FBPase-2 was subjected to SDS-PAGE in a 15% acrylamide, 0.75% bisacrylamide gel. The gel was transferred to a Pro-Blot membrane (Applied Biosystems) for 45 min at 70 V in 10 mM CAPS, 10% methanol (v/v), pH 11. The blotted membrane was stained with Coomassie Blue, and bands of interest were excised and washed extensively with water. The amino acid sequence was determined in a liquid-phase sequencer (Applied Biosystems 470-A protein sequencer).

Other Methods—SDS-PAGE was carried out in 8% gels according to the procedure of Laemmli (28). Protein was determined by the method of Bradford (29) using bovine serum albumin as a standard. Protein kinase C activity was assayed with histone III-S as a substrate. One unit of enzyme activity catalyzes the formation of 1 μmol of product per min under the specified assay conditions.

RESULTS

Purification of 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase—Bovine brains were obtained from a local slaughterhouse, maintained in ice, and used immediately. Cortex from dissected brains (700 g) was trimmed away from meninges and blood vessels and homogenized in 3 volumes of ice-cold 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin, 0.1 mM Fru-6-P, 0.3 mM glucose 6-phosphate, and 3% (w/v) polyethylene glycol 6000 (PEG 6000). The homogenate was centrifuged at 15,000 × g for 20 min. 3% (w/v) PEG 6000 was added to the supernatant and after 10 min it was subjected to centrifugation, and the pellet was discarded. 15% PEG 6000 was added to the supernatant, the pH was adjusted to 6.5 with HCl, and after standing for 10 min it was centrifuged at 15,000 × g for 20 min. The pellet (6–21% PEG 6000) was redissolved in 300 ml of ice-cold 50

mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin (buffer B) and clarified by centrifugation at 15,000 × g for 15 min. The enzyme was then applied to a Blue Sepharose CL6B column (1.8 × 35 cm) which had been equilibrated with buffer B. The column was washed overnight with buffer B until the eluate was free of protein (monitored by A₂₈₀). PFK-2/FBPase-2 was eluted (5–10 mM ATP-Mg) with a linear gradient of ATP-Mg (0–15 mM) in buffer B. The fractions containing PFK-2 activity were pooled and ultrafiltered to approximately 3 ml with an Amicon concentrator equipped with a YM-10 filter. The concentrated enzyme was diluted 4-fold and applied to a Mono-Q column equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin, and 10% (v/v) glycerol (buffer C). After washing with the equilibration buffer a continuous KCl gradient (0–300 mM) made in buffer C was applied. PFK-2/FBPase-2 eluted at 0.2 M KCl. The fractions containing the peak activity were pooled, diluted 2-fold, and reapplied in the same column. The enzyme eluted as a single peak with a flatter gradient made in the same buffer (Fig. 1). The peak fractions containing the enzyme were stored frozen at –80 °C in 20% (v/v) glycerol.

This purification method permitted the isolation of bovine brain PFK-2/FBPase-2 with an average 10% yield. The procedure took less than 4 days to complete and led to a 15,000-fold purification (Table I). No other significant Fru-2,6-P₂ synthesizing activities were found during the purification procedure. The purified fractions displayed both PFK-2 and FBPase-2 activities indicating that the bovine brain enzyme is bifunctional with specific activities of 90 milliunits/mg of

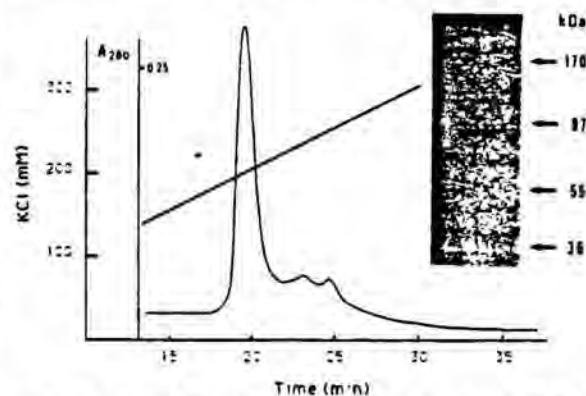


FIG. 1. Elution profile from Mono-Q column and SDS-PAGE of bovine brain PFK-2/FBPase-2. PFK-2/FBPase-2 from bovine brain was reappplied into a Mono-Q column as described under "Results." The enzyme was eluted between 19 and 21 min. A fraction of the peak was subjected to gel electrophoresis in an 8% acrylamide gels. The position of molecular mass standards is indicated by the arrows.

TABLE I
Purification of PFK-2/FBPase-2 from bovine brain

Steps	Protein mg	PFK 2 activity mL	Esp. Act. mL/mg	Purifica- tion -fold	Yield %
Extract	25002	147	0.006	1	100
6–21% PEG	4242	82.4	0.019	3.2	56
Blue Sepharose	3.44	48.4	14.1	2345	32.9
Mono-Q	0.71	31.6	44.5	7417	21.5
Mono-Q reapplication	0.15	13.9	92.7	15450	9.5

Brain 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase

17941

protein for the kinase and 29 milliunits/mg of protein for the bisphosphatase.

Molecular Weights—The M_r of the subunit was determined to be 120,000 by SDS-PAGE (Figs. 1 and 2). The molecular weight of the native enzyme was estimated to be 225,000 by molecular filtration on a Superose 12 HR column in a 200 mM phosphate buffer, pH 7.0. These data are indicative of a homodimeric structure for the brain bifunctional enzyme.

Western Blot and Phosphoenzyme Assays of PFK-2/FBPase-2 from Brain—Purified brain and liver enzymes were subjected to Western blotting after labeling with Fru-2,6-[2- 32 P] P_2 (Fig. 2). The Western blot showed that anti-liver PFK-2/FBPase-2 polyclonal antibodies cross-reacted with the brain form indicating that they share some antigenic relatedness. In addition, brain PFK-2/FBPase-2 formed a labeled phosphoenzyme intermediate upon brief incubation with Fru-2,6-[2- 32 P] P_2 , suggesting that the brain bisphosphatase reaction involves a phosphohistidine intermediate as does the other mammalian isoforms (3).

Kinetic Properties—Several kinetic properties of bovine brain PFK-2/FBPase-2 were determined (Table II). The K_m values for Fru-6-P and ATP are in the same range as those determined for the heart and muscle isoforms (10–11, 30). The K_m value for Fru-6-P (27 μ M) is lower than that of the liver form (1–3). The bisphosphatase has a high K_m value for Fru-2,6- P_2 (70 μ M) and also showed a high sensitivity to noncompetitive inhibition by Fru-6-P (86% inhibition at 100 μ M Fru-6-P). Citrate had reciprocal effects on both activities, inhibiting kinase and activating bisphosphatase. Citrate re-

duced the K_m for Fru-2,6- P_2 to 50% without changing the V_{max} value of the bisphosphatase activity. Other known modulators of liver PFK-2/FBPase-2 such as glycerol 3-phosphate or phospho(enol)pyruvate (1–3) (up to 5 mM each) did not modify either kinase or bisphosphatase activities. ATP also had no effect on the bisphosphatase activity.

Phosphorylation of Brain PFK-2/FBPase-2 by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase and Protein Kinase C—To analyze further the nature of brain PFK-2/FBPase-2 the purified enzyme was tested, in parallel with the liver isozyme, as a substrate for the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. These two protein kinases have been shown to differentially phosphorylate PFK-2/FBPase-2 isoforms (1–3, 31). As shown in Fig. 3, the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase catalyzed the phosphorylation of both the brain and liver isoforms. When similar concentrations of pure bovine brain or rat liver isoforms were incubated with the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, their phosphorylation was catalyzed at similar rates (Fig. 3). The stoichiometries of phosphorylation were 0.9 mol of phosphate/mol subunit for the brain enzyme and 0.8 mol of phosphate/mol of subunit for the liver enzyme. These results indicate a ratio close to 1 suggesting that brain PFK-2/FBPase-2 has a single phosphorylation site. However, unlike the heart and testes isoforms which are substrates for protein kinase C, the brain enzyme was not phosphorylated by protein kinase C (data not shown). In agreement with our previous results (23), incubation with the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase did not alter the K_m for Fru-6-P or V_{max} of bovine brain PFK-2 at pH 7.1, whereas it did modify the activity of the liver isozyme (23). In order to determine whether the absence of activation could result from the fact that the enzyme remained in a phosphorylated form, the enzyme was incubated with glucose, ADP-Mg, hexokinase, and the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase in order to remove phosphate specifically from the enzyme by a reversal of the cyclic AMP-dependent protein kinase reaction (32). However, no change in activity was observed. It was concluded that cyclic AMP-dependent protein kinase catalyzed phosphorylation of the brain enzyme

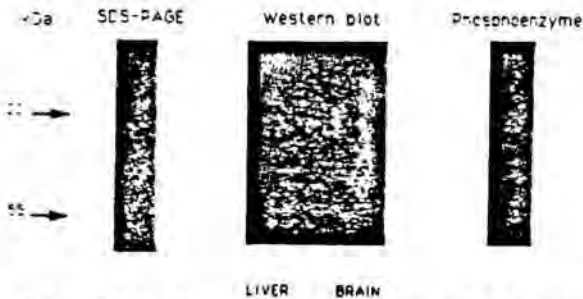


FIG. 2. SDS-PAGE, Western blot, and fructose 2,6-bisphosphate labeling of brain PFK-2/FBPase-2. The left panel is the Coomassie Blue stain of purified brain PFK-2/FBPase-2. The center panel is the immunoblot of brain and liver enzymes that were performed as described under "Experimental Procedures." The right panel shows SDS-PAGE electrophoresis of 32 P-labeled brain enzyme with Fru-2,6-[2- 32 P] P_2 .

TABLE II

Kinetic constants of bovine brain PFK-2/FBPase-2

PFK-2 activity was determined as described under "Experimental Procedures" except that ATP concentration was kept at 5 mM and Fru-6-P was varied for the determination of K_m for Fru-6-P; Fru-6-P was kept at 5 mM and ATP varied for the determination of K_m for ATP; ATP was kept at 5 mM and Fru-6-P and citrate were varied for the determination of K_i for citrate. FBPase-2 activity was determined as described under "Experimental Procedures" except that Fru-2,6- P_2 concentration was varied for the determination of the K_m ; Fru-2,6- P_2 and Fru-6-P concentrations were varied, and NADP, phosphoglucose isomerase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase were omitted for the determination of K_i for Fru-6-P; Fru-2,6- P_2 and citrate were varied for the determination of K_i for citrate.

	V_{max}	K_m ATP	K_m Fru-6-P	K_i citrate
PFK-2	90 mU/mg	55 μ M	27 μ M	35 μ M
	V_{max}	K_m Fru-2,6- P_2	K_i Fru-6-P	K_i citrate
FBPase-2	29 mU/mg	70 μ M	20 μ M	16 μ M

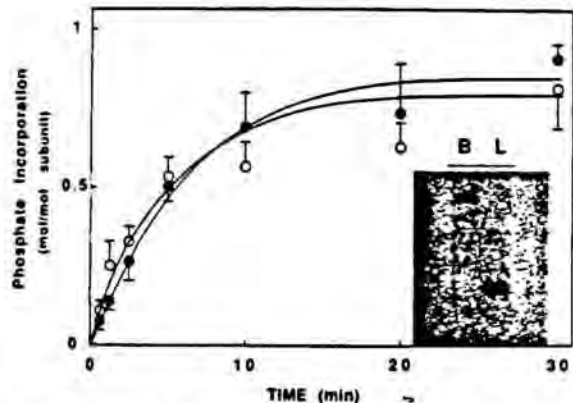


FIG. 3. Phosphorylation of bovine brain and rat liver PFK-2/FBPase-2 by cyclic AMP-dependent protein kinase. PFK-2/FBPase-2 from (B) brain (0.5 μ M) and (L) liver (1 μ M) were incubated in the presence of 2 milliunits/ml catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase as described under "Experimental Procedures." At the indicated times, aliquots (40 μ l) were removed, and the amount of [32 P]phosphate incorporated on bovine brain (●) or rat liver (○) was determined. The values are the means \pm S.E. of three separate experiments. The phosphorylated enzymes (20 min) were subjected to gel electrophoresis and autoradiographed.

17942

Brain 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase

does not affect the activity of the enzyme.

Cyanogen Bromide Cleavage and Amino Acid Sequencing—In order to obtain further structural information about the nature of the enzyme we sequenced the native protein after alkylation with 4-vinylpyridine. The results showed that the NH₂ terminus of the protein was blocked to Edman degradation. PFK-2/FBPase-2 (5–10 μg) was then partially digested with CNBr after alkylation as described under "Experimental Procedures." The cleaved peptides were subjected to SDS-PAGE in 15% acrylamide, 0.75% bisacrylamide gels. The gels were electroblotted and the membranes were stained with Coomassie Blue and washed extensively with water. Three major peptides were detected with molecular weights of 36,000, 32,000, and 22,000. The blotted 36-kDa peptide (50 pmol) was sequenced directly from the membrane with certainty to its 10th residue. The sequence was Gln-Val-Asn-Gln-His-Leu-Lys-Gly-Glu-Tyr. This sequence has no significant homology to any of the known sequences of other mammalian PFK-2/FBPase-2s (13, 15, 17, 33–34).

DISCUSSION

We report here a procedure for the isolation of PFK-2/FBPase-2 from bovine brain resulting in a 15,000-fold purification. The enzyme was pure as judged by SDS-PAGE and both Coomassie Blue or silver staining and had an average native molecular weight of 225,000 corresponding to a homodimer of two *M*, 120,000 subunits. This subunit molecular weight is approximately twice that of all known mammalian bifunctional enzyme forms, since the liver, skeletal muscle, and heart forms have molecular masses of 55, 54, and 58 kDa, respectively (1–3, 8–11, 13). The homogeneous enzyme exhibited both activities, and the kinase/bisphosphatase activity ratio remained constant through all purification steps after the PEG fractionation (data not shown). The specific kinase activity was 90 and 29 milliunits/mg of protein for the bisphosphatase. No other significant brain forms of PFK-2/FBPase-2 were found during the purification procedure, whether cortex or whole brain was used as the tissue source. Based on the above findings, the brain form represents a unique isozyme but is bifunctional like all other mammalian isozymes.

Different mammalian tissue-specific PFK-2/FBPase-2 isozymes have been described. The liver and muscle isozymes differ only in the first exon, sharing the other 13 exons (15). The heart type is encoded by another gene (35) that includes 12 successive exons which are similar to those of the liver/skeletal muscle gene, but the heart gene has different exons at ends of the gene. The novel form expressed in brain has kinetic constants for substrates and allosteric effectors which are similar to those of the other bifunctional enzymes, particularly those of the heart form (10, 31). It shares common basic properties of all mammalian PFK-2/FBPase-2 such as homodimeric structure and bifunctionality. It forms a phospholabeled intermediate when incubated with Fru-2,6-[2-³²P] P₂, which suggests a common catalytic mechanism for the bisphosphatase reaction (3). It also shares some common antigenic determinants since it cross-reacts with antisera raised against the liver isozyme. In addition, total RNA from brain strongly hybridized with a near-full-length cDNA probe from liver, giving a major band of 6.8 kb and a minor one of 4 kb (23). All these properties suggest that it is a closely related structure to the other PFK-2/FBPase-2 isozymes. However, protein sequencing from a CNBr-derived peptide revealed no sequence homology to any other known PFK-2/FBPase-2. This lack of homology is not due to species differences since the bovine liver and bovine heart sequences have

recently become available (14, 17), and they show no amino acid identity to the bovine brain CNBr sequence. In addition, the subunit molecular weight also is about twice that of all other mammalian PFK-2/FBPase-2s, including the form recently isolated from testis which has a molecular mass of 55 kDa and whose mRNA is 2 kb in size (13). A bifunctional enzyme from yeast, with a subunit molecular mass (93 kDa) of about twice that of mammalian forms, was recently cloned (36). This yeast enzyme has an analogous kinase/bisphosphatase domain structure to that found in the mammalian forms, but also has an additional extensive NH₂- and COOH-terminal sequence which has no homology to the mammalian forms. In addition, the active site phosphoacceptor (His-258 in the rat liver form) is a serine in the yeast enzyme, and this form is devoid of FBPase-2 activity (37). Recently, we have screened a bovine brain cDNA library with a human heart cDNA probe. A clone was isolated whose sequence revealed that the brain isozyme is encoded by a separate gene, which is different from those that encode the liver/skeletal muscle, heart, and testis forms, and which is specifically expressed in neural tissues.² Work is in progress to define the structural basis for the differences between the larger brain form and the smaller mammalian forms and to ascertain whether the 120-kDa brain isozyme is evolutionarily related to the 93-kDa yeast enzyme.

The concentration of Fru-2,6-P₂ in mammalian tissues is controlled by the relative activities of PFK-2 and FBPase-2. The kinase/bisphosphatase activity ratio is close to 3 for the brain enzyme when both activities are determined under *V*_{max} conditions. However, the bisphosphatase has a very high *K*_m for its substrate (70 μM) compared to that of the liver enzyme (0.1 μM). This fact suggests that under physiological conditions the high kinase/bisphosphatase ratio accounts for the high concentration of the bisphosphorylated metabolite found in brain (5 nmol/g) despite the low enzyme concentration (18, 21–23). In addition, the bisphosphatase would be expected to be inhibited *in vivo* by the concentrations of Fru-6-P normally found in brain (20 μM). Since Fru-6-P is also a substrate for the kinase and its cellular concentrations are close to the *K*_m value for PFK-2, it is reasonable to postulate that the steady state Fru-6-P level controls brain Fru-2,6-P₂ concentration. An increase of Fru-6-P would result in a parallel increase of Fru-2,6-P₂ by virtue of increased kinase activity as well as decreased bisphosphatase activity via noncompetitive product inhibitor (Table II). In contrast, any diminution of Fru-6-P concentration would result in lower levels of the bisphosphorylated metabolite, which would decrease the net glycolytic flux. This scenario is seen during brain ischaemia or hypoglycemia (21–23). These considerations do not apply to the other substrate of the kinase activity, since the *K*_m for ATP is substantially lower than the steady state tissue concentration of ATP (2–3 mM), so the enzyme would be fully saturated under normal conditions. Other regulatory metabolites such as glycerol 3-phosphate or phosphoenolpyruvate which act as allosteric effectors on liver PFK-2/FBPase-2 (1–3) have no effect on the brain enzyme (23 and results not shown). However, citrate has a reciprocal effect on both activities. Not only does it inhibit the kinase, but it also activates the bisphosphatase by decreasing the *K*_m for its substrate (2-fold activation at 5 μM Fru-2,6-P₂). Citrate, which is increased in diabetic animals (23, 38), may mediate the glucose sparing effect of ketone bodies on brain glycolysis by its effects on PFK-1 (39) and PFK-2 (present paper). When available, ketone body metabolism in brain increases citrate levels which

² F. Ventura, J. L. Rosa, S. Ambrosio, S. J. Pilkis, and R. Bartrons, manuscript in preparation.

Brain 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase

17943

inhibit directly brain PFK-1 and also decrease Fru-2,6-P₂ concentration.

Phosphorylation/dephosphorylation mechanisms that control the relative kinase/bisphosphatase activity ratio have been demonstrated for the liver isozyme (1-3). The brain enzyme was phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase but, unlike the heart and testis forms, it was not phosphorylated by protein kinase C (13, 31). In its phosphorylation pattern, the brain PFK-2/FBPase-2 is similar to the liver isozyme, even though the significance of its phosphorylation is unclear since the phosphorylated enzyme showed no changes in kinetic properties (23). Therefore, the control of PFK-2/FBPase-2 activities depends mainly on the changes of substrates and allosteric modulators. In addition, no changes in activity have been detected in several physiological conditions (21-23). Since the brain enzyme has only a single phosphorylation site, while its molecular weight is approximately double that of the other mammalian isozymes, it is unlikely that the brain enzyme arose via gene duplication. It is possible that an additional NH₂- or COOH-terminal sequence prevents the transmission of the phosphorylation site signal to the kinase and bisphosphatase domains. It seems reasonable to postulate that the brain isozyme has evolved to meet the metabolic exigencies of that tissue, that additional polypeptide sequence in this form ensures regulation of brain Fru-2,6-P₂ concentration by substrates and effectors of the enzyme, and that covalent modification induced-activity changes are inexpedient in this purely glycolytic tissue.

Acknowledgments—We thank A. Tauler, J. Rodrigues, J. Gil, M. Dalmau, R. El-Maghrabi, and A. Lange for their help and for many valuable suggestions during the course of this work. The skillful technical assistance of C. Ortuño and T. Fisher is also acknowledged.

REFERENCES

1. Van Schaftingen, E. (1987) *Adv. Enzymol.* **59**, 315-395
2. Hue, L., and Rider, M. H. (1987) *Biochem. J.* **245**, 313-324
3. Pilakis, S. J., and El-Maghrabi, M. R. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 755-783
4. Colosia, A. D., Marker, A. J., Lange, A. J., El-Maghrabi, M. R., Granner, D. K., Tauler, A., Pilakis, J., and Pilakis, S. J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18669-18677
5. Marker, A. J., Colosia, A. D., Tauler, A., Solomon, D. H., Cayre, Y., Lange, A. J., El-Maghrabi, M. R., and Pilakis, S. J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7000-7004
6. Wall, S. R., van den Hove, M. F., Crepin, K. M., Hue, L., and Rousseau, G. G. (1989) *FEBS Lett.* **257**, 211-214
7. Cifuentes, M. E., Espinet, C., Lange, A. J., Pilakis, S. J., and Hod, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1557-1563
8. Pilakis, S. J. (1991) *Annu. Rev. Nutr.* **11**, 465-515
9. Pilakis, S. J., and Granner, D. K. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885-909
10. Kitamura, K., and Uyeda, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9027-9033
11. Kitamura, K., Uyeda, K., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9799-9806
12. Sakata, J., and Uyeda, K. (1991) *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **180**, 470-474
13. Sakata, J., Abe, Y., and Uyeda, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15764-15770
14. Lange, A. J., El-Maghrabi, M. R., and Pilakis, S. J. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 258-263
15. Darville, M. I., Crepin, K. M., Hue, L., and Rousseau, G. G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6543-6547
16. Lemaigre, F. P., Durvieux, S. M., and Rousseau, G. G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1099-1106
17. Sakata, J., and Uyeda, K. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4951-4955
18. Pauwels, P. J., and Trouet, A. (1984) *Neurosci. Lett.* **46**, 173-177
19. Foe, L. G., and Kemp, R. G. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 726-730
20. Vora, S., Oskam, R., and Staal, G. E. J. (1985) *Biochem. J.* **229**, 333-341
21. Yamamoto, M., Hamasaki, N., Maruta, Y., and Tomonaga, M. (1990) *J. Neurochem.* **54**, 592-597
22. Ambrosio, S., Ventura, F., Rosa, J. L., and Bartrons, R. (1991) *J. Neurochem.* **57**, 200-203
23. Ventura, F., Rosa, J. L., Ambrosio, S., Gil, J., and Bartrons, R. (1991) *Biochem. J.* **276**, 455-460
24. Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E., and Hers, H. G. (1983) *Biochem. J.* **136**, 115-124
25. El-Maghrabi, M. R., Claus, T. H., Pilakis, J., Fox, E., and Pilakis, S. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7603-7607
26. Burnette, W. N. (1981) *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
27. El-Maghrabi, M. R., Correia, J. J., Heil, P. J., Pate, T. M., Cobb, C. E., and Pilakis, S. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 5005-5009
28. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
29. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
30. Rider, M. H., Foret, D., and Hue, L. (1985) *Biochem. J.* **231**, 193-196
31. Rider, M. H., and Hue, L. (1986) *Biochem. J.* **240**, 57-61
32. El-Maghrabi, M. R., Haston, W. S., Flockhart, D. A., Claus, T. H., and Pilakis, S. J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 668-675
33. Darville, M. I., Crepin, K. M., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Octave, J. N., Rider, M. H., Marchand, M. J., Hue, L., and Rousseau, G. G. (1987) *FEBS Lett.* **224**, 317-321
34. Lively, M. O., El-Maghrabi, M. R., Pilakis, J., D'Angelo, G., Colosia, A. D., Ciavola, J. A., Fraser, B. A., and Pilakis, S. J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 839-849
35. Darville, M. I., Chikri, M., Lebeau, E., Hue, L., and Rousseau, G. G. (1991) *FEBS Lett.* **288**, 91-94
36. Kretschmer, M., and Fraenkel, D. G. (1991) *Biochemistry* **30**, 10663-10672
37. Francois, J., Van Schaftingen, E., and Hers, H. G. (1986) *Eur. J. Biochem.* **171**, 599-608
38. Ruderman, N. B., Ross, P. S., Berger, M., and Goodman, M. N. (1974) *Biochem. J.* **138**, 1-10
39. Newsholme, E. A., Sudgen, P. H., and Williams, T. (1977) *Biochem. J.* **168**, 123-129

ABREVIATURES

PFK-1	6-fosfofructo 1-quinasa.
FBPasa-1	Fructosa 1,6-bisfosfatasa.
PFK-2	6-fosfofructo 2-quinasa.
FBPasa-2	Fructosa 2,6-bisfosfatasa.
HK	Hexoquinasa.
PP-1	Fosfoproteïna fosfatasa 1.
PKA	Proteïna quinasa depenent d'AMP cíclic.
PKC	Proteïna quinasa C.
Fru 2,6-P ₂	Fructosa 2, 6-bisfosfat.
Fru 1,6-P ₂	Fructosa 1,6-bisfosfat.
Glu 1,6-P ₂	Glucosa 1,6-bisfosfat.
Rib 1,5-P ₂	Ribosa 1,5-bisfosfat.
Fru 6-P	Fructosa 6-fosfat.
P _i	Fosfat.
PCr	Fosfocreatina.
Cr	Creatina.
GABA	Acid γ-aminobutíric.
Gli 3-P	Glicerol 3-fosfat.
PEG 6000	Poli(etilenglicol) 6000.
PET	Tomografia d'emissió de positrons.
S.E.M.	Desviació standard de la mitjana.
E-P	Intermedi enzimàtic fosforil.lat per incubació amb Fru 2,6-P ₂
Amortidor A	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 2 mM EGTA, 2 mM ditiotritol, 0.2 mM fluorur de fenilmetilsulfonil, 1 μM leupeptina, 1 μM pepstatina, 0.1 mM Fru 6-P, 0.3 mM glucosa 6-fosfat i 3% (pes/volum) PEG 6000.
Amortidor B	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM KCl, 2 mM ditiotritol, 0.2 mM fluorur de fenilmetilsulfonil, 1 μM leupeptina i 1 μM pepstatina.
Amortidor C	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 2 mM ditiotritol, 0.2 mM fluorur de fenilmetilsulfonil, 1 μM leupeptina, 1 μM pepstatina i 10% (volum/volum) glicerol.