



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Control del estado de fosforilación de la glucógeno sintasa de hepatocitos de rata

Joaquín Ariño Carmona

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

CONTROL DEL ESTADO DE
FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO
SINTASA DE HEPATOCITOS DE
RATA.

JOAQUIN ARIÑO CARMONA

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082922

Tesis presentada por el Licenciado
Joaquín Ariño Carmona para optar al grado de
Doctor en Farmacia.

Esta Tesis ha sido realizada bajo la
dirección del Profesor Joan Josep Guinovart
Cirera, en el Departamento de Bioquímica de la
Facultad de Farmacia de la Universidad de
Barcelona.

Enero de 1986

A mis padres y a Anna

La realización de este trabajo hubiera sido difícil, tal vez imposible, sin la ayuda de diferentes personas e instituciones. Por ello, quiero agradecer expresamente:

Al Dr. Joan J. Guinovart, bajo cuya dirección he realizado el presente trabajo. A su lado creo haber recibido los fundamentos de una sólida formación bioquímica e investigadora.

Al Dr. Fausto García Hegardt, Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, por el interés que ha demostrado por mi trabajo y por su acertada gestión al frente del Departamento.

A Anna Bassols, por innumerables razones.

A todos mis compañeros de laboratorio, muy especialmente a la Dra. Fátima Bosch, Dra. Angels Mor, Montserrat Arró, Dr. Jordi Vila, Dra. Isabel Vázquez, Dr. Carlos Ciudad y Dra. Anna Simó. Asimismo, al Dr. Joan Aguilar, Dra. Victoria Esser, Alberto Ferrer, Diego Haro y Pedro Marrero. Con todos ellos he compartido la vida en el laboratorio y de ellos he recibido amistad, ayuda y enseñanzas. Agradezco particularmente a Diego Haro su inestimable ayuda a la hora de realizar las determinaciones de viabilidad celular .

Al Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia y, en particular, a la Dra. Teresa Piñol por las facilidades que me han dado para el empleo del utillaje del Departamento.

A mis antiguos compañeros del Departamento de Química Orgánica y Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, especialmente al Dr. Mario Robiralta y a la Dra. Montserrat Moral, por todas las enseñanzas que recibí de ellos.

A la Fundación Agustí Pedro i Pons, por la ayuda recibida durante los primeros meses de este trabajo.

A la Obra Social de la Caja de Ahorros de Madrid, por el apoyo y la confianza que me han proporcionado durante los tres últimos años.

PRESENTACION

Uno de los tipos más interesantes de modificación covalente post-traducciona es la fosforilación de proteínas. Su importancia reside, esencialmente, en que afecta a numerosas vías metabólicas celulares, por lo general a través de los enzimas clave de las mismas.

El metabolismo del glucógeno proporciona un claro ejemplo de una vía metabólica que presenta este tipo de modificaciones. Diversos enzimas involucrados en esta vía metabólica son sustrato de diferentes proteína quinasas y proteína fosfatasas. Entre ellos, los dos enzimas clave de esta ruta: la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa.

La glucógeno sintasa es un caso particularmente interesante. Probablemente se trata de uno de los mejores ejemplos de un enzima sujeto a control por mecanismos de fosforilación múltiple. Es bien sabido que el enzima muscular puede ser fosforilado por diferentes proteína quinasas en distintos lugares de la molécula. Más recientemente se han obtenido las mismas evidencias para el enzima hepático. En casi todos los casos conocidos la fosforilación del enzima implica su inactivación.

Por otra parte, el estado de activación de la glucógeno sintasa muscular y hepática puede ser alterado "in vivo" por una serie de efectores. Así, ciertas hormonas

glucogenolíticas son capaces de inactivar al enzima.

El conjunto de datos referentes a la inactivación del enzima por fosforilación covalente, unidos a los efectos hormonales observados sobre su estado de actividad, condujeron a la hipótesis de que, en la célula, el estado de activación de la glucógeno sintasa debía estar controlado, al menos parcialmente, a través del estado de fosforilación del enzima. Este hecho ha sido comprobado experimentalmente en los últimos años en lo que se refiere al enzima muscular, tanto esquelético como cardíaco.

Los conocimientos acerca del enzima hepático son, sin embargo, notablemente más reducidos. Como es sabido, existen diferencias entre el hígado y el músculo en lo que afecta al metabolismo del polisacárido y estas diferencias no solamente residen en el destino de la glucosa, el producto de su degradación. Por lo tanto, cualquier extrapolación de los conocimientos existentes sobre el enzima muscular al caso del enzima hepático no deja de ser peligrosa. De hecho, en el momento de iniciar nuestro trabajo, no existía evidencia directa alguna de que el enzima hepático se encontrara fosforilado "in vivo".

Así pues, los objetivos básicos de nuestro proyecto fueron:

- a) Averiguar si la glucógeno sintasa hepática, en su estado basal de actividad, se encuentra fosforilada e identificar los posibles centros de fosforilación existentes.
- b) Establecer la correlación que pudiera existir entre los cambios en el estado de activación inducidos por diferentes efectores y el estado de fosforilación del enzima.
- c) Investigar la especificidad de los cambios producidos en el estado de fosforilación del enzima por alguno de estos efectores, a nivel de sus centros de fosforilación.

Para llevar a cabo este proyecto se escogió como material de estudio el enzima de hepatocitos aislados de rata, que fue marcado mediante incubación de las células con fosfato radioactivo y aislado específicamente empleando anticuerpos desarrollados contra la propia proteína purificada a partir de hígado de rata.

ABREVIATURAS MAS COMUNES EMPLEADAS EN ESTA OBRA

AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
¹⁴ C	Carbono 14
Ci, mCi, μ Ci	Curio, milicurio, microcurio
c.p.m.	Cuentas por minuto
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Etilendiaminotetracetato
EGTA	Etilenglicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N',- tetracetato
xg	Fuerza centrífuga relativa (Gravedades)
IP	Mio-inositol-1,4,5-trisfosfato
³ G-1P	Glucosa-1-fosfato
G-6P	Glucosa-6-fosfato
M, mM, μ M	Molar, milimolar, micromolar
mA	miliamperios
nm	nanometros
⁺ NADP	Nicotinamidoadenin dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamidoadenin dinucleótido fosfato reducido
³² P	Fósforo 32
PDD	12,13-didecanoil forbol

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPO	2,5-difeniloxazol
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TPA	12-tetradecanoil-13-acetil forbol
TPCK	L-1-tosilamido-2-feniletilclorometilcetona
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
UDPG	Uridindifosfoglucosa
Vmax	Velocidad máxima

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 LA FOSFORILACION DE PROTEINAS Y EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD CELULAR	1
1.2 VISION GENERAL DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO	4
1.3 GLUCOGENO SINTASA HEPATICA	14
1.3.1 Regulación de la actividad glucógeno sintasa	15
1.3.2 Características de la glucógeno sintasa	19
1.3.3 Fosforilación e interconversión de la glucógeno sintasa hepática	24
1.3.4 Proteína fosfatasas	33
1.3.5 Fosforilación y propiedades cinéticas de la glucógeno sintasa	41
1.4 GLUCOGENO FOSFORILASA	44
1.5 PROTEINA QUINASAS	48
1.5.1 Proteína quinasas dependientes de AMP cíclico	48
1.5.2 Proteína quinasas dependientes de calcio	51
1.5.3 Proteína quinasas independientes de AMP cíclico y calcio	56

1.6	LA REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO HEPATICO POR SEÑALES EXTRACELULARES	62
1.6.1	Efectores que actuan vía AMP cíclico	64
1.6.2	Efectores que actuan vía calcio	68
1.6.3	Insulina	76
1.6.4	Efecto de los iones inorgánicos litio y vanadato	79
1.6.5	Esteres de forbol y compuestos relacionados	85
2.	MATERIALES Y METODOS	93
2.1	ANIMALES EMPLEADOS	93
2.2	PURIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTASA HEPATICA	94
2.2.1	Obtención del sedimento de glucógeno	95
2.2.2	Cromatografía en DEAE-celulosa	96
2.2.3	Cromatografía de afinidad	97
2.2.4	Concentración y diálisis	98

2.3	OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-GLUCOGENO SINTASA DE HIGADO DE RATA	99
2.3.1	Obtención del antisuero	99
2.3.2	Purificación de la fracción de globulinas del antisuero	101
2.4	CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI- GLUCOGENO SINTASA	102
2.4.1	Doble difusión en agar	102
2.4.2	Inmunoelectroforesis según Laurell	103
2.4.3	Titulación del antisuero	104
2.5	PREPARACION DE LAS PROTEINA QUINASAS EMPLEADAS	106
2.6	FOSFORILACION "IN VITRO" DE LA GLUCOGENO SINTASA	107
2.7	OBTENCION DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA	108
2.8	INCUBACIONES CELULARES	115
2.8.1	Características generales de las incubaciones	115
2.8.2	Preincubación de las células con ³² [P]fosfato	116
2.8.3	Incubación con efectores	116
2.9	TECNICAS DETERMINATIVAS	117
2.9.1	Determinación de la actividad glucógeno sintasa	117

2.9.2	Determinación del estado de activación de la glucógeno sintasa	119
2.9.3	Determinación de la actividad glucógeno fosforilasa	120
2.9.4	Determinación de la concentración intracelular de ATP	121
2.9.5	Determinación de la actividad específica del [γ - ³² P]ATP intracelular	123
2.9.6	Determinación de proteína	125
2.10	TECNICAS ELECTROFORETICAS Y AUTORRADIOGRAFICAS	126
2.10.1	Electroforesis en geles de poli-acrilamida en presencia de SDS	126
2.10.2	Electroforesis en gradiente lineal de poliacrilamida	130
2.10.3	Electroforesis de alto voltaje en capa fina	131
2.10.4	Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida	132
2.10.5	Técnicas autorradiográficas y densitométricas	135
2.11	FRAGMENTACION DE LA GLUCOGENO SINTASA	136
2.11.1	Fragmentación con bromuro de cianógeno	136
2.11.2	Fragmentación con tripsina	137

2.11.3 Hidrólisis parcial de la glucógeno sintasa	139
2.12 SINTESIS DE REACTIVOS Y MATERIALES	141
2.12.1 Síntesis de Sepharose-glucosamina- 6-fosfato	141
2.12.2 Síntesis de [γ - ³² P]ATP	143
2.12.3 Síntesis de UDP-[U- ¹⁴ C]glucosa	143
2.13 REACTIVOS Y PRODUCTOS UTILIZADOS	144
3. RESULTADOS	148
3.1 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-GLUCOGENO SINTASA HEPATICA	148
3.1.1 Purificación de la glucógeno sintasa hepática	148
3.1.2 Obtención y caracterización de las preparaciones de anticuerpos	150
3.2 AISLAMIENTO DE LA GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS INCUBADOS CON [³² P]FOSFATO	162
3.2.1 Caracterización de las preparaciones celulares	162
3.2.2 Incubación de las células con ³² [P]fosfato	164
3.2.3 Aislamiento y caracterización de la glucógeno sintasa	168

3.3	ESTUDIO DEL PATRON DE FOSFORILACION DE PROTEINAS CITOPLASMATICAS EN HEPATOCITOS DE RATA. IDENTIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTASA	177
3.4	OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE INMUNOPRECIPITACION	182
3.4.1	Estudio del tiempo de incubación de los hepatocitos con [³² P]fosfato	182
3.4.2	Optimización de la reacción de inmunoprecipitación	183
3.4.3	Efecto del glucógeno	187
3.5	FRAGMENTACION DE LA GLUCOGENO SINTASA	189
3.5.1	Fragmentacion con bromuro de cianógeno	190
3.5.2	Fragmentación con tripsina	195
3.5.3	Degradación triptica de los fragmentos de bromuro de cianógeno	201
3.6	INCIDENCIA DE DIFERENTES EFECTORES EN LA ACTIVIDAD Y EL ESTADO DE FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA	205
3.6.1	Glucagon	207
3.6.2	Adrenalina	209
3.6.3	Vasopresina, Angiotensina II y Oxitocina	212
3.6.4	Ionóforo A23187	218
3.6.5	Vanadato y Litio	220

3.6.6	Esteres de forbol y mezereína	225
3.7	ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS	236
3.7.1	Análisis de fosfoaminoácidos de la glucógeno sintasa de hepatocitos	238
3.7.2	Análisis de fosfoaminoácidos de la glucógeno sintasa fosforilada "in vitro" por diferentes proteína quinasas	242
4.	DISCUSION	246
4.1	APROXIMACION EXPERIMENTAL AL ESTUDIO DEL CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR FOSFORILACION COVALENTE	249
4.2	EVIDENCIAS DE LA FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA EN HEPATOCITOS DE RATA	255
4.3	INACTIVACION Y FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA EN HEPATOCITOS DE RATA	260
4.4	LA FOSFORILACION EN TREONINAS DE LA GLUCOGENO SINTASA HEPATICA	274
5.	CONCLUSIONES	278
6.	BIBLIOGRAFIA	284

1. INTRODUCCION

1. LA FOSFORILACION DE PROTEINAS Y EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD CELULAR

La modificación covalente de proteínas es uno de los mecanismos que regulan los procesos celulares. En particular la fosforilación de proteínas ha demostrado ser una de las formas mediante las cuales pueden ser controladas un gran número de vías metabólicas en las células eucarióticas (1).

En organismos superiores los procesos de fosforilación de proteínas afectan al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Muy diversos enzimas son regulados "in vitro" por diferentes proteína quinasas de tal manera que su fosforilación conlleva una alteración de la actividad enzimática. En no pocos sistemas se ha establecido el carácter fisiológico de este fenómeno y su dependencia de efectores extracelulares. Tal es el caso de la activación de la triglicérido lipasa (2) y la inactivación de la glicerol fosfato aciltransferasa (3) provocadas por la adrenalina, lo que sugiere un mecanismo de coordinación para la degradación y síntesis, respectivamente, de los triglicéridos en el tejido adiposo en respuesta a la hormona. La inactivación de la piruvato quinasa (4) o la activación de la fenilalanina hidroxilasa (5) constituyen otros dos ejemplos de como la fosforilación de un enzima puede variar sus propiedades cinéticas y controlar así una vía metabólica.

Las reacciones de fosforilación inciden también en otros tipos de mecanismos. Por ejemplo, algunos de los fenómenos que forman parte del proceso de la contracción muscular están gobernados por la acción de proteína quinasas. Así, el ensamblaje de los filamentos de miosina requiere la intervención de la llamada quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), una proteína quinasa dependiente de calmodulina y calcio (5).

Las reacciones de fosforilación afectan, asimismo, a diferentes tipos de receptores celulares. En 1982, Kasuga y col. (6-8) demostraron en células intactas que el receptor de la insulina puede sufrir autofosforilación en residuos de tirosina y que su grado de fosforilación es regulado por la propia insulina. Otro ejemplo similar lo proporciona el receptor de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) cuyo nivel de fosforilación puede ser controlado por los propios factores de crecimiento (9), factores de transformación (TGF) o inductores de tumores (10-12).

Sin embargo, el sistema metabólico en el que los procesos de fosforilación reversible de proteínas encuentran un máximo exponente es el del metabolismo del glucógeno. Su importancia estriba, por una parte, en razones históricas, puesto que fué el primer sistema descubierto cuyo control se fundamentaba en este tipo de modificaciones. En este sentido, los trabajos de Krebs, Fischer y Larner en el período 1955-1970 fueron decisivos y, en realidad, hasta muy avanzada la década de los sesenta los únicos ejemplos de enzimas

interconvertibles por fosforilación y defosforilación los proporcionaba el metabolismo del glucógeno.

Por otra parte, la regulación del metabolismo del glucógeno por procesos de fosforilación covalente sobresale por su complejidad. Muchos de los enzimas involucrados en esta vía metabólica son controlados por fosforilación y por este mismo sistema pueden, a su vez, modificar otras actividades relacionadas. De esta manera, un complejo sistema de proteína quinasas, proteína fosfatasas y reguladores proteicos juega un papel, no bien conocido aún, en el control de los dos enzimas clave de la síntesis y la degradación del polisacárido: la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa.

Las páginas siguientes tratarán de los componentes de este sistema metabólico, de su interrelación y del papel que juegan en respuesta a estímulos extracelulares.

1.2 VISION GENERAL DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO

El glucógeno es un polisacárido altamente ramificado compuesto por moléculas de α -D-glucosa. Los monómeros están unidos entre sí por enlaces glucosídicos del tipo $\alpha(1\rightarrow4)$, excepto en los puntos de ramificación en los que se encuentran enlaces del tipo $\alpha(1\rightarrow6)$.

La estructura del glucógeno corresponde a la de un producto de reserva energética y constituye la forma en que las células animales almacenan la glucosa. Por su alto peso molecular influye en mucha menor medida en la presión osmótica celular que la correspondiente cantidad de hexosa libre y su estructura ramificada confiere solubilidad a la molécula.

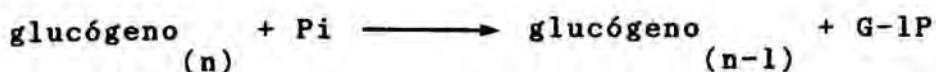
El glucógeno es prácticamente ubicuo en todos los tejidos animales y su localización es predominantemente citoplasmática. Se agrupan en gránulos de notable tamaño cuyo peso molecular supera los 100 millones de daltons. Asociados a estos gránulos se encuentran los enzimas responsables de la síntesis y la degradación del polisacárido.

La cantidad de glucógeno presente en las células animales depende fundamentalmente del tipo de tejido y de las condiciones fisiológicas y patológicas del mismo. Desde un

punto de vista cuantitativo, el tejido muscular esquelético y el hígado contienen la mayor parte del glucógeno, siendo el órgano hepático el lugar donde su concentración es mayor. No obstante, el contenido de glucógeno en el hígado puede variar notablemente. En un animal bien alimentado, el polisacárido puede representar más del 6% del peso del órgano, pero este valor se reduce notablemente en los períodos interpandriales. Así, en la rata, tras un ayuno de 24 horas la cantidad de glucógeno hepático puede reducirse hasta un 0,1% del peso total del hígado.

En la mayoría de tejidos, incluyendo el tejido muscular esquelético, el glucógeno tiene una función de reserva limitada de glucosa que, una vez movilizada, es utilizada exclusivamente por la célula que la contiene. En cambio, el sentido fisiológico del almacenamiento del glucógeno en el hígado es diferente. El glucógeno contenido en el hígado es una reserva de glucosa con destino al resto del organismo. De hecho, el hígado la aprovecha escasamente (13,14) y la glucosa liberada sirve para mantener los niveles de glucemia en los períodos no absortivos. Esto es posible desde el momento en que el hígado, a diferencia del músculo, posee una actividad glucosa-6-fosfatasa, capaz de producir moléculas de glucosa que tienen libre acceso al sistema circulatorio.

La degradación de la molécula de glucógeno da lugar a la formación de glucosa-1-fosfato, mediante una reacción cercana al equilibrio que está catalizada por el enzima glucógeno fosforilasa.



La glucógeno fosforilasa fue el primer enzima del metabolismo del glucógeno descubierto. En 1937 se observó su capacidad para degradar glucógeno (15) y, dos años después, la propiedad de sintetizar el polisacárido "in vitro" (16). La actividad degradativa del enzima implica la separación fosforolítica de residuos glucosílicos terminales del glucógeno. El enzima, no obstante, es incapaz de eliminar los residuos unidos cuando estos se encuentran a menos de 4 eslabones de un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$.

Por ello, la degradación completa de la molécula requiere la intervención de dos actividades complementarias, asignadas al denominado enzima desramificante (amilo- α -1,6-glucosidasa). La primera de ellas transfiere una cadena de tres residuos desde una de las cadenas en curso de degradación al extremo de otra. Debido a ello, la cadena receptora puede ser en cualquier caso susceptible a la acción de la fosforilasa, mientras que la cadena donadora queda reducida a un residuo glucosílico unido por un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. Este enlace es objeto de la actividad hidrolítica del enzima desramificante, liberando en este caso una molécula de glucosa.

Por lo tanto, la acción conjunta de la fosforilasa y el enzima desramificante da lugar a que las moléculas de glucosa

que forman el glucógeno aparezcan como glucosa-1-fosfato, excepto las correspondientes a los puntos de ramificación, que lo hacen como glucosa libre.

La evidencia de que la glucógeno fosforilasa era capaz de catalizar tanto la reacción de degradación del glucógeno como su síntesis a partir de glucosa-1-fosfato, condujo a la creencia generalizada de que el enzima era responsable "in vivo" de ambos procesos. Esta idea fue definitivamente desterrada a raíz de que en 1957, Leloir y Cardini (17) descubrieron en extractos de hígado una actividad enzimática capaz de sintetizar glucógeno a partir de una forma activada de la glucosa, la uridin difosfoglucosa (UDPG). El enzima responsable de esta actividad se denomina uridin difosfoglucosa- α -1,4-glucan-4-glucosil transferasa y se conoce generalmente con el nombre de glucógeno sintasa (E.C. 2.4.1.11).

La glucosa puede ser transformada en la célula en UDP-glucosa a través de una serie de reacciones. En el caso del hígado, el primer paso es la fosforilación del azúcar, catalizada por la glucoquinasa para dar glucosa-6-fosfato. Por mediación de la fosfoglucomutasa, la glucosa-6-fosfato es transformada en glucosa-1-fosfato y esta es capaz de reaccionar con el uridin trifosfato (UTP) para generar UDP-glucosa y pirofosfato. Esta reacción está catalizada por la UDP-pirofosforilasa. El pirofosfato es hidrolizado a continuación, mecanismo por el cual la reacción transcurre en el sentido de la síntesis de UDP-glucosa.

La glucógeno sintasa transfiere los residuos glucosílicos de la UDP-glucosa al extremo de las ramificaciones de la molécula de glucógeno, catalizando la formación de un enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ y liberando una molécula de UDP cuya transformación en UTP se realiza a expensas de una molécula de ATP. La repetición de este proceso da lugar a largas cadenas lineales de glucosa. La ramificación del polímero se debe a la actividad del enzima ramificante (una glucosil-4:6-transferasa), el cual transfiere una cadena de 5-9 residuos de glucosa a un punto alejado al menos 4 residuos de una ramificación pre-existente. El enlace formado en este caso es del tipo $\alpha(1\rightarrow6)$. La ramificación del polímero no sólo incrementa su solubilidad sino que genera un mayor número de puntos accesibles a la acción de la glucógeno fosforilasa.

Las reacciones de síntesis y degradación de glucógeno funcionando simultáneamente no conducirían más que a la hidrólisis de ATP. Lógicamente, ambas vías deben ser reguladas con el fin de que no den lugar a un ciclo fútil y esta regulación tiene lugar, precisamente, sobre las actividades de la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa. Esto sucede, en general, de manera que la activación de uno de los enzimas se corresponda con la inactivación del otro.

La actividad de muchos enzimas puede ser controlada por efectores alostéricos y por modificación covalente a través

de procesos de fosforilación y defosforilación. La fosforilación implica la transferencia de un grupo fosforilo a la molécula del enzima a partir de un nucleósido trifosfato (generalmente ATP o GTP), en reacción catalizada por una proteína quinasa. La hidrólisis de los residuos fosforilo es catalizada por proteína fosfatasas.

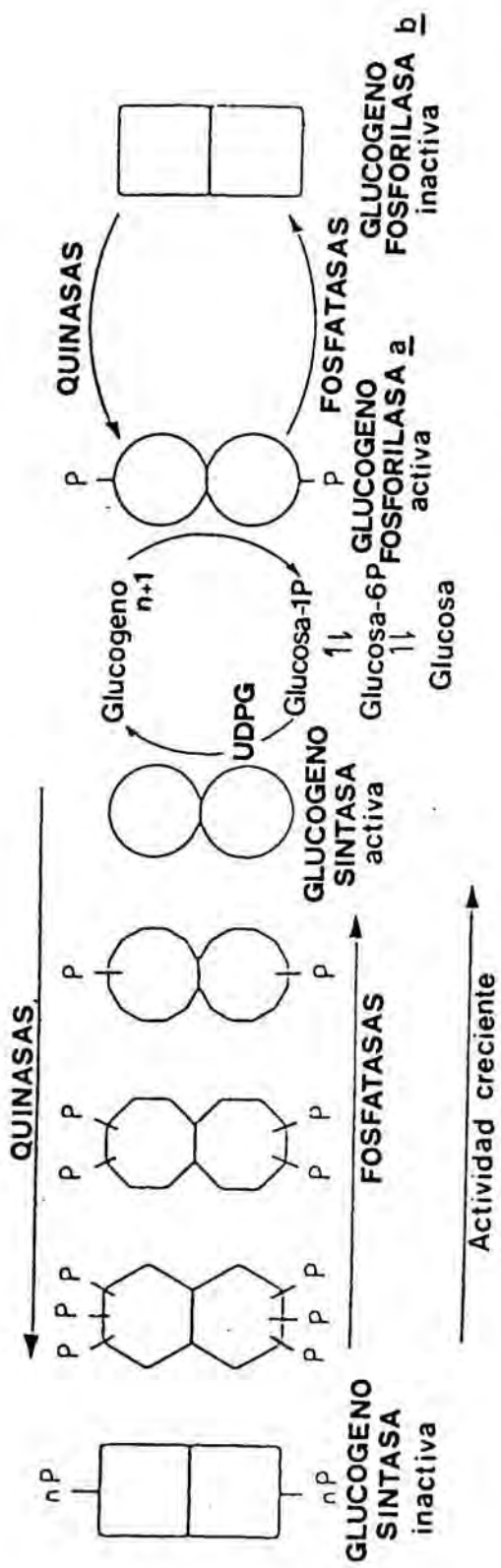
Las formas de la glucógeno sintasa activas fisiológicamente son las menos fosforiladas, mientras que la fosforilación conduce a la forma activa de la fosforilasa. Así, los procesos de fosforilación dan lugar a la degradación del glucógeno y la defosforilación de ambos enzimas tiene como resultado la síntesis del polisacárido, merced a la activación de la sintasa y la inactivación de la fosforilasa (Esquema I).

Hasta el momento tan sólo se conoce una proteína quinasa capaz de fosforilar a la fosforilasa: la fosforilasa quinasa (18,19). Por el contrario, se han descrito y caracterizado varias proteína quinasas con actividad glucógeno sintasa quinasa. En lo que respecta al enzima hepático, pueden incluirse tanto la propia fosforilasa quinasa (20-22), la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (20, 22-26), la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina (20-22), diversas proteína quinasas independientes de calcio y AMP cíclico (20, 22-28) y la proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos, también llamada proteína quinasa C (22,29,30).

ESQUEMA I

**REGULACION POR FOSFORILACION Y DEFOSFORILACION DE LA
GLUCOGENO SINTASA Y LA GLUCOGENO FOSFORILASA**

Actividad decreciente



Numerosos efectores son capaces de variar el estado de activación tanto de la glucógeno sintasa como de la glucógeno fosforilasa, incidiendo por tanto en la vía glucogenolítica y en la de síntesis del polisacárido (Esquema II). Así, por ejemplo, es sabido que la adrenalina en el músculo y el glucagon y los efectores β -adrenérgicos en el hígado dan lugar a un incremento en los niveles de AMP cíclico y a la consiguiente activación de la proteína quinasa dependiente del nucleótido. Esta activación, de manera más o menos directa, tendría como resultado la inactivación de la glucógeno sintasa y la activación de la glucógeno fosforilasa, desencadenando así el proceso glucogenolítico observado tras la interacción de estos efectores con sus receptores celulares.

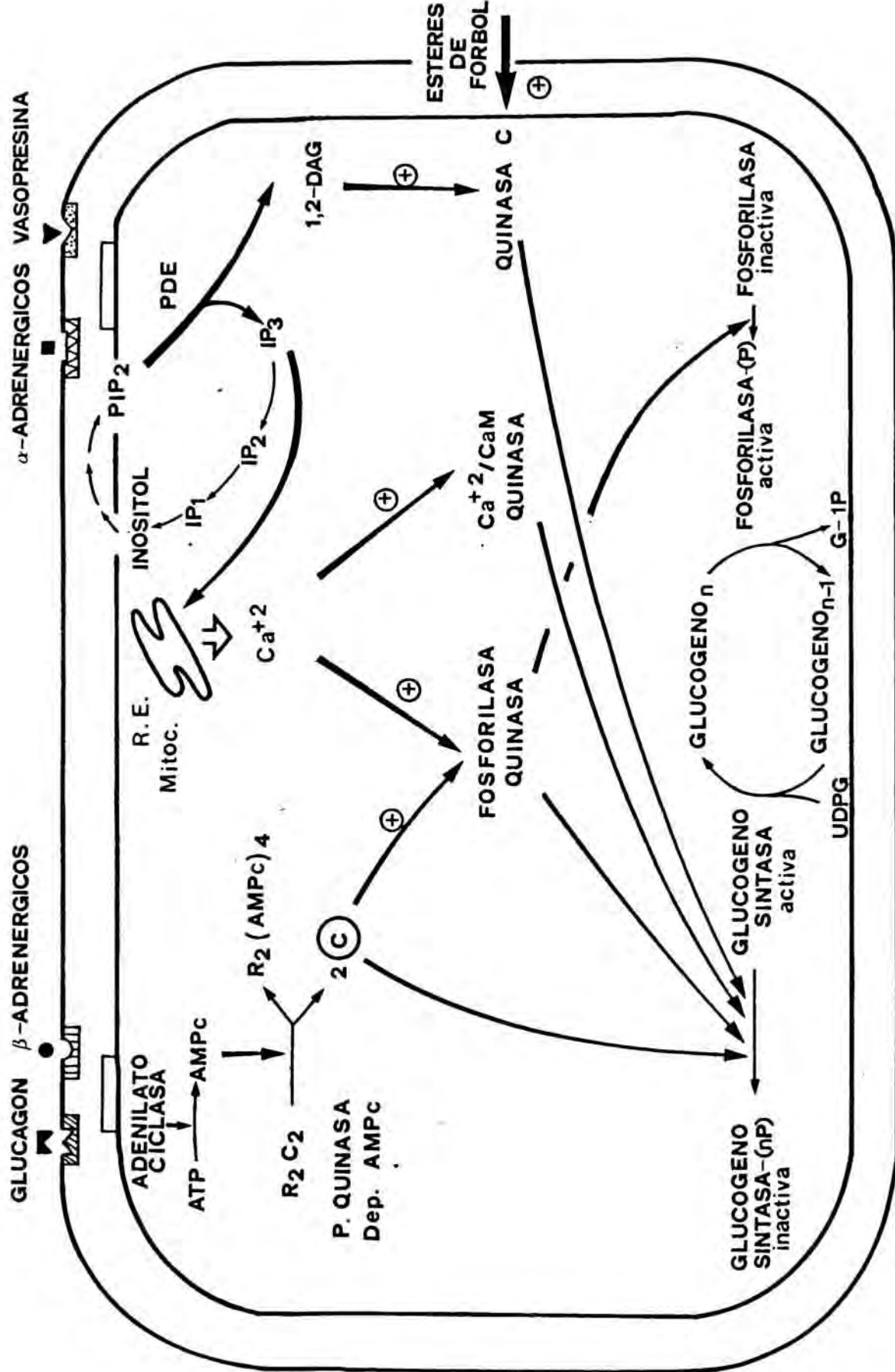
Este esquema incluye una serie de reacciones en cascada que ofrecen la posibilidad de amplificar el efecto producido por la llegada de la hormona a la superficie celular, así como de multiplicar los posibles puntos de control (31).

La idea de que las variaciones en los niveles de AMPc eran suficientes para explicar los procesos glucogenolíticos inducidos por hormonas se mantuvo durante varios años, hasta que nuevas evidencias obligaron a replantear la cuestión. En este sentido cabe resaltar las observaciones de Exton y col. (32,33) sobre la activación de la glucogenolisis hepática por adrenalina y efectores α -adrenérgicos, fenómeno que sucede de manera independiente de las variaciones de AMPc. Este hecho puede hacerse extensivo a hormonas polipeptídicas como la

ESQUEMA 2 VISION GENERAL DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO

Las abreviaturas empleadas son:

Ca^{+2} /CaM quinasa, proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina. PDE, fosfodiesterasa (fosfolipasa C). 1,2- DAG, 1,2-diacilglicerol. IP_3 , inositoltrisfosfato. IP_2 , inositolbisfosfato. IP_1 , inositolmonofosfato. PIP_2 fosfatidilinositol, 4,5-bisfosfato.



vasopresina, angiotensina II y oxitocina. Las actuales evidencias parecen indicar que estos efectores producen un incremento en la concentración de calcio citoplasmático (32-35), el cual podría poner en marcha el sistema de proteína quinasas dependientes del citado catión y que tienen por sustrato a la glucógeno sintasa y a la glucógeno fosforilasa.

Recientemente se ha conseguido relacionar la acción de vasopresina y adrenalina en hígado con el proceso de movilización del calcio. La teoría establecida se fundamenta en que la interacción de la hormona con su receptor provoca la activación de la fosfolipasa C, un enzima con actividad fosfoinositol fosfodiesterasa. Este fenómeno da lugar a la aparición de mio-inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃). Este compuesto, producto de la degradación del fosfatidilinositol, actuando a nivel del retículo endoplasmático y mitocondrias da lugar a la movilización de calcio (36,37).

El proceso de degradación de los fosfatidilinositoles de membrana, el cual ha recibido especial atención en los últimos tiempos, ofrece la particularidad de producir dos compuestos con actividad biológica. Uno de ellos es el IP₃, ya comentado. El otro responde a la estructura de 1,2-diacilglicerol, parece ser un activador fisiológico de la proteína quinasa C y es generado de manera transitoria en la membrana en respuesta a ciertos estímulos (38,39). La activación de la proteína quinasa C da lugar a numerosos sucesos celulares y, en particular, se han descrito procesos de sinergismo con el calcio capaces de desencadenar

glucogenolisis hepática (40-42).

En contraposición a los efectores descritos, capaces de inactivar a la glucógeno sintasa y dar lugar a glucogenolisis, la insulina, a través de mecanismos aún no esclarecidos, es capaz de activar a la sintasa hepática (43). Esta activación podría tener lugar no sólo por interferencia en el mecanismo dependiente de AMPc, toda vez que la insulina es capaz de inactivar a la proteína quinasa dependiente del nucleótido (44), sino también ejecutando algún tipo de acción sobre el mecanismo dependiente de calcio, como indican las evidencias de que la hormona es capaz de contrarrestar los efectos de agonistas α -adrenérgicos sobre la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa (45-46).

1.3 GLUCOGENO SINTASA HEPATICA

La glucógeno sintasa es un enzima capaz de catalizar la formación de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ glucosílicos entre el extremo de una cadena de glucógeno y residuos glucosílicos que, de esta manera, son incorporados a la estructura del polisacárido. El donador de residuos glucosílicos es la UDP-glucosa y la reacción transcurre según la reacción:



de una manera fisiológicamente irreversible. El mecanismo de

acción del enzima hepático sigue un modelo secuencial al azar de tipo bi bi (47).

El descubrimiento, precisamente en extractos hepáticos, de una actividad enzimática capaz de sintetizar glucógeno a partir de UDP-glucosa (17), significó el abandono de las ideas existentes sobre el papel de la fosforilasa en la síntesis de glucógeno. En el mismo informe, los autores indicaban la capacidad de polímeros de glucosa, como el glucógeno o el almidón, para servir de sustrato al enzima. Esta condición no era compartida, en cambio, por azúcares sencillos como glucosa o maltosa. Realmente parece ser el propio glucógeno el sustrato fisiológico del enzima puesto que, aunque desde el punto de vista mecanístico la glucógeno sintasa puede sintetizar el polímero actuando sobre glucosa como primer aceptor (48), la reacción de síntesis de di-, tri- y tetrosas está mucho menos favorecida que la de alargamiento de las cadenas poliméricas pre-existentes.

1.3.1 REGULACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTASA

1.3.1.1 Formas de la glucógeno sintasa

La regulación de la actividad glucógeno sintasa viene determinada, por una parte, por la capacidad del enzima para sufrir interconversión entre diferentes estados de fosforilación que presentan distintas propiedades cinéticas. Por otro lado, la actividad enzimática puede ser modulada por

diferentes efectores metabólicos. Ambos procesos están interconectados, de manera que la incidencia de los citados efectores es más o menos importante dependiendo del estado de fosforilación en que se encuentre el enzima.

La existencia de formas del enzima cinéticamente diferentes (49) se estableció a partir de estudios previos sobre el efecto de la insulina en el músculo esquelético (50). Al poco tiempo, la glucógeno sintasa fue aislada en dos formas que presentaban diferencias cinéticas y de contenido en fosfato unido covalentemente (51). A partir de aquí se estableció el concepto de una forma enzimática fosforilada, que fue denominada forma "D" (en atención a que "dependía" de la presencia del efector alostérico glucosa-6-fosfato para ser activa) y otra forma, llamada glucógeno sintasa "I", activa incluso en ausencia del efector. La forma "I" se consideró fisiológicamente activa, mientras que se estimó que la forma "D" no era activa "in vivo" (52).

En base a ello, el estado de activación de la glucógeno sintasa suele caracterizarse por la relación entre la actividad enzimática estimada en ausencia de glucosa-6-fosfato y la determinada en presencia de altas concentraciones del efector. Esta relación, expresada como un porcentaje, es conocida como "porcentaje de forma I".

Sin embargo, esta concepción es excesivamente simplista. Como se ha comentado anteriormente, la glucógeno sintasa puede ser fosforilada por diversas proteína quinasas en

distintos lugares de la molécula. Ello implica que el enzima puede existir en diversos estados de fosforilación y, por lo tanto, la expresión forma "D" o forma "I" sólo puede aplicarse a formas teóricamente extremas de fosforilación o defosforilación. Debe tenerse en cuenta que, según Roach y Larner (53), el porcentaje de forma "I" no debe ser tomado como una expresión de la fracción molar de forma "I".

Más recientemente, Tan (54,55) ha descrito que en extractos de hígado la conversión de sintasa "D" a forma "I" implica la aparición de una forma enzimática (que denomina "R") cuya actividad no puede ser explicada por la existencia de mezclas de formas "D" e "I".

Como consecuencia de todo ello el problema de la nomenclatura de las múltiples formas del enzima carece de la adecuada solución por el momento. Mientras tanto, la mayoría de los investigadores emplean la relación de actividades en presencia o en ausencia de glucosa-6-fosfato como una manera de caracterizar el estado de activación de una población enzimática.

1.3.1.2 Regulación alostérica de la glucógeno sintasa

La glucosa-6-fosfato es, probablemente, el efector más importante de la glucógeno sintasa tanto hepática como de otros tejidos. Provoca una disminución de la $S_{0,5}$ para la

UDP-glucosa sin afectar apenas a la velocidad máxima (56). Algunos nucleósidos fosfato, como el ATP, ADP, AMP y UDP, son capaces de inhibir al enzima y esta capacidad crece conforme aumenta el grado de fosforilación de la glucógeno sintasa (57). Este efecto inhibitor es contrarrestado por la glucosa-6-fosfato. El efecto del fosfato inorgánico es, según Mersman y Segal (58), el de activar la forma defosforilada del enzima, manteniendo inactivas las formas más fosforiladas.

El ión magnesio es un activador de la glucógeno sintasa, al menos en músculo esquelético y la cuantía de esta activación varía con el estado de fosforilación del enzima. Las formas más fosforiladas son las más sensibles al efecto del catión. Esta característica es compartida por el manganeso. El anión sulfato es capaz de mimetizar el efecto del fosfato sobre las diferentes formas de la glucógeno sintasa (59).

Muy recientemente Harvestick y Gold (60) han identificado y purificado parcialmente a partir de hígado de rata un factor proteico termosensible capaz de activar a la glucógeno sintasa. Este factor tiene actividad fosfatasa pero no produce la interconversión de la glucógeno sintasa de la forma "D" a la "I". El factor carece de actividad proteasa, es activable por manganeso o magnesio e inhibible por calcio.

1.3.2 CARACTERISTICAS DE LA GLUCOGENO SINTASA

La glucógeno sintasa ha sido purificada y caracterizada a partir de diferentes tejidos de mamíferos, tales como el músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo, riñón, placenta (61), así como a partir de levadura (62,63). Asimismo, ha sido obtenida a partir de hígado de rata (22-24, 26,47,64-66) y de conejo (27,67,68).

El peso molecular de la subunidad enzimática es de 85-90000 daltons, en el caso del hígado de rata. El enzima es extraordinariamente susceptible al ataque por proteasas durante el proceso de purificación. Debido a ello, los intentos iniciales de purificación (y aún algunos relativamente recientes) proporcionaban un enzima cuya subunidad mostraba un peso molecular inferior, cifrado en 77-80000 daltons (47,69). En general, el empleo de inhibidores de proteasas, fundamentalmente durante las primeras etapas de la purificación, permite obtener las formas de mayor peso molecular. Es de resaltar el hecho de que la movilidad electroforética de la subunidad puede ser afectada ligeramente en función del grado de fosforilación del enzima (27).

El peso molecular del oligómero ha sido cifrado por algunos autores en 260 Kd (66) y 170 Kd (47) en el caso del enzima fosforilado correspondiendo a trímeros y dímeros respectivamente. Las formas más defosforiladas presentan un

peso molecular de 180 Kd (47) o 156-171 Kd (23). Más recientemente, Bahnak y Gold (70) han determinado valores de 160-190 Kd tanto para formas activas como inactivas de la glucógeno sintasa, indicando que estos valores se incrementan hasta pesos moleculares de 200-250 Kd cuando el enzima es purificado en presencia de inhibidores de proteasas.

Muy recientemente diversos autores han aislado el enzima, mediante el empleo de anticuerpos específicos, a partir de hepatocitos de rata (71-74) o conejo (75) preincubados con [³²P]fosfato. El análisis electroforético del enzima aislado ha permitido asignarle un peso molecular de 88 kd (71-73) o 90 Kd (74,75) por subunidad. Todos ellos coinciden en la aparición de proteínas inmunorreactivas (entre 73 y 80 Kd) cuando el aislamiento se realiza en ausencia de inhibidores de proteasas.

El empleo de anticuerpos específicos ha permitido identificar moléculas inmunorreactivas a partir de sistemas de traducción "in vitro" del RNA mensajero de hígado de rata. De esta manera Bahnak y Gold (70) identificaron en 1983 un producto de traducción al que asignaron un peso molecular de 77-80 Kd. Los autores emplearon un anticuerpo desarrollado contra la glucógeno sintasa de hígado de conejo.

Muy recientemente, Ruffs y col. (76) empleando anticuerpos desarrollados contra el enzima de corazón de rata, han identificado en corazón e hígado de rata un producto de traducción "in vitro" cuyo peso molecular

estimaron en 93 Kd, análogo al obtenido por "immunoblotting" a partir de homogenados cardíacos y hepáticos.

1.3.2.1 Isoenzimas de la glucógeno sintasa

La posibilidad de la existencia de formas isoenzimáticas de la glucógeno sintasa deriva de recientes estudios de inmunoprecipitación del enzima. En este sentido, había sido descrita (71,72) la incapacidad de preparaciones de anticuerpos desarrolladas contra el enzima de músculo esquelético de conejo para reconocer de forma total al enzima hepático de rata.

Muy poco después, Kaslow y Lesikar (77) demostraban que preparaciones de anticuerpos contra el enzima de músculo esquelético de rata reconocían al enzima de músculo, corazón, tejido adiposo, riñón y cerebro cuando se realizaban "immunoblotting" de los correspondientes extractos tisulares. Sin embargo, aplicando el mismo criterio, el anticuerpo no reconocía al enzima hepático. Muy recientemente, Kaslow y col. (78), empleando anticuerpos preparados contra el enzima de hígado de rata han comprobado la capacidad de los mismos para reconocer al enzima hepático tanto de rata como de conejo, así como la no reactividad de este anticuerpo frente al resto de tejidos y órganos enumerados anteriormente. En base a estos resultados los autores postulan la existencia de, al menos, dos isoenzimas de la glucógeno sintasa: el hepático, que denominan "tipo L" y el muscular, común al resto de órganos y tejidos estudiados, que correspondería al

"tipo M".

1.3.2.2 Síntesis y degradación de la glucógeno sintasa

Los estudios relacionados con la síntesis y degradación de la glucógeno sintasa hepática, así como con los efectos que sobre estos parámetros pueden producir estados patológicos (p. ej. diabetes), ayuno o efectores hormonales han sido particularmente escasos. La razón de ello reside, posiblemente, en que la mayoría de investigadores han considerado más importante el estudio del control del enzima por modificación covalente, en el sentido de que es un control de rápida respuesta, mientras que en general, modificaciones en la velocidad de síntesis y degradación proteica son consideradas como modulaciones a plazos más largos.

Wititsuwannakul y Kim (79) estimaron la vida media del enzima de hígado de rata en poco más de 8 horas. Este valor descendía a unas 4 horas si el animal se encontraba en ayunas. En animales tratados con insulina, la vida media de la glucógeno sintasa alcanzaba las 16 horas, pero este incremento no parecía ser específico para el enzima. Los autores daban cuenta, asimismo, de que la velocidad de síntesis del enzima en animales sometidos a ayuno se reducía en un 40%, para volver a los valores normales a partir de las 12 horas de reanudar la alimentación. Sin embargo, la vida media se mantenía en ese momento prácticamente idéntica a la determinada en el período de ayuno. En base a ello, los

autores sugerían que los factores que regulaban las velocidades de síntesis y degradación de la glucógeno sintasa en hígado eran independientes entre sí.

El efecto de la diabetes sobre el recambio de la glucógeno sintasa hepática ha sido estudiado por Bahnak y Gold, llegando a la conclusión de que la mayor actividad glucógeno sintasa total (determinada en presencia de glucosa-6-fosfato) presente en el hígado diabético no era debida a la presencia de un enzima anormal (69), sino a una alteración en el recambio de la proteína y, en particular, a un incremento en su velocidad de síntesis (80).

1.3.2.3 Incidencia de la edad

Estudios recientes efectuados en ratas han puesto de manifiesto la incidencia de la edad del animal en la actividad del enzima hepático. Khandelwal y col. (81) estudiaron la actividad específica de la glucógeno sintasa hepática entre los 6 y 24 meses de vida del animal, observando una disminución de la citada actividad en los individuos de mayor edad. Estudios sobre el enzima durante el período prenatal han sido realizados por Margolis (82), llegando a la conclusión de que el acúmulo de glucógeno hepático que se observa en el feto en los últimos días de gestación se correlaciona con un incremento de la forma independiente de glucosa-6-fosfato del enzima.

1.3.3 FOSFORILACION E INTERCONVERSION DE LA GLUCOGENO SINTASA HEPATICA

Como se ha comentado anteriormente, la actividad de la glucógeno sintasa puede variar en función de los niveles de determinados metabolitos. Sin embargo, el proceso que afecta de una manera más importante al estado de activación del enzima es su grado de fosforilación.

1.3.3.1 Fosforilación covalente

El enzima hepático puede sufrir fenómenos de fosforilación múltiple, es decir, la incorporación de varias moléculas de fosfato sobre la molécula del enzima mediante la formación de un enlace fosfoester. La molécula donadora del grupo fosforilo es el ATP (o, en algunos casos, el GTP), cuyo fosfato de la posición gamma es transferido al enzima. Fundamentalmente, el enlace formado involucra al grupo hidroxilo perteneciente a residuos de serina del enzima. Recientemente, no obstante, se ha descrito la presencia de una proporción significativa de residuos de fosfotreonina en la glucógeno sintasa obtenida a partir de adipocitos y músculo esquelético de rata (83).

La reacción de fosforilación está catalizada por diferentes tipos de proteína quinasas. Estas quinasas son capaces de fosforilar tanto al enzima hepático como al

muscular si bien, en general, el número de fosfatos introducidos en la glucógeno sintasa hepática es, en igualdad de condiciones, menor que el introducido sobre el enzima de músculo esquelético.

Es de remarcar que existe una notable diferencia en el número de fosfatos presentes en las formas "defosforiladas" (es decir, independientes de glucosa-6-fosfato) de los enzimas procedentes de hígado y músculo. Así, el enzima muscular puede ser obtenido en su forma totalmente "I" con un contenido en fosfato de 0,1 a 0,6 moles por subunidad enzimática. Por el contrario, las determinaciones realizadas sobre el enzima hepático por Tan y Nuttall (67) dan como resultado la presencia de 2,9 moles de fosfato lábil al álcali por subunidad para la forma "I" y 5,7 para la forma "D". Los valores obtenidos para el fosfato total eran de 13,4 y 17,3 moles, respectivamente.

Más recientemente, otros autores (24) han obtenido valores de 1,8 moles de fosfato lábil al álcali por subunidad y 7,2 moles de fosfato total para el caso de la forma enzimática independiente de glucosa-6-fosfato.

La fosforilación "in vitro" tanto del enzima hepático como del muscular, seguida de la degradación de la molécula por bromuro de cianógeno da lugar a diferentes fragmentos, dos de los cuales contienen aparentemente todo el fosfato introducido en el enzima. Estos fosfopéptidos se conocen con el nombre de CB-2 y CB-1. El primero de ellos corresponde, al

menos en el enzima muscular, al extremo carboxilo terminal de la molécula, mientras el segundo contiene el extremo amino terminal del enzima.

En el caso del músculo esquelético de conejo, mucho más estudiado, CB-2 tiene un peso molecular de 21 Kd mientras que CB-1 no supera los 12 Kd (84-86). Por lo que hace referencia al enzima hepático son de resaltar las diferencias observadas entre las dos especies estudiadas con mayor detalle. Según Camici y col.(20), en el enzima de hígado de conejo los valores de peso molecular para CB-2 y CB-1 son 17 Kd y 13 Kd, respectivamente. Sin embargo, diferentes investigadores han establecido unos valores de 27-28 Kd (CB-2) y 12-14 Kd (CB-1) para el caso del enzima purificado a partir de hígado de rata (23,24,71). Esta diferencia es particularmente interesante si se tiene en cuenta que los valores observados por fragmentación del enzima obtenido a partir de células hepáticas marcadas radioactivamente coinciden, en ambos casos, con los datos obtenidos por fosforilación "in vitro".

Al igual que el enzima de músculo esquelético o hígado de conejo, la glucógeno sintasa de hígado de rata puede sufrir fosforilación múltiple. Son varias las proteína quinasa capaces de catalizar este tipo de reacción.

Jett y Soderling (23) llevaron a cabo estudios de fosforilación del enzima hepático de rata por la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc y la caseína quinasa -1, una glucógeno sintasa quinasa

independiente del nucleótido cíclico. Observaron que la incorporación de 2 fosfatos por subunidad, en reacción catalizada por la caseína quinasa-1, conducían a una casi total inactivación de la glucógeno sintasa. Por el contrario, cuando la quinasa empleada era la proteína quinasa dependiente de AMPc era necesaria la incorporación de 3 moles de fosfato por mol de subunidad para alcanzar un grado de inactivación similar.

Más recientemente otros autores han hecho públicos sus resultados referentes a la fosforilación "in vitro" de la glucógeno sintasa de hígado de rata. Así, Akatsuka y col. (21) demostraron que la fosforilasa quinasa purificada tanto a partir de músculo de conejo como de hígado de rata era capaz de fosforilar a la sintasa hepática. Este proceso se saldaba con la incorporación de 0,8-1,2 moles de fosfato por mol de subunidad. El fosfato introducido se localizaba, fundamentalmente, en dos fosfopéptidos trípticos (pI 4,2 y 3,8). Sin embargo esta fosforilación no implicaba una inactivación del enzima, al contrario de lo establecido para el enzima de músculo de conejo.

La fosforilación secuencial por fosforilasa quinasa y la proteína quinasa dependiente de AMPc no daba como resultado un incremento en el grado de fosforilación ni un cambio en el estado de activación del enzima. No obstante, cuando la proteína quinasa dependiente de AMPc era sustituida por la caseína quinasa-1 era posible conseguir una inactivación parcial acompañada de una fosforilación aditiva. Este

fenómeno no era observado cuando el orden de incubación con las quinasas se invertía, dando a entender que la fosforilación previa de la glucógeno sintasa por la fosforilasa quinasa transformaba a aquella en un mejor sustrato para la caseína quinasa-1.

Pocos meses antes, el mismo equipo había dado cuenta (26) de que la fosforilación de la glucógeno sintasa de hígado de rata por la proteína quinasa dependiente de AMPc purificada a partir de músculo esquelético de conejo daba lugar a la incorporación de 0,7-1,0 moles de fosfato por mol de subunidad, sin apreciable variación en el estado de activación de la sintasa. Todo el fosfato introducido aparecía como un único fosfopéptido tríptico (pI 4,25). La fosforilación por caseína quinasa 1, que llegaba a introducir hasta 2,2 fosfatos por subunidad, tampoco producía efecto alguno sobre la actividad del enzima. En este caso, el fosfato introducido se distribuía en cuatro fosfopéptidos trípticos cuyos puntos isoeléctricos tomaban valores entre 3,8 y 3,3.

La inactivación parcial de la sintasa podía conseguirse de manera efectiva por incubación consecutiva con la proteína quinasa dependiente de AMPc y la caseína quinasa-1, si bien la variación en el orden de incubación no resultaba tan eficiente.

Los mismos autores realizaron con posterioridad (25) una serie de experimentos consistentes en purificar parcialmente

por ultracentrifugación el sedimento de glucógeno al cual se encuentra asociada la glucógeno sintasa. El sedimento de glucógeno era incubado con [γ -³²P]ATP y diversas proteína quinasas, en un intento de aproximarse a las condiciones en las que se encuentra la glucógeno sintasa en la célula. El enzima era inmunoprecipitado y analizado por degradación trípica. Se pudo observar que el grado de fosforilación alcanzado era, con respecto al obtenido en estudios con el enzima puro, menor para el caso de la caseína quinasa-1 y mayor para el de la proteína quinasa dependiente de AMPc. En ningún caso se producía una inactivación concomitante de la glucógeno sintasa, excepto cuando se empleaba una combinación de las quinasas citadas.

Un amplio estudio, en el que se investigaba la fosforilación de la sintasa hepática por nueve diferentes proteína quinasas, fue el realizado por Imazu y col. (22), publicado en 1984. Según estos autores, la fosforilación por fosforilasa quinasa hepática o muscular supone la incorporación de, aproximadamente, 1 mol de fosfato por mol de subunidad, el cual se localizaba íntegramente en un fragmento de bromuro de cianógeno de 17 Kd de peso molecular. Esta fosforilación producía una disminución en el estado de activación de la sintasa de 0,95 a 0,6. El patrón de fosforilación era común al producido por la quinasa dependiente de calmodulina y calcio, aunque la inactivación alcanzada en este caso era menor.

La subunidad catalítica de la proteína quinasa

dependiente de AMP cíclico era capaz de introducir 1 mol de fosfato por mol de subunidad de sintasa. El fosfato introducido se distribuía en ambos fragmentos de bromuro de cianógeno (17 y 27-30 Kd, respectivamente), produciéndose una notable inactivación de la sintasa.

La fosforilación catalizada por la GSK-3 conducía a una rápida y efectiva inactivación de la sintasa, incorporándose 1,5 moles de fosfato por mol de subunidad. La GSK-4 exhibía un comportamiento muy similar a la fosforilasa quinasa tanto en lo referente a la fosforilación de la sintasa como a su inactivación. La GSK-5 (también llamada PC 0,7 o CK-2) daba lugar a la incorporación de 1 mol de fosfato por mol de subunidad, sin variar el estado de activación de la sintasa. Otra proteína quinasa "independiente", la CK-1, producía una escasa inactivación de la sintasa, si bien es cierto que el grado de fosforilación alcanzado era muy bajo. Finalmente, la incubación de la sintasa con la proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos daba lugar a la incorporación de 0,5 moles de fosfato por mol de subunidad, que se localizaban en el fragmento de menor masa producido por degradación con bromuro de cianógeno. Esta fosforilación no producía inactivación alguna del enzima.

Poco después este mismo grupo analizó, mediante filtración en gel y cromatografía líquida de alta presión, los fragmentos trípticos obtenidos a partir de glucógeno sintasa hepática fosforilada por diversas quinasas (30). Según sus resultados, la fosforilasa quinasa, la quinasa

dependiente de calmodulina y la GSK-4 hepáticas fosforilaban un mismo péptido triptico, que podría contener los centros localizados en CB-1. Este péptido también era fosforilado por la quinasa dependiente de AMP cíclico la cual, además, introducía fosfato en dos péptidos más. La GSK-5 fosforilaba un único péptido, similar a uno de los fosforilados por la quinasa dependiente de AMP cíclico. La GSK-3 daba lugar a cuatro fosfopéptidos, uno de los cuales no era generado por el resto de quinasas. La incubación con la proteína quinasa C producía dos fosfopéptidos tripticos, uno de los cuales correspondía al observado en el caso de las quinasas dependientes de calcio citadas en primer lugar.

Según los estudios de Ciudad y col. (71) ni la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico ni ninguna de las quinasas dependientes de calcio (fosforilasa quinasa, quinasa dependiente de calmodulina y proteína quinasa C) catalizaban la fosforilación de la región CB-2 de la sintasa de hígado de rata, si bien todas ellas fosforilaban en mayor o menor medida el fragmento CB-1. Por el contrario, las quinasas independientes de calcio y de AMP cíclico, como la CK-2 y la GSK-3, fosforilaban ambas regiones del enzima (GSK-3) o casi exclusivamente la región CB-2 (CK-2).

Finalmente, Mor (24) ha llevado a cabo estudios de la fosforilación "in vitro" de la sintasa de hígado de rata. Según sus resultados, la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMP cíclico puede introducir 0,8 moles de fosfato por mol de subunidad de sintasa, produciendo una

escasa inactivación del enzima. La incorporación de fosfato catalizada por la CK-1 se elevaba hasta 2 moles por mol de subunidad e implicaba una notable inactivación de la sintasa. La incubación con CK-2 daba lugar a la introducción de 1,5 moles de fosfato por mol de subunidad, con una inactivación de la sintasa menor que en el caso anterior. Es de remarcar que, a diferencia del resto de quinastas estudiadas, la CK-2 fosforilaba con mayor eficiencia a la sintasa hepática que al enzima muscular. La fosforilasa quinasa tan sólo introducía 0,45 moles de fosfato por mol de subunidad, produciendo una muy escasa inactivación de la glucógeno sintasa.

Excepto en el caso de la fosforilasa quinasa, en el que la fosforilación tenía lugar en CB-1 exclusivamente, el resto de quinastas estudiadas fosforilaban ambos fragmentos de bromuro de cianógeno. Las quinastas independientes de calcio y AMP cíclico (CK-1 y CK-2) eran más efectivas sobre CB-2, mientras que la quinasa dependiente de AMP cíclico lo era sobre CB-1. El análisis tríptico de CB-1 mostraba la existencia de dos fosfopéptidos cuando la fosforilación era catalizada por la fosforilasa quinasa, mientras que sólo uno de ellos era patente tras incubación de la sintasa con la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMP cíclico. El fosfopéptido restante era mayoritario tras incubación con CK-2 y prácticamente único en el caso de CK-1. La degradación tríptica de CB-2 daba lugar a tres fosfopéptidos fosforilados en mayor o menor medida según la quinasa empleada.

1.3.4 PROTEINA FOSFATASAS

1.3.4.1 Proteína fosfatasa con incidencia en la regulación celular. Clasificación.

Se denominan proteína fosfatasa a aquellos enzimas capaces de catalizar la reacción de hidrólisis de grupos fosfatos unidos covalentemente a una proteína.

Ya en la década de los 40 se puso de manifiesto la existencia de un enzima capaz de convertir la fosforilasa "a" en "b", la forma inactiva del enzima (87), cuya actividad sólo varios años después fue caracterizada como proteína fosfatasa (88,89). En 1963, Friedmann y Larner (90) descubrieron una actividad fosfatasa que llevaba a cabo la transformación de la glucógeno sintasa D en I.

Hasta la fecha muy diversos laboratorios han purificado y caracterizado de distintas fuentes un variado número de proteína fosfatasa dotadas de una mayor o menor especificidad en cuanto a la proteína sustrato. Gracias, en gran parte, a la labor de Cohen y col., las proteína fosfatasa con incidencia en la regulación celular han sido clasificadas en dos grandes grupos: fosfatasa tipo 1 y tipo 2 (91).

Las fosfatasa tipo 1 se caracterizan por defosforilar preferentemente a la subunidad β de la fosforilasa quinasa,

por ser inhibidas en presencia de concentraciones nanomolares de ciertas proteínas termoestables denominadas inhibidores 1 y 2 (92) y por exhibir una amplia especificidad de sustrato.

Por el contrario, las fosfatasas tipo 2 muestran una marcada especificidad sobre la subunidad α de la fosforilasa quinasa y, a diferencia de las de tipo 1, son insensibles a los citados inhibidores proteicos. Este grupo de fosfatasas puede ser a su vez clasificado en tres grupos: 2A, 2B y 2C, en base a sus diferentes requerimientos. Las fosfatasas 2B son dependientes de calcio, las 2C lo son de magnesio y las 2A no requieren la presencia de cationes divalentes para mostrar su actividad (93-96). La especificidad de sustrato de la fosfatasa 2B es, a diferencia del resto de fosfatasas, particularmente alta.

A tenor de diversas observaciones, la proteína fosfatasa 1 existe en dos formas, una activa y otra inactiva, denominada proteína fosfatasa dependiente de ATP-Mg (97-99). Esta forma inactiva es un complejo formado por la propia fosfatasa 1 y el inhibidor 2 y la activación de la misma requiere la presencia de ATP-Mg y una proteína quinasa, la denominada GSK-3 o FA (99). Esta proteína quinasa catalizaría la fosforilación de un residuo de treonina en la molécula del inhibidor, lo que provocaría una modificación conformacional del complejo y la restauración de la actividad fosfatasa.

Muy recientemente Stralfors y col. (100) han sugerido que la proteína fosfatasa 1 consta de dos subunidades. Una de

dependiente del citado nucleótido cíclico, la activación del inhibidor 1 tiene como resultado la inhibición de la defosforilación de dichos sustratos, ampliándose así el efecto del AMPc.

Tanto las fosfatasas tipo 1 como las tipo 2 son capaces de defosforilar al inhibidor 1, al menos "in vitro", y restaurar la actividad fosfatasa.

El peso molecular de la fosfatasa 1 se ha cifrado en 250 Kd y las características del holoenzima en cuanto a la especificidad de sustrato y susceptibilidad a los inhibidores son similares a las que muestra la subunidad catalítica.

Como hemos comentado, se conocen tres especies diferentes de proteína fosfatasas tipo 2. La fosfatasa 2A puede ser separada a su vez, mediante cromatografía en DEAE-celulosa, en tres especies denominadas $2A_0$, $2A_1$ y $2A_2$ (94) cuyos pesos moleculares determinados por filtración en gel son 210, 210 y 150 Kd, respectivamente. Las fosfatasas $2A_0$ y $2A_1$ constan de 3 subunidades (A, B' y C en el caso de la $2A_0$ y A, B y C en el de la $2A_1$). La fosfatasa $2A_2$ consta de dos subunidades (A y C), pero posiblemente se trate de un artefacto generado durante el proceso de purificación por degradación o disociación de las dos fosfatasas citadas anteriormente (104). Las subunidades A y C son comunes para las tres fosfatasas e iguales en todas ellas, pero las subunidades B y B' son diferentes entre sí en atención a sus distintos pesos moleculares y mapas peptídicos. La subunidad

C, un péptido de 36 Kd de peso molecular, parece ser responsable de la actividad del enzima (105). Recientes aportaciones sobre el estudio de los mapas peptídicos de las subunidades catalíticas de la fosfatasa 1 y 2A han llevado a la conclusión de que ambos polipéptidos son producto de genes distintos (106).

La actividad de la subunidad C de la proteína fosfatasa 2A es inhibida al interaccionar esta proteína con las subunidades A y B (o B'), según se deduce del hecho de que la disociación del complejo (por ejemplo, por tratamiento con etanol al 80%) causa un considerable incremento de su actividad. Se conocen diferentes sustancias capaces de interaccionar con el enzima y neutralizar los efectos inhibitorios de las subunidades A y B/B' sobre la subunidad C. Sin embargo la única que, hasta el momento, podría tener importancia fisiológica es la espermina. La acción activadora de esta poliamina varía notablemente según sea el sustrato ensayado. La espermidina es mucho menos efectiva mientras que la putrescina carece de efecto alguno (107).

La proteína fosfatasa 2B es un enzima completamente dependiente de calcio, tanto en presencia como en ausencia de calmodulina (96,105), compuesto que es capaz de activar a la fosfatasa. Está formada por tres subunidades, denominadas A, A' y B. La subunidad A' parece derivar de la A por proteólisis parcial, la cual se considera como la subunidad catalítica. En virtud de su dependencia de calcio y calmodulina, así como de su estructura y especificidad de sustrato, parece

claro que la proteína fosfatasa 2B es análoga a la calcineurina, una proteína aislada de cerebro y capaz de unirse a la calmodulina (105,108,109). A diferencia del resto de fosfatasas que reseñamos, la fosfatasa 2B es notablemente estricta en cuanto a la especificidad de sustrato. Cuatro son las proteínas que pueden ser defosforiladas significativamente por esta fosfatasa: los inhibidores 1 y 2, la subunidad α de la fosforilasa quinasa y la cadena ligera de la miosina (93,110).

En lo que hace referencia a la proteína fosfatasa 2C parece ser que, contra lo previamente establecido (93), el enzima consta de 2 subunidades idénticas de unos 45 Kd de peso molecular (111). Es un enzima dependiente de magnesio y, aunque en un principio se consideró que era específico para la glucógeno sintasa, en realidad presenta un amplio espectro de sustratos.

Si bien la gran mayoría de las proteína fosfatasas descritas por diversos autores pueden ser encuadradas en esta clasificación y asimiladas a algunas de las especies moleculares descritas, se conocen algunos ejemplos que escapan a este criterio unificador. Así, en mitocondrias, la piruvato deshidrogenasa es regulada por procesos de fosforilación y defosforilación. La proteína fosfatasa que defosforila dicho enzima es dependiente de calcio y, no obstante, difiere de la fosfatasa 2B tanto en la estequiometría de su unión con el catión como en la estructura de sus subunidades (112).

Por otra parte, han sido identificadas diferentes proteína quinasas con capacidad para fosforilar residuos de tirosina, en procesos relacionados con los receptores de insulina, factores de crecimiento epidérmico, derivados de plaquetas y otros (113,114). Existen evidencias que sugieren que las fosfatasas implicadas en estos procesos son diferentes a las descritas en este apartado (114).

1.3.4.4 Las proteína fosfatasas en relación con el metabolismo del glucógeno hepático.

El papel de las proteína fosfatasas en la regulación del metabolismo del glucógeno hepático parece ser notablemente complejo y su estudio no está tan avanzado como en el caso del músculo esquelético. En este último sistema existen numerosas evidencias de que la proteína fosfatasa 1 es el enzima mayoritariamente responsable de la activación de la síntesis del polisacárido y de la inactivación de la glucogenolisis. En este tejido, aproximadamente la mitad de la actividad fosfatasa se encuentra unida al glucógeno, al igual que varios de los enzimas que controlan el metabolismo del polisacárido (glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa, etc) (1), mientras que ello no sucede en el caso de las fosfatasas tipo 2 (115).

En condiciones de pH y concentración de magnesio fisiológicas, la proteína fosfatasa 1 es responsable de prácticamente la totalidad de la actividad fosforilasa

quinasa fosfatasa (subunidad β) y fosforilasa fosfatasa, siéndole asimismo atribuible del 60 al 75% de la actividad glucógeno sintasa fosfatasa. La actividad remanente sobre estos sustratos es debida, en su mayor parte, a la fosfatasa 2A.

Recientes estudios desarrollados en nuestro laboratorio (116) han puesto de manifiesto las diferencias entre las fosfatasas 1 y 2 a la hora de defosforilar a la glucógeno sintasa muscular previamente fosforilada por diversas proteína quinasa. La fosfatasa 1 es capaz de catalizar la hidrólisis de todo el fosfato introducido por las quinasa, mientras que las preparaciones de fosfatasa 2 (esencialmente 2A), son incapaces de liberar más del 75% del fosfato unido covalentemente. Ambas fosfatasas exhiben diferentes capacidades para defosforilar los distintos centros de la glucógeno sintasa.

En el sistema hepático, al menos en conejo, la actividad específica de la fosfatasa 1 es entre 3 y 4 veces menor que en el músculo, mientras que los correspondientes valores para las fosfatasas 2A y 2C se duplican. En base a ello se ha postulado (115) un papel preeminente para la proteína fosfatasa 2A en la defosforilación tanto de la glucógeno fosforilasa como de la glucógeno sintasa, junto con una intervención menor (pero notablemente específica en lo que hace referencia a la glucógeno sintasa) de la fosfatasa 2C.

El hecho de que la fosfatasa 2C no sufra la inhibición observada para la fosfatasa 1 y la 2A en extractos hepáticos concentrados parece revalorizar el papel de la citada fosfatasa. No hay que olvidar, no obstante, que en hígado de conejo la proteína fosfatasa 1 sigue siendo la única fosfatasa específicamente asociada al complejo glucógeno-proteínas, si bien en menor proporción (aproximadamente 10%) que en músculo.

Por último, estudios llevados a cabo por Tan y Nuttal (117) en hígado de rata y Laloux y col. (118) en hígado de ratón, han demostrado que la mayor parte de la actividad fosforilasa fosfatasa y sintasa fosfatasa existente en extractos crudos estaba asociada a la fracción microsomal que contiene el sedimento de glucógeno.

1.3.5 FOSFORILACION Y PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA GLUCÓGENO SINTASA

Como se ha comentado, las formas más fosforiladas de la glucógeno sintasa prácticamente no muestran actividad en ausencia del efector alostérico glucosa-6-fosfato, cuya presencia no es necesaria para que las formas defosforiladas del enzima sean activas (119). En base a ello se diseñó un método para estimar el estado de activación del enzima, correlacionándolo con el cociente entre la actividad medida en ausencia de glucosa-6-fosfato y la determinada a altas

concentraciones del efector (50), con lo que se establecía un nexo entre el grado de fosforilación y el estado de activación de la glucógeno sintasa.

Las variaciones en el estado de fosforilación se correlacionan con cambios en las constantes cinéticas del enzima. Estos cambios, en general, son importantes en lo que se refieren a la $S_{0,5}$ para el sustrato UDP-glucosa. El efecto sobre la velocidad máxima, tanto en el caso de la sintasa muscular (56) como hepática (24,67) parece ser muy pequeño.

En este sentido Tan y Nuttall (67), en estudios sobre la glucógeno sintasa de hígado de conejo, han observado que las formas "I" y "D" del enzima presentan valores similares en su velocidad máxima, mientras que la forma más fosforilada muestra un valor de $S_{0,5}$ mucho mayor que la forma defosforilada. En cambio, Roach y col. (27) observaron el efecto contrario, es decir, una disminución de la velocidad máxima con el estado de fosforilación sin apenas alteración en los valores de la $S_{0,5}$ para el sustrato UDP-glucosa. Este fenómeno podía apreciarse asimismo al transformar la forma "I" en "D" por fosforilación con diferentes proteína quinasas (20).

Los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre la glucógeno sintasa de hígado de rata (24) resultaron acordes con los realizados en hígado de conejo por Tan y Nuttall. La fosforilación de la glucógeno sintasa por diferentes proteína quinasas dió lugar al mismo fenómeno: un

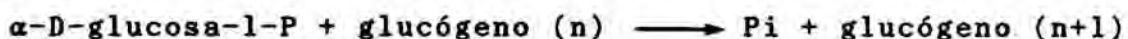
incremento en el valor de la constante $S_{0,5}$, indicando una menor afinidad del enzima por el sustrato y una disminución en la afinidad del enzima por la glucosa-6-fosfato, traducida en un incremento en la constante cinética $M_{0,5}$. Los valores de la velocidad máxima no resultaron alterados en ningún caso.

Los cambios en las propiedades cinéticas de la glucógeno sintasa hepática han sido observados también "in vivo". Ciudad y col. (43) demostraron que la insulina producía una activación de la glucógeno sintasa en hepatocitos de rata, provocando una disminución de los valores de $S_{0,5}$ y $M_{0,5}$. Este fenómeno es similar al observado al incubar las células hepáticas con diversos azúcares.

Asimismo, se han observado variaciones en los valores de los parámetros cinéticos del enzima por acción de diversas hormonas, así como en animales que padecían determinados estados patológicos (diabetes), en músculo esquelético de conejo (120,121) y de rata (122,123) y en adipocitos de rata (124).

1.4 GLUCOGENO FOSFORILASA

La glucógeno fosforilasa (α -1,4-glucan:ortofosfato α -glucosil transferasa, E.C. 2.4.1.1) cataliza la siguiente reacción:



Esta reacción es cercana al equilibrio y puede ser fácilmente revertida "in vitro". Sin embargo, en condiciones fisiológicas, transcurre siempre en el sentido de la degradación del glucógeno.

La glucógeno fosforilasa de músculo esquelético de conejo es, con mucho, la mejor conocida. Descubierta hace casi 50 años (15), se presenta en dos formas moleculares que son interconvertibles por reacciones de fosforilación y defosforilación. La forma defosforilada (fosforilasa "b") es inactiva en ausencia de AMP. Se trata de un dímero de aproximadamente 200 Kd de peso molecular. La fosforilasa "a", que es la forma fosforilada, se presenta como un tetrámero formado por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas de 97 Kd. La transformación de la forma "b" en "a" se produce por la fosforilación de un único residuo de serina en reacción catalizada por la fosforilasa quinasa. Este aminoácido se halla cercano al extremo amino terminal de la cadena peptídica (Ser-14) y su fosforilación provoca notables

cambios físicos y de actividad en el enzima (125,126).

La unión de determinados efectores a los diferentes centros de la fosforilasa es capaz de afectar a la actividad enzimática. Por un lado, el enzima posee un centro catalítico de unión a sus tres sustratos posibles (glucógeno, fosfato y glucosa-1-fosfato) y a algunos inhibidores. Cuenta también con un centro de unión a nucleótidos, responsable del control alostérico por el AMP (127) y capaz de albergar ATP. El ATP actúa como un inhibidor alostérico de la fosforilasa. La glucosa-6-fosfato es también capaz de inhibir al enzima, si bien interacciona con un centro del mismo diferente al del ATP. Es necesario considerar otro centro relacionado con la capacidad de ligar piridoxal-5'-fosfato, esencial para la actividad del enzima. Por último hay que tomar en consideración el centro de fosforilación covalente y un centro de unión al glucógeno, diferente al responsable de la catálisis.

La actividad del enzima viene determinada tanto por su estado de fosforilación como por la presencia de efectores. La fosforilasa existe en dos conformaciones, una activa y otra inactiva. En su forma fosforilada, el equilibrio se encuentra fuertemente desplazado hacia la forma activa y es escasamente alterado por los efectores descritos. En condiciones fisiológicas, la fosforilasa "b" es inactiva gracias a los efectos inhibidores del ATP y la glucosa-6-fosfato.

Los conocimientos que se poseen sobre la fosforilasa hepática son menores que en el caso del enzima muscular. El enzima ha sido purificado a partir de varias especies, incluyendo la rata (128). Es también interconvertible por fosforilación y defosforilación y ambas formas se presentan como dímeros, con un peso molecular de 185 Kd.

Existen importantes diferencias entre los enzimas muscular y hepático, que pueden resumirse en una escasa inmunorreactividad cruzada, incapacidad para formar híbridos por intercambio de subunidades, diferencias en la secuencia primaria, etc. (129-131). No obstante, las propiedades cinéticas de la fosforilasa "a" hepática son similares a las del enzima muscular (126,132,133).

Por el contrario, la fosforilasa "b" hepática es inactiva incluso en presencia de AMP (87). Según Stalmans y col. (131), la forma "b" del enzima de hígado de ratón presenta un 25% de la actividad de la forma "a", mientras que la obtenida a partir de hígado de perro no es activa en absoluto, indicando diferencias entre distintas especies para el enzima procedente de un mismo órgano.

Los mismos autores diseñaron un sistema para inhibir la fosforilasa "b" de hígado de ratón mediante la incorporación de cafeína a la mezcla de ensayo. Otro tipo de ensayo, aplicado al enzima de hígado de rata, es el diseñado por Tan y Nuttal (134), por el cual se confiere igual actividad a ambas formas del enzima. El fundamento del mismo es emplear

elevadas concentraciones de glucosa-1-fosfato en la mezcla de ensayo.

Según los datos aportados por Stalmans y Hers (128), la actividad de la fosforilasa "b" depende de la concentración aniónica de la mezcla de ensayo. El enzima es activado por altas concentraciones de sulfato sódico e inhibido en presencia de fluoruro. La actividad "b" resulta ser más afectada por cambios en el pH que la "a".

Otras condiciones de ensayo para la fosforilasa hepática son las descritas por Graves y col. (135), basadas en que el 1,2-dimetoxietano activa a la fosforilasa "b" y, a diferencia del sulfato sódico, no inhibe a la forma "a" del enzima.

Como hemos comentado anteriormente, el paso de fosforilasa "b" a "a" está catalizado de forma exclusiva por la fosforilasa quinasa. En este aspecto es de notar que las hormonas glucogenolíticas (glucagon, adrenalina, etc.), las cuales son capaces de provocar una gran activación del enzima, resultan inefectivas en el caso de ratas gsd/gsd, una cepa de animales genéticamente defectivos en el enzima fosforilasa quinasa (18).

1.5 PROTEINA QUINASAS

Se denominan proteína quinasas a aquellos enzimas capaces de catalizar la reacción:



la cual supone la formación de enlaces covalentes entre la proteína sustrato y grupos fosfato.

Las proteína quinasas han sido clasificadas de acuerdo con diferentes criterios. De ellos, el más usual es aquel que las agrupa en función de su dependencia de AMP cíclico o de calcio.

1.5.1 PROTEINA QUINASAS DEPENDIENTES DE AMP CICLICO

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico existe en dos formas isoenzimáticas, denominadas tipo I y tipo II, separables por cromatografía en DEAE-celulosa (136). En ambos casos el enzima está compuesto por dos diferentes subunidades, la denominada subunidad reguladora (R) y la catalítica (C). La subunidad catalítica es idéntica en ambos isoenzimas, mientras que la reguladora es una proteína diferente en cada caso.

El control de la actividad del enzima se efectua a través de la inhibición que la subunidad reguladora ejerce sobre la catalítica. Así, el holoenzima, cuya estructura puede representarse como R_2C_2 , es inactivo. En presencia de AMP cíclico el holoenzima fija el nucleótido, formándose un complejo ternario que, a continuación, se disocia en $R_2(AMPC)_4$ y dos moléculas de la subunidad catalítica. La subunidad catalítica libre es activa como proteína quinasa. El efecto del AMP cíclico es contrarrestado por el complejo ATP-Mg.

Parece claro que la variación en los niveles de AMP cíclico constituye la principal forma de controlar esta actividad proteína quinasa en las células. Sin embargo existen dos sistemas adicionales de modificar la actividad del enzima, como son la existencia de inhibidores proteicos y la fosforilación de la subunidad reguladora. Este último proceso tan sólo ha sido descrito en el caso del isoenzima II.

En efecto, existen diversas proteínas capaces de inhibir a la quinasa dependiente de AMP cíclico. La más importante de ellas parece ser el inhibidor termoestable descrito por Walsh y col. (137). Esta proteína es específica para la citada quinasa e interacciona con su subunidad catalítica. Si bien el papel fisiológico del inhibidor no está totalmente definido podría ser que, "in vivo", una buena parte de la subunidad catalítica que se encuentra disociada del complejo se encontrara bloqueada por el citado inhibidor protéico.

Por otra parte, la subunidad reguladora del isoenzima II puede sufrir autofosforilación y este proceso acarrea una disminución de la afinidad de la subunidad reguladora por la catalítica, con la consiguiente activación del enzima. La fosforilación de la subunidad reguladora II puede ser catalizada "in vitro" por otras proteína quinasas, tales como la caseína quinasa-2 y la GSK-3 (138,139). No obstante, el papel fisiológico de la fosforilación de la subunidad reguladora II dista de estar totalmente esclarecido.

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico presenta "in vitro" una muy amplia variedad de sustratos. Muchos de ellos son enzimas de marcada importancia en el control de diversas vías metabólicas. Algunos ejemplos son la fosforilasa quinasa, la propia glucógeno sintasa, la piruvato quinasa hepática, el inhibidor-1 de las proteína fosfatasas, etc. Un hecho general lo constituye el que la quinasa dependiente de AMP cíclico fosforila preferentemente aquellos centros situados cerca del extremo amino terminal de la proteína sustrato y que poseen dos aminoácidos básicos adyacentes al residuo fosforilable (140).

1.5.2 PROTEINA QUINASAS DEPENDIENTES DE CALCIO

1.5.2.1 Fosforilasa quinasa

La fosforilasa quinasa es responsable de la activación de la fosforilasa. Sin embargo, entre sus sustratos se encuentran también la glucógeno sintasa, la caseína (141) y las troponinas I y T (142).

El enzima es un hexadecámero formado por cuatro diferentes tipos de subunidades, tal como expresa la fórmula $(\alpha, \beta, \gamma, \delta)_4$. Los pesos moleculares atribuidos a las subunidades son 118-145 Kd (α), 107-136 Kd (β), 40-45 Kd (γ) y 17 Kd (δ). La subunidad δ es idéntica a la calmodulina. Esta estructura, que fue descrita previamente para el enzima de músculo esquelético de conejo, es prácticamente válida para el enzima hepático (143). La actividad catalítica del enzima, según algunos autores, puede ser atribuida a la subunidad γ , si bien se ha especulado con la posibilidad de la existencia de más de un centro activo (144).

La fosforilasa quinasa muscular es prácticamente inactiva en ausencia del catión calcio, el cual puede unirse al enzima por medio de la subunidad δ . La adición de calmodulina exógena, en presencia de calcio, contribuye a aumentar la actividad del enzima. Este efecto adicional es bloqueado por derivados fenotiacínicos tales como la trifluoperacina. Sin embargo estos compuestos no son capaces

de inhibir la actividad basal estimulable por calcio.

Las subunidades α y β de la fosforilasa quinasa pueden ser fosforiladas tanto por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico y la caseína quinasa-1 (145) como por procesos de autofosforilación (141,146). Se desconoce en la actualidad el significado fisiológico de la activación de la fosforilasa quinasa como consecuencia del proceso de autofosforilación.

La degradación parcial de las subunidades α y β por una proteasa como la tripsina da lugar, asimismo, a una activación de la fosforilasa quinasa, además de eliminar el efecto producido por la adición de calmodulina exógena.

Una notable diferencia entre el enzima hepático y el muscular la constituye el hecho de que el primero tan sólo es parcialmente inhibido por agentes quelantes del catión calcio, como el EGTA (143).

Puesto que la fosforilasa quinasa puede ser activada por un incremento en los niveles de calcio o bien por fosforilación catalizada por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, el enzima puede constituir un punto de convergencia de dos importantes señales hormonales que estimulan la glucogenolisis hepática.

1.5.2.2 Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina

Esta glucógeno sintasa quinasa fue identificada simultáneamente en hígado por Ahmad y col. (147) y en músculo esquelético de conejo por Woodgett y col. (148,149). La forma nativa del enzima presenta un peso molecular aparente de 275 o 500 Kd, dependiendo del criterio aplicado. Está formada por al menos dos tipos de subunidades (51 y 53 Kd), posiblemente diferentes.

El enzima puede sufrir autofosforilación y es totalmente dependiente de calcio y de calmodulina, a la vez que es inhibible por trifluoperacina. A pesar de que estas características son semejantes a las de la fosforilasa quinasa, en la actualidad se acepta que ambos enzimas son diferentes.

El sustrato principal aunque no único de esta proteína quinasa es la glucógeno sintasa. Otros sustratos descritos son la fenilalanina hidroxilasa hepática y la tirosina hidroxilasa. La quinasa dependiente de calcio y calmodulina es capaz de incorporar alrededor de un mol de fosfato por mol de subunidad de glucógeno sintasa, dando lugar a una notable inactivación de esta última. Ello hace que la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina sea una posible candidata para mediar en la inactivación dependiente de calcio de la glucógeno sintasa hepática.

1.5.2.3 Proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos (Proteína quinasa C)

En 1979, Takai y col. detectaron en cerebro de rata la presencia de una actividad proteína quinasa dependiente de calcio y cuya actividad podía ser modulada por fosfolípidos (150). Poco después, esta misma actividad fue identificada en los más variados tejidos y órganos de muy diferentes especies (151,152) siendo, en algunos casos, cuantitativamente mayor que la propia actividad quinasa dependiente de AMP cíclico. Las diferencias intertisulares pueden ser, no obstante, extraordinariamente marcadas.

El enzima ha sido purificado a partir de cerebro de rata (153), corazón de buey (154,155) y otras fuentes entre las cuales, al menos por el momento, no está incluido el hígado. Su peso molecular es de 70-80 Kd y consta de una única cadena polipeptídica. La degradación parcial del enzima por proteasas produce un fragmento de 51 Kd, que es totalmente activo aún en ausencia de calcio y fosfolípidos (156,157). El enzima se encuentra en parte asociado a la membrana.

La afinidad del enzima por el calcio y los fosfolípidos se ve fuertemente incrementada en presencia de ciertos 1,2-diacilgliceroles (38,151). Puesto que este tipo de compuestos son producidos a consecuencia de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles de membrana y el proceso de hidrólisis puede ser inducido por diversos agonistas, se ha postulado

que los diacilgliceroles pueden actuar como mensajeros intracelulares de ciertas funciones celulares mediadas por receptores (39).

Ciertos derivados diterpénicos capaces de actuar como promotores de tumores, tales como los esteres de forbol, son capaces de activar a la proteína quinasa C de una manera análoga a como lo hacen los 1,2-diacilgliceroles (158). Incluso se han obtenido evidencias de que la propia proteína quinasa C puede actuar como receptor o parte del receptor de membrana de los esteres de forbol (159). Como consecuencia de todo ello se ha especulado con la hipótesis de que los efectos cancerígenos de estos compuestos pueden ser mediados por la quinasa. En este sentido, es de remarcar la similitud de una parte de la estructura de los esteres de forbol con la molécula de 1,2-diacilglicerol. Sin embargo, ciertos promotores de tumores denominados "de segundo nivel", como la mezereina, relacionados con la molécula del forbol (160,161) pero que no poseen estructura tipo diacilglicerol, son también capaces de activar a la proteína quinasa C (162).

Se han descrito muy diferentes sustratos para la proteína quinasa C, si bien el caracter fisiológico de la fosforilación de muchos de ellos no está establecido claramente. El enzima fosforila activamente a la histona, sobre todo a la fracción H1. Puede fosforilar, asimismo, a la protamina (155), troponinas I y T (163), tirosina hidroxilasa (164), fosfofructoquinasa (165) y guanilato ciclase (166), así como al transportador de glucosa en eritrocitos (167) y

al receptor de transferrina en células A431 (168), entre otras proteínas. La fosforilasa quinasa puede actuar como sustrato, aunque de manera poco efectiva y, como se ha expuesto ampliamente en 1.3.3.1, la proteína quinasa C puede fosforilar a la glucógeno sintasa.

La actividad proteína quinasa C puede ser alterada, al menos "in vitro", por diferentes agentes. Así, la trifluoperacina es capaz de inhibir a la quinasa a pesar de que la calmodulina no ejerce efecto alguno sobre la actividad del enzima. Ello puede ser reflejo de un mecanismo de acción similar al de los enzimas dependientes de calcio y calmodulina (169). Algunas toxinas polipeptídicas ejercen un efecto inhibitor sobre la quinasa, así como ciertas poliaminas como la espermina.

1.5.3 PROTEINA QUINASAS INDEPENDIENTES DE AMP CICLICO Y DE CALCIO

1.5.3.1 Caseína quinasas-1 y 2

Muchas proteína quinasas pueden fosforilar a la caseína en mayor o menor grado y, en base a ello, la caseína se ha empleado en numerosas ocasiones como un sustrato no fisiológico para el estudio de la actividad proteína quinasa en muchos sistemas.

Existen dos principales actividades caseína quinasa, que se corresponden con dos proteínas enzimáticas perfectamente definidas, de amplia distribución en los organismos superiores y que se denominan caseína quinasa-1 y 2 (CK-1 y CK-2) (170).

La caseína quinasa-1, identificada en músculo por Itarte y Huang (171), es un monómero de 30 a 40 Kd, incapaz de utilizar GTP como sustrato y que sufre autofosforilación (172).

Ha sido descrito que la caseína quinasa-1 tan sólo fosforila residuos de serina al actuar sobre caseína o fosvitina y para ello es necesario que exista un residuo de ácido glutámico situado a dos residuos de distancia entre el centro de fosforilación y el extremo amino terminal de la proteína.

Diversas proteínas pueden ser sustratos "in vitro" para la citada quinasa. Entre ellas se cuentan algunos factores de iniciación en eucariotas (eIF-4B, eIF-5), RNA polimerasa, etc. Como se ha descrito en 1.3.3.1, la caseína quinasa-1 posee actividad glucógeno sintasa quinasa. Aunque hasta muy recientemente se creía que la fosforilación de la sintasa muscular por la CK-1 únicamente afectaba a residuos de serina, en la actualidad está demostrada la capacidad de la quinasa para fosforilar a la glucógeno sintasa en residuos de treonina (173).

La caseína quinasa-1 no es afectada por la heparina, si bien el enzima de hígado de conejo parece ser una excepción a

esta regla. En el caso de la fosforilación de la glucógeno sintasa, la quinasa es inhibida por el glucógeno.

La caseína quinasa-2 parece ser un oligómero de 130-180 Kd de peso molecular. Está compuesta por dos tipos de subunidades: α y β . La subunidad α tiene un peso molecular de 43 Kd y la β de 25 Kd, configurando una estructura del tipo $\alpha_2\beta_2$ (174). El enzima ha sido denominado también PC_{0,7}, troponina T quinasa, fosvitina quinasa, caseína quinasa G y glucógeno sintasa quinasa-5. La caseína quinasa-2 se ha identificado en numerosos tejidos y muestra una amplia distribución intracelular (175).

La actividad caseína quinasa-2 es inhibida por completo en presencia de muy bajas concentraciones de heparina. Las poliaminas, especialmente la espermina y la espermidina, pueden contrarrestar esta inhibición. Se ha descrito igualmente una acción inhibitoria atribuible al 2,3-bisfosfoglicerato. La subunidad β puede sufrir autofosforilación en un residuo de serina, si bien este hecho no afecta a la actividad enzimática.

El enzima, a diferencia de la caseína quinasa-1, puede emplear como donador de fosfatos tanto al ATP como al GTP, si bien este último nucleótido es menos eficaz como sustrato. La transferencia de fosfatos se realiza, al menos empleando caseína como sustrato, sobre residuos de serina y treonina. En este caso el enzima reconoce regiones altamente ácidas de la proteína, en zonas especialmente ricas en glutamato y

aspartato y cercanas al extremo carboxi terminal.

Se han descrito diferentes sustratos "in vitro" para la caseína quinasa-2. Algunos de ellos son ciertos factores de iniciación (eIF-2, eIF-3, eIF-4B, eIF-5), la RNA polimerasa, algunas proteínas de la subunidad 60 S ribosomal, la subunidad reguladora del isoenzima II de la quinasa dependiente de AMP cíclico y, como se ha comentado anteriormente, la glucógeno sintasa.

En relación con la glucógeno sintasa muscular, parece bien establecido que la caseína quinasa-2 fosforila un único centro del enzima (el denominado centro 5). La fosforilación de este centro no produce un cambio apreciable en la actividad de la sintasa, si bien es condición indispensable para que sean fosforilados otros centros (3a,3b y 3c). Como se ha comentado anteriormente (1.3.3.1), la caseína quinasa-2 puede fosforilar a la glucógeno sintasa de hígado de rata en varios centros.

1.5.3.2 Glucogeno sintasa quinasa-3

Esta proteína quinasa ha sido identificada y parcialmente purificada a partir de músculo esquelético e hígado (176,177). Presumiblemente se trata de un monómero de 57 Kd de peso molecular, que se encuentra en escasa cantidad en el músculo a pesar de mostrar gran actividad.

No se conocen por el momento inhibidores o activadores de esta quinasa. El enzima presenta autofosforilación, proceso que interesa a cuatro residuos de serina. Tanto el ATP como el GTP (este último a mayor concentración) pueden ser utilizados como donadores de residuos fosforilo.

Como se ha comentado en el apartado 1.3.4.1, la glucógeno sintasa quinasa-3 interviene en la regulación de la actividad de la proteína fosfatasa-1 mediante la fosforilación del inhibidor-2 de esta fosfatasa.

De los diferentes sustratos conocidos de la glucógeno sintasa quinasa-3, entre los que figuran la subunidad reguladora del isoenzima II de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico y la caseína, el mejor es la glucógeno sintasa. En la sintasa muscular, la glucógeno sintasa quinasa-3 fosforila tres centros diferentes, conocidos como 3a, 3b y 3c.

1.5.3.3 Glucógeno sintasa quinasa-4

Cohen y col. (178) identificaron y purificaron esta actividad proteína quinasa a partir de extractos de músculo esquelético. Denominada por otros autores PC_{0,4}, se ha estimado su peso molecular en 100 Kd. Su acción sobre la glucógeno sintasa muscular, el mejor sustrato conocido, implica la fosforilación del centro 2 exclusivamente (al igual que la fosforilasa quinasa).

No se conocen moduladores de la actividad de este enzima que, por otra parte, solo emplea ATP como donador de grupos fosforilo.

1.5.3.4 Proteína quinasa activable por heparina

Muy recientemente, Ahmad y col. (179) han identificado en músculo esquelético de conejo una actividad proteínica quinasa activable por heparina. Su peso molecular ha sido estimado en 70 Kd y no utiliza como sustrato caseína, fosvitina, histona ni fosforilasa. Sin embargo puede fosforilar e inactivar a la glucógeno sintasa muscular, introduciendo casi un mol de fosfato por mol de subunidad exclusivamente en el fragmento CB-2.

La actividad de la quinasa es independiente de calcio, fosfolípidos y AMP cíclico y no es afectada por el inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

1.6 LA REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO HEPATICO POR SEÑALES EXTRACELULARES

Es bien conocido el efecto que diversas hormonas pueden producir sobre el metabolismo del glucógeno hepático. Sin embargo, la mayoría de estos efectores no penetran en la célula sino que interaccionan a nivel de la membrana celular con sus receptores. Esta interacción desencadena una serie de fenómenos que, finalmente, dan lugar a la alteración en el metabolismo del polisacárido. El conjunto de fenómenos producidos por la interacción de un efector con su receptor específico, es decir, el mecanismo de la acción hormonal sobre el metabolismo del glucógeno es objeto en la actualidad de intensos estudios y muchos de sus aspectos no están aun esclarecidos.

A principio de los años setenta, no obstante, el panorama aparecía tranquilizadoramente sencillo. Se postulaba entonces que el único mecanismo por el cual una hormona podía influir sobre el grado de fosforilación de la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa y, por ende, en el control del metabolismo del glucógeno, era a través de cambios en los niveles de AMP cíclico. Esta creencia se estableció a partir de los ya clásicos experimentos de Sutherland, en los que demostró que la incubación con glucagon de cortes de hígado estimulaba la glucogenolisis. Con posterioridad se puso en evidencia que este fenómeno venía acompañado de una activación de la fosforilasa y se estableció que el mediador

de estos efectos era un entonces inusual nucleótido: el AMP cíclico (180).

Se consideró entonces a la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico como la única quinasa capaz de fosforilar a la glucógeno sintasa y a la fosforilasa quinasa. Sin embargo es sabido hoy día que los efectores α -adrenérgicos o la vasopresina ejercen su efecto sin alterar los niveles intracelulares de AMP cíclico y, en cambio, inducen variaciones en los flujos de calcio. Estas evidencias, unidas al descubrimiento de proteína quinasas independientes de AMP cíclico y capaces de fosforilar a la glucógeno sintasa, hicieron que a mediados de los años setenta fuera necesario replantearse la cuestión del control hormonal del metabolismo del glucógeno.

Las hormonas y efectores que actúan sobre el metabolismo del glucógeno pueden clasificarse en dos grupos: las que dan lugar a una degradación del polisacárido, denominadas glucogenolíticas, que producen una activación de la glucógeno fosforilasa y las que provocan la síntesis de glucógeno, activando a la glucógeno sintasa. Como regla más o menos general, los efectores que inactivan a uno de los dos enzimas activan al otro y viceversa.

Los mecanismos a través de los cuales las hormonas glucogenolíticas actúan en el hígado pueden ser de dos diferentes tipos: uno de ellos es el que tiene como mensajero secundario al AMP cíclico y es al que recurren el glucagón y

efectores β -adrenérgicos como el isoproterenol. El segundo transcurre vía calcio y recientemente se ha identificado el posible mensajero que media en la liberación del catión de sus lugares de almacenamiento. El citado mensajero parece ser el mioinositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) que es un producto de degradación de los fosfatidilinositoles de membrana. Este segundo mecanismo es el seguido en hígado por efectores α -adrenérgicos y algunas hormonas polipeptídicas como la vasopresina, angiotensina y oxitocina (Esquema III).

1.6.1 EFECTORES QUE ACTUAN VIA AMP CICLICO

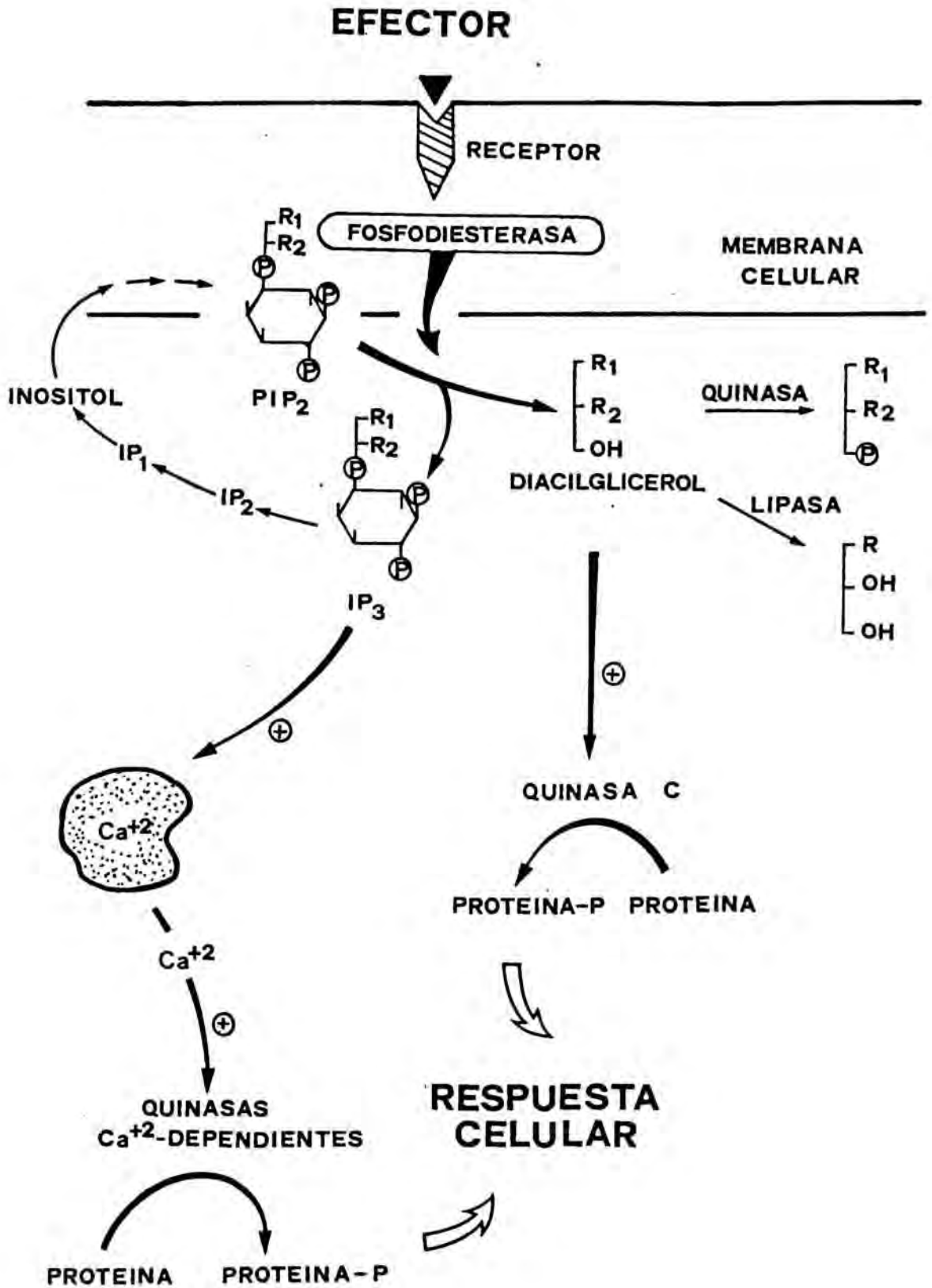
1.6.1.1 Glucagon

El glucagon es una hormona polipeptídica segregada por las células α de los islotes de Langerhans pancreáticos. Su órgano diana principal es el hígado, donde da lugar a una intensa glucogenolisis y estimula la gluconeogénesis y la producción de cuerpos cetónicos.

La hormona se une reversiblemente a sus receptores celulares sitos en la membrana plasmática. La unión es saturable dentro del rango de concentraciones plasmáticas fisiológicas (10^{-10} - 10^{-8} M). La interacción con el receptor estimula la conversión de ATP en AMP cíclico (181-183), debido a que el propio receptor es parte de un complejo

ESQUEMA III MECANISMO DE ACCION DE LOS EFECTORES
QUE ACTUAN VIA CALCIO

Este mecanismo es el postulado para los efectores α - adrenérgicos y las hormonas peptídicas ¹ vasopresina, angiotensina II y oxitocina en el hígado.



sistema enzimático denominado adenilato ciclasa. Este sistema posee tres componentes: el propio receptor, una proteína reguladora capaz de unir GTP (proteína G) y una unidad catalítica. La unión del GTP, inducida por la unión hormona-receptor, da como resultado la activación de la subunidad catalítica.

Debido al incremento de los niveles de AMP cíclico se produce la estimulación de la glucogenolisis. Ello sucede gracias a que el AMP cíclico activa a la proteína quinasa dependiente del nucleótido al interaccionar con su subunidad reguladora y favorecer la disociación del complejo (véase 1.5.1). La quinasa dependiente de AMP cíclico fosforila y activa la fosforilasa quinasa, la cual al fosforilar a la glucógeno fosforilasa la convierte en forma "a", activa en ausencia de efectores alostéricos. Esta cascada de acontecimientos , tiene como consecuencia una enorme amplificación de la señal hormonal.

En estudios realizados en ratas en ayunas el glucagon es capaz de inactivar a la glucógeno sintasa. De esta manera se bloquea la síntesis de glucógeno simultáneamente a la estimulación de la glucogenolisis. Este efecto no puede observarse en ratas alimentadas (184), si bien hay que resaltar que en este último caso el estado de activación basal de la glucógeno sintasa es menor que en los animales en ayunas.

Ha sido descrito muy recientemente que, tras la acción del glucagon, la glucógeno sintasa de hepatocitos de rata en ayunas incrementa su grado de fosforilación, siendo afectado tanto el fragmento CB-2 como el CB-1 (71,73). La fragmentación del enzima mediante tripsina (73) permite observar que el glucagon estimula la incorporación de fosfato radioactivo en seis fosfopéptidos cuyos pI resultan ser 5,3, 4,9, 4,2, 4,05, 3,8 y 3,3. El péptido de pI 4,2 puede producirse "in vitro" por fosforilación de la glucógeno sintasa hepática por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. El fosfopéptido de pI 3,3 puede ser generado por fosforilación con la caseína quinasa-1 (centro 4b) y el péptido de pI 3,8 contiene los centros que denominan 4a y 1,4in, fosforilados respectivamente por la caseína quinasa-1 y por la acción secuencial de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico y la caseína quinasa-1. La caseína quinasa-2 podría ser responsable de la fosforilación del péptido de pI 4,05.

Estos datos parecen indicar que la fosforilación de la glucógeno sintasa inducida por glucagon involucra tanto a la quinasa dependiente de AMP cíclico como a quinasas independientes del nucleótido, lo que sugiere la existencia de alguna vía alternativa a la del AMP cíclico para la acción de la hormona en el hígado.

Los efectos del glucagon sobre la glucógeno sintasa, la glucógeno fosforilasa y los niveles de AMP cíclico pueden ser contrarrestados por la insulina (45). La vasopresina y la

angiotensina II pueden, asimismo, contrarrestar los incrementos en los niveles de AMP cíclico y el efecto sobre la glucógeno fosforilasa del glucagon (185-187). Se ha demostrado que la angiotensina contrarresta los efectos del glucagon sobre la fosforilasa quinasa (188). Los efectos del glucagon sobre los niveles de AMP cíclico son también contrarrestados por los esteres de forbol (189).

1.6.1.2 Efectores β -adrenérgicos

Los receptores de los agonistas β -adrenérgicos están relacionados también con la actividad adenilato ciclasa. Así, el antagonista β -adrenérgico propranolol anula el acúmulo de AMP cíclico provocado por la adrenalina pero no la activación de la glucogenolisis provocada por este efector (190,191). La capacidad de los efectores β -adrenérgicos para provocar glucogenolisis hepática puede variar según la especie. En el conejo y el cobaya, son más potentes que los agonistas α -adrenérgicos (192,193). En la rata sucede lo contrario (191).

1.6.2 EFFECTORES QUE ACTUAN VIA CALCIO

Existen numerosas evidencias de que los efectores α -adrenérgicos y algunas hormonas polipeptídicas como la vasopresina y la angiotensina actúan sobre el metabolismo del glucógeno hepático a través de un mecanismo que implica incrementos en la concentración de calcio citoplasmático

libre (34,194).

1.6.2.1 Efectores α -adrenérgicos

Se conocen dos tipos de receptores α -adrenérgicos: α_1 y α_2 , de acuerdo con el tipo de antagonista capaz de bloquearlos más o menos selectivamente. Sin embargo, muchos de los efectores α -adrenérgicos (incluyendo adrenalina y noradrenalina) no son específicos y pueden interaccionar con ambos tipos de receptores según las condiciones. Diferentes evidencias indican que los receptores α_1 son los responsables de las respuestas fisiológicas a los agonistas α -adrenérgicos en el hígado (18,195,196).

La naturaleza de la señal intracelular producida por la interacción de un α -agonista con su receptor ha sido objeto de múltiples especulaciones.

Numerosos estudios han llevado a postular que la redistribución del calcio celular podría ser la señal mediadora de estos efectores. La movilización del calcio intracelular está relacionada con el recambio de los fosfolípidos de inositol (197). Los candidatos más firmes parecen ser el fosfatidilinositol-4-fosfato y el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, cuya hidrólisis tiene lugar a los pocos segundos de la exposición de las células a α -adrenérgicos, vasopresina o angiotensina (198,199). Sus productos de degradación, el inositol-4,5-bisfosfato y el

inositol-1,4,5-trisfosfato parecen ser los mediadores de la acción calcio-dependiente de diversos efectores, puesto que son capaces de movilizar las reservas de calcio intracelulares (36,199). Así, en hepatocitos de ratas incubados con adrenalina, vasopresina o angiotensina, en un lapso de pocos segundos se producen incrementos de los niveles de IP_3 , calcio intracelular y actividad glucógeno fosforilasa (200).

El origen del calcio involucrado en estos fenómenos ha sido objeto de intensa controversia. Mientras algunos autores sostenían la idea de que el calcio extracelular jugaba un papel en el proceso (201-203), otros abogaban por la intervención del catión existente en las reservas intracelulares (34,194), tales como la matriz mitocondrial y el retículo endoplasmático.

La ruptura del fosfatidilinositol produce también 1,2-diacilglicerol. Este compuesto, según demostraron Nishizuka y col. (39) activa a la proteína quinasa C. Por lo tanto, la degradación del fosfatidilinositol, provocada por los citados efectores, podría dar lugar a ambos mediadores: IP_3 y diacilglicerol (Esquema III).

Muy recientemente se han obtenido evidencias de que no todo el diacilglicerol generado en hepatocitos de rata expuestos a adrenalina, vasopresina o angiotensina puede ser atribuido a la degradación del fosfatidilinositol. El origen

de este otro acerbo de diacilglicerol no es aún conocido (204).

Los efectos fisiológicos de los agonistas α -₁ adrenérgicos en hígado pueden ser potenciados por pequeños incrementos en los niveles de AMP cíclico intracelular. Se ha descrito (205,206) que en ratas macho adultas la estimulación α -adrenérgica puede provocar un aumento de los niveles del ₁ nucleótido, por lo que no puede descartarse que estos receptores estén involucrados en dos mecanismos de acción: movilización de calcio y generación de AMP cíclico.

Los efectores α -adrenérgicos provocan la glucogenólisis hepática al activar a la glucógeno fosforilasa, produciendo la salida de glucosa al medio. Asimismo, estos efectores causan la inactivación de la glucógeno sintasa, fenómeno observado tanto en ratas en ayunas (184,207) como alimentadas (188).

La activación de la glucógeno sintasa promovida por efectores como la adrenalina y la fenilefrina se correlaciona con un incremento en el estado de fosforilación del enzima. Este hecho se ha puesto de manifiesto en diversos tejidos tales como el músculo esquelético de conejo (120,121) y músculo esquelético (122), cardíaco (208,209) y diafragma de rata (210). Muy recientemente este fenómeno ha sido descrito en hepatocitos aislados de rata (71). En todos los casos estudiados los centros fosforilados del enzima se distribuían en los dos fragmentos de bromuro de cianógeno (CB-1 y CB-2).

No se conoce por el momento el mecanismo a través del cual los efectores α -adrenérgicos, tras producir un incremento en los niveles de calcio intracelular, dan lugar a la fosforilación de la glucógeno sintasa. En un principio, las proteína quinasas dependientes de calcio, tales como la fosforilasa quinasa y la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, capaces ambas de fosforilar "in vitro" a la glucógeno sintasa podrían ser las responsables "in vivo". No hay que olvidar, sin embargo, que la producción de 1,2-diacilglicerol inducida por los efectores α -adrenérgicos podría implicar a la proteína quinasa C en la fosforilación del enzima. Tampoco puede ser descartada, a priori, una intervención de las glucógeno sintasa quinasas independientes de calcio y de AMP cíclico, a pesar de que no se ha podido establecer en su caso ningún regulador metabólico hasta el momento (excepción hecha de ciertas poliaminas).

Una vía indirecta a través de la cual los incrementos de calcio podrían dar lugar a la inactivación de la glucógeno sintasa es la propuesta por Hers y col. (211). El mecanismo sostenido implicaría la inhibición de las glucógeno sintasa fosfatasas por la fosforilasa "a" formada tras la activación de la fosforilasa quinasa por el calcio. Esta explicación satisface ciertos aspectos del problema (212). No obstante, existen evidencias de que el control de la actividad y el grado de fosforilación de la glucógeno sintasa pueden ser independientes del de la glucógeno fosforilasa (213,214).

1.6.2.2 Vasopresina, Angiotensina II y Oxitocina

Si bien el hígado no es considerado como su órgano diana, estas tres hormonas polipeptídicas pueden provocar múltiples efectos metabólicos tales como la estimulación de la gluconeogénesis (201,215), la inhibición de la síntesis de ácidos grasos (216,217) y, como hemos comentado, la estimulación de la glucogenolisis (35,218).

Tanto vasopresina como oxitocina son nonapéptidos sintetizados en el hipotálamo, que tan sólo difieren en dos aminoácidos (219). La angiotensina es un octapéptido. Según Keppens y De Wulf (220), la respuesta glucogenolítica hepática y la acción vasopresora de la vasopresina son dependientes de calcio, probablemente debido a un receptor común. La oxitocina posee asimismo actividad glucogenolítica y vasopresora, si bien con una potencia dos órdenes de magnitud menor.

El mecanismo de acción de estas hormonas sobre la glucogenolisis hepática puede ser similar al de los efectores α -adrenérgicos, por cuanto no modifican los niveles de AMP cíclico intracelular (221,222) y requieren la presencia de calcio para activar a la glucógeno fosforilasa (35). Asimismo, el mecanismo de movilización de calcio puede ser común con el de los efectores α -adrenérgicos, en cuanto a la formación de IP₃ y diacilglicerol.

3

No obstante, según Cooper y col. (223) el tratamiento

previo de los hepatocitos con el ester de forbol TPA inhibe totalmente el incremento de los niveles de calcio citoplasmático provocado por la fenilefrina y, en cambio, apenas afecta a la movilización de calcio producida por vasopresina. Casi al mismo tiempo, Lynch y col. (224) han matizado estos resultados afirmando que, a bajas concentraciones de la hormona polipeptídica, el TPA puede inhibir tanto la liberación de calcio al citosol como la formación de IP₃ y la activación de la glucógeno fosforilasa.

3

El efecto de estas hormonas sobre la glucógeno sintasa ha sido mucho menos estudiado. En 1980, Strickland y col. (207) observaron que la adición de vasopresina a hepatocitos aislados de ratas alimentadas, en presencia de glucosa, disminuía el estado de activación de la glucógeno sintasa. Más recientemente, se han obtenido evidencias en nuestro laboratorio de que la vasopresina, la angiotensina y la oxitocina inactivan al enzima en condiciones basales (188).

En cuanto a la oxitocina, ha sido estudiada con cierto detalle en adipocitos aislados, aunque con resultados contradictorios. Así, Muchmore y col. (225) aseguran que la hormona produce un efecto bifásico. A bajas concentraciones (inferiores a 10^{-8} M) su efecto es análogo al de la insulina, puesto que produce la estimulación de la síntesis de glucógeno, la activación del transporte de glucosa y el bloqueo de la glucólisis. En cambio, a altas concentraciones, se comporta como una típica hormona glucogenolítica. Por el contrario, Stephenson y col. (226) han sostenido un efecto

glucogenolítico (incluyendo la inactivación de la glucógeno sintasa) independientemente de la concentración de hormona empleada.

El efecto de esta hormona en hepatocitos había sido muy poco estudiado. Se conocía, no obstante, su capacidad para activar a la glucógeno fosforilasa en presencia de altas concentraciones de glucosa (35). Muy recientemente (188), se ha establecido su capacidad para activar a la glucógeno fosforilasa e inactivar a la glucógeno sintasa en condiciones basales.

Se ha demostrado la incidencia de la vasopresina y la angiotensina en la fosforilación de ciertas proteínas citoplasmáticas en hepatocitos aislados de rata (40). Así, estas hormonas estimulaban la fosforilación de un conjunto de diez proteínas a través de una vía dependiente de calcio e independiente de AMP cíclico. De ellas, tres incrementaban su fosforilación por efecto del TPA y el resto por incubación con el ionóforo de calcio A23187. Puesto que una de las proteínas afectadas se identificó como la fosforilasa y su estado de fosforilación no era incrementado al utilizar ratas *gsd/gsd*, deficientes en fosforilasa quinasa, se dedujo que al menos tres proteína quinasas estaban implicadas en la respuesta a estas hormonas: la fosforilasa quinasa, la proteína quinasa C y una proteína quinasa dependiente de calcio no identificada.

En cuanto al efecto sobre la fosforilación de la

glucógeno sintasa por estas hormonas, Ciudad y col. han conseguido demostrar recientemente un incremento en el estado de fosforilación del enzima y una inactivación del mismo al tratar hepatocitos aislados de rata con vasopresina, en presencia de glucosa. El incremento en la fosforilación afectaba a ambos fragmentos de bromuro de cianógeno del enzima (71).

1.6.3 INSULINA

La insulina es capaz de regular numerosos procesos celulares, al ejercer un control sobre muchos enzimas del metabolismo intermediario tanto a través de modificaciones covalentes de unas proteínas como controlando la expresión genética de otras.

Si bien su mecanismo de acción no es conocido aún, sí se sabe que la hormona interacciona con receptores de membrana de alta afinidad. Estos receptores están formados por dos tipos diferentes de subunidades unidas por puentes disulfuro. Su estructura es del tipo $\alpha_2\beta_2$ (227). La subunidad α es capaz de ligar a la insulina, mientras que la β muestra actividad tirosina quinasa y, asimismo, es susceptible de fosforilación en residuos de tirosina (8). Se ha intentado establecer un nexo entre ambas propiedades que explique parcialmente los efectos celulares de la insulina.

La insulina estimula la síntesis de glucógeno, produciendo una activación de la glucógeno sintasa y la defosforilación del enzima. Este hecho ha podido ser demostrado en diafragma de rata (210), donde la insulina favorece la defosforilación de ambos fragmentos de bromuro de cianógeno del enzima. Este efecto es menor en diafragmas previamente denervados (228).

En músculo esquelético, la insulina provoca también la defosforilación de la glucógeno sintasa (120,121,229,230), conociéndose incluso los centros de fosforilación afectados (229). En corazón de rata sometido a perfusión con fosfato radioactivo se ha comprobado un pequeño descenso (22 %) en la cantidad de fosfato unido al enzima tras incubación con insulina. La cuantía de la defosforilación parece indicar que este proceso afecta a un número muy restringido de centros (208,209). Estudios realizados en adipocitos de rata incubados con fosfato radioactivo indican que, si bien la insulina incrementa el estado de activación de la glucógeno sintasa, no parece disminuir el nivel de fosforilación del enzima. Este efecto se consigue por tratamiento de los adipocitos con insulina y glucosa. Se observa entonces una defosforilación mucho mayor que la atribuible al efecto de la glucosa (231).

En cuanto al hígado, ha sido posible demostrar una activación de la glucógeno sintasa en condiciones basales (es decir, en ausencia de glucosa exógena) (43). Si bien hasta el momento no se ha demostrado de forma inequívoca la

defosforilación del enzima inducida por insulina, los cambios en los parámetros cinéticos de la glucógeno sintasa observados en células tratadas con la hormona, son similares a los detectados tras defosforilación "in vitro" del enzima.

Se ha intentado explicar el mecanismo de acción de la insulina en el hígado en base a una disminución de la concentración de AMP cíclico. Este fenómeno ha sido observado en condiciones basales (232), si bien diferentes autores coinciden en que la insulina puede contrarrestar el incremento en la concentración de AMP cíclico producido por el glucagon y los efectores β -adrenérgicos.

Algunos autores han sugerido que la disminución de la sensibilidad de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico por el nucleótido cíclico podría explicar algunos de los efectos de la insulina. Este efecto se ha observado en diafragmas (234,235) y hepatocitos de rata (44,236).

De igual manera se ha pretendido involucrar a alguna proteína quinasa independiente de AMP cíclico o a efectos sobre las fosfatasas o sobre sus inhibidores proteicos.

Cada uno de los mecanismos de acción propuestos tan sólo es capaz de explicar parcialmente los efectos de la insulina. En realidad, el mecanismo(s) de acción de esta importante hormona está todavía por elucidar.

1.6.4 EFECTO DE LOS IONES INORGANICOS LITIO Y VANADATO

1.6.4.1 Litio

Se ha observado que el ion litio ejerce un efecto similar al de la insulina puesto que estimula tanto la utilización de glucosa como la síntesis de glucógeno muscular (237-239). Estudios realizados en diafragma de rata (240) parecen indicar que, aunque ambos agentes ejercen sus efectos en el mismo sentido, éstos son aditivos. Por ello se ha postulado un diferente mecanismo de acción para ambos efectores.

Años después de que Villar Palasí y Larner (241,242) describieran el efecto activador de la insulina sobre la glucógeno sintasa de músculo, Horn y col. (243) demostraron que el litio incrementa la actividad glucógeno sintasa en diafragmas de rata. El efecto activador del litio sobre la glucógeno sintasa se ha puesto de manifiesto también en adipocitos de rata, tanto en presencia como en ausencia de glucosa en el medio de incubación (244). Este efecto parece ser resultado de alguna modificación covalente, puesto que persiste después de someter al enzima a filtración en gel y de precipitarlo con etanol. Por otra parte, no se modifica cuando se elimina el calcio extracelular.

En cuanto a la incidencia del catión sobre el metabolismo hepático del glucógeno, se ha descrito en

hepatocitos aislados de rata (245) una estimulación de la producción de glucógeno y una activación de la glucógeno sintasa, siempre en presencia de glucosa en el medio de incubación a concentraciones capaces, de por sí, de activar al enzima.

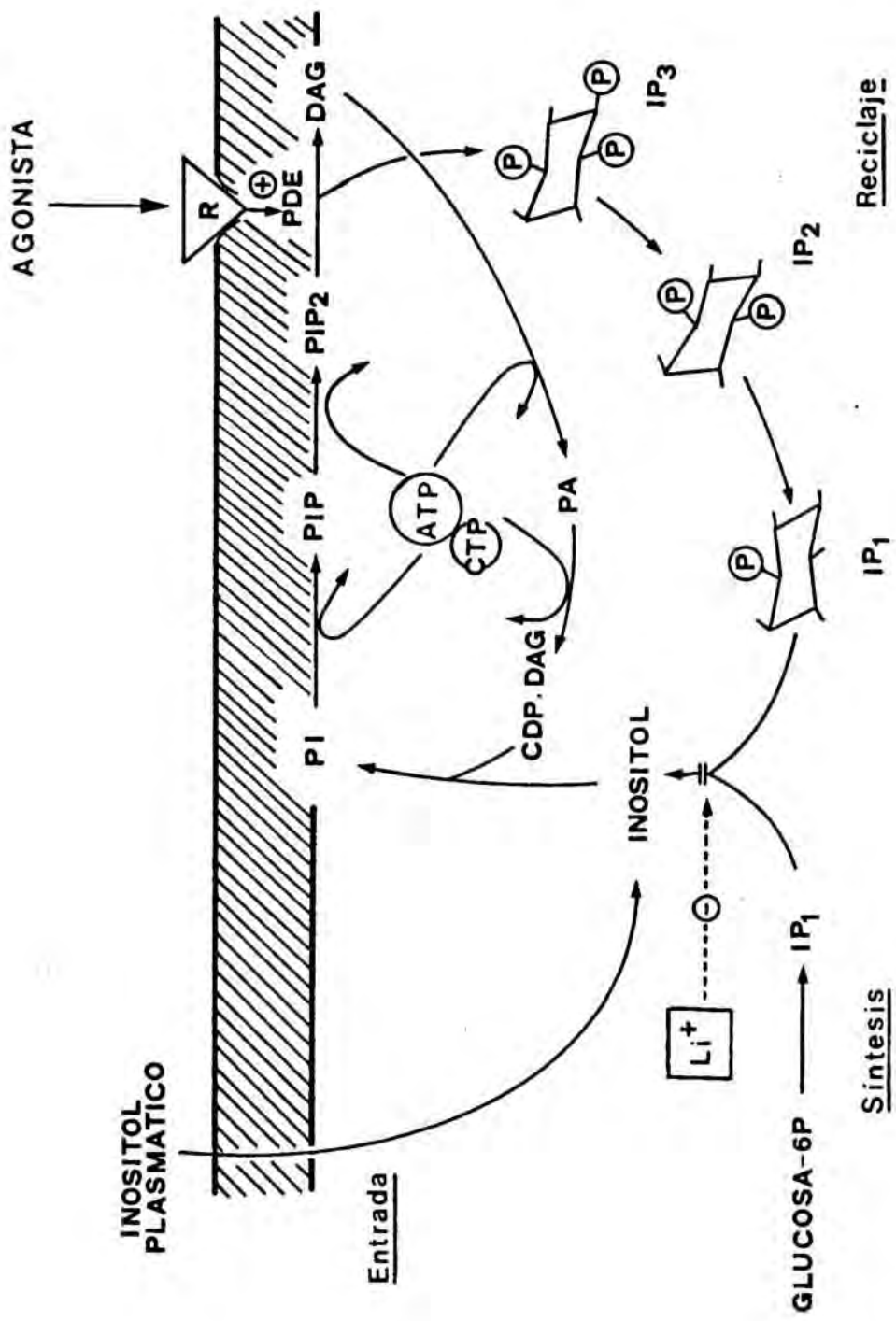
Estudios realizados en nuestro propio laboratorio han contribuido a ampliar considerablemente esta información (188). Así, se ha demostrado que el litio es capaz de provocar un gran incremento en el estado de activación de la glucógeno sintasa basal en hepatocitos de ratas en ayunas y que este efecto es dependiente del tiempo y la concentración empleada. Se ha comprobado que el fenómeno es independiente de calcio y que implica modificación covalente del enzima.

En cuanto a un posible mecanismo de acción, parece ser que el litio influye en el metabolismo de los fosfatidilinositoles de membrana. Hemos comentado el papel que el recambio de estos compuestos puede jugar en los mecanismos de acción de hormonas y otros efectores que impulsan su degradación. El proceso de recambio es cíclico (véase Esquema IV) en gran parte y supone la defosforilación del IP para dar lugar a inositol que, al combinarse con la citidina ³ difosfato diacilglicerol (CDP.DAG) regenera nuevamente el fosfatidil inositol. La CDP.DAG proviene de la transformación del diacilglicerol.

La relación entre el litio y los fosfatidilinositoles se puso de manifiesto cuando Allison y Stewart (246)

**ESQUEMA IV EFECTOS DEL LITIO EN EL METABOLISMO DE
LOS FOSFATIDILINOSITOLES**

El litio impide la formación del inositol
procedente tanto del reciclaje como de nueva
síntesis, puesto que inhibe la actividad inositol-
1-fosfato fosfatasa.



descubrieron que se producía una importante reducción en los niveles de mioinositol en el cerebro de ratas tratadas con litio. Posteriormente se averiguó que se producía un incremento en la concentración de inositol-1-fosfato (247). Ello era debido a que el litio es capaz de inhibir a la mioinositol-1-fosfato fosfatasa (248,249) y, por lo tanto, bloquear la formación del fosfatidilinositol al impedir tanto la regeneración del mioinositol como su síntesis "de novo".

Este efecto de bloqueo de la formación de inositol es importante en cerebro, fibras nerviosas o en testículos, puesto que, a diferencia del resto de órganos, no tienen acceso al inositol plasmático. Sin embargo, el hecho de que en cualquier caso el litio produzca un acúmulo de inositoles fosfato permite amplificar el efecto de degradación de los fosfatidilinositoles provocado por otros efectores. En este sentido, se ha empleado como herramienta para el estudio de efectores α -adrenérgicos en diferentes órganos y tejidos, incluyendo el hígado (200,250).

1.6.4.2 Vanadato

Los efectos del vanadato descritos en los últimos años son numerosos y afectan a las más diversas vías metabólicas (251).

En relación con el metabolismo de carbohidratos, estudios realizados en adipocitos aislados de rata han probado que este ion produce una gran estimulación de la oxidación de glucosa, que es aditiva a la provocada por concentraciones submáximas de insulina (252). La estimulación de la incorporación de glucosa a glucógeno ha sido observada en diafragma (251).

Tamura y col. (253,254) han descrito que el vanadato activa a la glucógeno sintasa de adipocitos de rata de una manera dependiente del tiempo y la concentración, a la vez que produce una pequeña estimulación de la fosforilasa. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que el vanadato estimula la actividad adenilato ciclasa (255). Sin embargo, la presumible activación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico por el nucleótido cíclico producido permite especular con una posible fosforilación de la glucógeno sintasa por esta quinasa, siendo la inactivación producida contrarrestada por algún proceso no conocido.

A raíz de las evidencias presentadas por Tamura y col. (254) y Dubyak y col. (255) parece poder afirmarse que la acción del vanadato sobre la glucógeno sintasa en tejido

adiposo no puede ser debida a una inhibición de la ATPasa dependiente de sodio y potasio de la membrana producida por el ion, puesto que inhibidores de la ATPasa, como la ouabaína o la eliminación del potasio del medio, no alteran el efecto del vanadato sobre la glucógeno sintasa.

Se ha descrito en adipocitos, por otra parte, un incremento en la fosforilación del receptor de la insulina por el vanadato a concentraciones semejantes a las necesarias para activar a la glucógeno sintasa (254). Machicao y col. (257) han observado este mismo efecto en placenta humana, pero sus resultados tienden a descartar un mecanismo común para la hormona y el ion.

Estudios realizados en hígado de rata (258) han demostrado que la fosforilación del receptor de la insulina por vanadato podría ser debida a una inhibición de las tirosina fosfatasas. Esta capacidad de inhibir a las tirosina fosfatasas podría dar lugar a incrementos en la fosforilación de diversos sustratos.

La incubación de cortes de hígado de rata con vanadato da lugar a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (259), debido a incrementos en los niveles del nucleótido. Es presumible, pues, que este compuesto estimule la actividad adenilato ciclasa hepática, lo cual ha sido comprobado en otros tejidos (255,260,261), o bien que inhiba a la fosfodiesterasa. En cualquier caso, si la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico fuera la vía

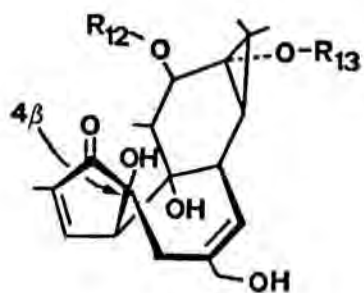
más potenciada en hígado por el vanadato, podría esperarse un comportamiento de este ion inverso al de la insulina en lo que hace referencia al metabolismo del glucógeno.

Resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio (188) inducen a pensar que, a diferencia de otros tejidos, el vanadato presenta en hígado efectos similares a los de las hormonas glucogenolíticas. Así, el vanadato es capaz de inactivar a la glucógeno sintasa de hepatocitos aislados de rata, de una manera dependiente del tiempo y la concentración empleada. Por otra parte, el vanadato es un potente activador de la glucógeno fosforilasa. El efecto del vanadato sobre la glucógeno fosforilasa es dependiente de calcio, mientras que el efecto sobre la glucógeno sintasa es independiente de catión. Ello parece indicar que el mecanismo a través del cual el vanadato actúa sobre ambas enzimas es diferente.

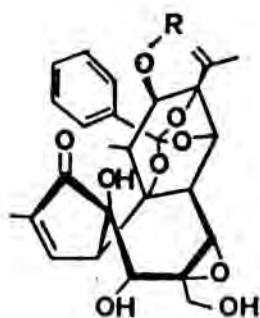
1.6.5 ESTERES DE FORBOL Y COMPUESTOS RELACIONADOS

Se denominan esteres de forbol a una familia de compuestos tetracíclicos (Esquema V) que presentan una extraordinaria actividad biológica (262). En efecto, no tan sólo se han clasificado como unos de los más potentes agentes carcinogénicos conocidos, sino que investigaciones realizadas con el fin de averiguar su mecanismo de acción como inductores de tumores han demostrado su capacidad para

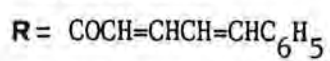
**ESQUEMA V RELACIONES ESTRUCTURALES ENTRE
DIVERSOS ESTERES DE FORBOL Y LA
MEZEREINA**



	R_{12}	R_{13}
FORBOL	H	H
TPA	$\text{CO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	COCH_3
4β-PDD	$\text{CO}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$	$\text{CO}(\text{CH}_8)\text{CH}_3$
PBu₂	$\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	$\text{CO}(\text{CH}_2)\text{CH}_3$



MEZEREINA



desencadenar numerosas alteraciones bioquímicas y funcionales en diversos tipos de células y tejidos.

Estos efectos incluyen incrementos en el transporte de hexosas (263), síntesis de prostaglandinas (264) y producción de poliaminas (265), entre otros. De la misma manera es conocida la capacidad de estos compuestos para provocar agregación plaquetaria y producir la movilización de serotonina, posiblemente por activación de una proteína de 40 Kd mediante un proceso de fosforilación (158).

Por otra parte, se ha descrito un efecto regulador de los esteres de forbol a nivel del receptor de los factores de crecimiento epidérmico, puesto que disminuyen su afinidad aparente (266-268) e inhiben a la actividad tirosina quinasa de los mismos (269,270). En los últimos tiempos han sido obtenidas evidencias de que estos procesos podían ser inducidos por la fosforilación del propio receptor. Así, McCaffrey y col. (271) han demostrado que el 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) es capaz de inducir la fosforilación del receptor de los citados factores en células A431, a la vez que produce un bloqueo de su actividad tirosina quinasa y disminuye la afinidad del receptor por sus agonistas. Davis y Czech (12), por su parte, han puesto en evidencia que esta fosforilación tiene lugar en la treonina 654 del citado receptor en el caso de fibroblastos humanos y células de carcinoma epidérmico A431. Poco antes, Iwashita y Fox (11) habían demostrado en células A431 que la fosforilación provocada por el TPA era de distinta naturaleza

que la inducida por el propio factor de crecimiento epidérmico.

Desde 1982 se han descrito numerosas similitudes entre los receptores celulares para los esteres de forbol y la proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos (proteína quinasa C). Esta actividad proteína quinasa fue identificada por vez primera en cerebro de rata y otros tejidos de mamíferos (150-152).

En este sentido, Nishizuka y col.(158) demostraron la capacidad de algunos esteres de forbol para activar directamente a la proteína quinasa C "in vitro". La causa de esta activación, según los análisis cinéticos realizados, resultó ser que estos compuestos podían sustituir a activadores fisiológicos como los 1,2-diacilgliceroles. La explicación de este hecho parece ser la semejanza estructural entre ambos tipos de compuestos. Como hemos comentado en otro lugar, los 1,2-diacilgliceroles son productos generados transitoriamente por el proceso de recambio de los fosfatidilinositoles de membrana y su producción está relacionada con la interacción entre determinadas señales extracelulares y sus receptores.

En 1983, Niedel y col. (159) aportaron nuevos datos sobre la identidad entre los receptores de los esteres de forbol y la proteína quinasa C, al establecer que los citados receptores copurificaban con la actividad proteína quinasa y presentaban el mismo grado de dependencia por el calcio y los

fosfolípidos.

Por otro lado, ha sido posible encontrar una buena correlación entre los efectos celulares provocados por los esteres de forbol con actividad biológica y su capacidad para activar a la proteína quinasa C "in vitro".

En los últimos tiempos diversos autores han estudiado los efectos de los esteres de forbol sobre el metabolismo intermediario en diversos tejidos. En este sentido, Skoglund y col. (272) han puesto de manifiesto que el tratamiento de adipocitos aislados con TPA da lugar a una estimulación de la oxidación de la glucosa y de la síntesis de lípidos. Este último efecto ha sido observado muy recientemente (273) en hepatocitos de rata, sugiriendo que los esteres de forbol mimetizan los efectos celulares a corto plazo de la insulina.

En lo que hace referencia al metabolismo del glucógeno, los datos conocidos hasta el momento son contradictorios. Algunos autores han observado efectos de estos compuestos análogos a los de la insulina. Así, por ejemplo, Corvera y García-Sáinz (274) observaron en hepatocitos aislados de rata que el TPA inhibía la glucogenolisis producida por la adrenalina en presencia del β -bloqueante propranolol, pero que en cambio no afectaba la glucogenolisis inducida por la vasopresina, la angiotensina II, el ionóforo A23187 o el glucagon. El propio ester de forbol, por si solo, no exhibía efecto alguno sobre la degradación del glucógeno.

Con posterioridad Lynch y col. (224) recomprobaron que el TPA inhibía la estimulación de la fosforilasa producida por agentes α -adrenérgicos pero no por β -adrenérgicos o glucagon. La inhibición que se producía sobre los efectos de la vasopresina podía ser superada por altas concentraciones de la hormona. Por otra parte, dichos investigadores no observaron efectos sinérgicos ni antagónicos entre el TPA y el ionóforo A23187, un potente activador de la glucógeno fosforilasa.

Sorprendentemente, otros autores han obtenido diferentes resultados al examinar la incidencia de los esteres de forbol en el metabolismo del glucógeno hepático. Fain y col. (275) observaron un pequeño efecto activador del TPA sobre la glucógeno fosforilasa en ratas alimentadas, el cual era fuertemente incrementado por la adición del ionóforo A23187. Muy recientemente, Van der Werve y col. (276) han observado el mismo fenómeno, así como la contrarrestación de la activación de la fosforilasa por fenilefrina.

La estimulación de la glucogenolisis por el TPA en hígado perfundido de rata ha sido puesta en evidencia por Kimura y col. (42). Este efecto era fuertemente bloqueado al eliminar el calcio del líquido de perfusión. Conocidos efectores del tipo "anti-calmodulina", como la trifluoperacina inhibían el efecto de TPA aún en presencia de calcio en el medio de perfusión. Por otra parte, el efecto del ester de forbol no era incrementado en presencia del ionóforo A23187.

Experimentos realizados por Roach y Goldman (214) han puesto de manifiesto que la incubación de hepatocitos de rata con TPA así como con otros esteres de forbol biológicamente activos producía una inactivación de la glucógeno sintasa de una manera dependiente del tiempo y de la concentración del efector. En ningún caso la actividad fosforilasa se veía afectada de manera significativa. Estos autores pusieron de manifiesto que los esteres de forbol no activos fisiológicamente e incapaces de activar a la proteína quinasa C "in vitro", tales como el forbol 13-acetato o el propio forbol, no producían cambio alguno en la actividad glucógeno sintasa.

Como se desprende de los datos aportados hasta el momento, la influencia de los esteres de forbol sobre el metabolismo del glucógeno hepático es discutida en cuanto a sus características, si bien se acepta en general que los mecanismos de acción puestos en marcha por estos compuestos podrían ser comunes a los de algunos efectores anteriormente conocidos.

La capacidad de los esteres de forbol para provocar tumores dérmicos en ratón es compartida por algunas sustancias relacionadas estructuralmente, como la mezereína (Esquema V). Esta compleja molécula es capaz de provocar la estimulación de fenotipos neoplásicos, de la síntesis de DNA, etc.. Más recientemente, ha sido considerada como un potente inductor de tumores de "segunda etapa" (160,161), es decir, cuando el compuesto es empleado tras una breve

exposición del animal a otro agente cancerígeno.

La mezereína, al igual que algunos esteres de forbol, es capaz de activar "in vitro" a la proteína quinasa C (162), a pesar de que en su estructura no se encuentra la marcada semejanza que con los 1,2-diacilgliceroles poseen los esteres de forbol. Sin embargo, estudios de difracción de rayos X sobre la estructura y conformación de la mezereína (277) demuestran que este compuesto se asemeja notablemente a un ester de forbol y, de hecho, puede desplazar al [H]³forbol 12,13-dibutirato del lugar de unión para el TPA en la membrana celular (278) o en la molécula de proteína quinasa C "in vitro". No se conocen efectos de este compuesto sobre el metabolismo del glucógeno.

2. MATERIALES

Y METODOS

2.1 ANIMALES EMPLEADOS

Las células hepáticas se obtenían, en todos los casos, a partir de ratas Wistar adultas (180-250 g de peso) alimentadas con dieta de laboratorio (Panlab A03) y con acceso a agua de suministro. Todos los experimentos se realizaron con ratas macho. Los animales, procedentes del estabulario de la Facultad de Farmacia, se trasladaban varios días antes de ser utilizadas al estabulario del laboratorio, donde eran mantenidas en condiciones de temperatura controlada (20-22° C), se les permitía el libre acceso al alimento y estaban sometidas al ritmo luz-oscuridad propio de la estación.

La práctica totalidad de los experimentos descritos en el presente trabajo se realizaron empleando ratas sometidas a un ayuno de 22-24 horas . Para ello, en el momento adecuado, dos ejemplares se colocaban en una jaula que disponía únicamente de suministro de agua.

Todos los animales fueron sacrificados entre las 9 y las 10 horas de la mañana, con el fin de reducir en lo posible la incidencia de los ritmos circadianos en los procesos estudiados.

Para la purificación de la glucógeno sintasa hepática se emplearon ratas Wistar o Sprague-Dawley adultas, mantenidas en un ciclo normal de luz-oscuridad. Aproximadamente 36 horas antes de iniciar el proceso de purificación se les retiraba el alimento, que les era restituido 12 horas antes del sacrificio. Esta manipulación tenía por objeto asegurar la ingesta por los animales en las horas previas a su sacrificio y redundaba en incrementos apreciables en el rendimiento durante el proceso de purificación del enzima.

Los animales empleados para la obtención de anticuerpos fueron conejos New Zealand adultos, estabulados separadamente, y a los que se permitía el libre acceso a una alimentación normal de laboratorio (Panlab 112) y a agua de suministro.

2.2 PURIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTASA HEPATICA

La purificación de la glucógeno sintasa de hígado de rata, en su forma independiente de glucosa-6-fosfato, se llevó a cabo según el método descrito en (24). Fundamentalmente el proceso constaba de los siguientes pasos.

2.2.1 OBTENCION DEL SEDIMENTO DE GLUCOGENO

En cada proceso de purificación se empleaban de 30 a 40 ratas acondicionadas según 2.1. Los animales eran sacrificados por decapitación y a continuación desangrados. Se les retiraba rápidamente el hígado, que era lavado superficialmente en una solución amortiguadora de pH (solución A) y, de inmediato, homogeneizado mediante un sistema Potter-Elvehjem rodeado de hielo. La solución A, que se empleaba a razón de 3 ml por gramo de tejido, estaba compuesta por Tris 50 mM, sacarosa 0,6 M, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 25 µg/ml, TLCK 0,1 mM y benzamidina 0,5 mM, ajustada a pH 7,4 con ácido clorhídrico y era mantenida constantemente a 4° C.

El homogenado tisular así obtenido era centrifugado a 13000 xg durante 30 minutos a 4° C. El sobrenadante o extracto crudo se filtraba a través de lana de vidrio y era inmediatamente sometido a ultracentrifugación a 117000 xg durante 90 minutos y a 4° C.

El sobrenadante de esta centrifugación se decantaba y se eliminaba la fracción microsomal por suave volteo de los tubos. El sedimento, casi incoloro y constituido por glucógeno y proteínas asociadas, era lavado cuidadosamente y resuspendido en un volumen de solución amortiguadora B de, aproximadamente, una décima parte del inicial. Esta solución B era idéntica a la solución A excepto en la

concentración de sacarosa, que pasaba a ser de 250 mM, y en que contenía sulfato de sodio 2 mM, cloruro de magnesio 10 mM y glucosa-6-fosfato 0,5 mM.

A esta suspensión se le añadían 500 unidades de α -amilasa salivar humana purificada en nuestro propio laboratorio según el método de Bernfeld (279) y la mezcla se mantenía a 30° C durante 60 minutos. Esta incubación tenía por objeto degradar el glucógeno presente hasta el punto de lograr la liberación de la glucógeno sintasa. Por otro lado, proporcionaba a las proteína fosfatasas endógenas las condiciones idóneas para defosforilar a la glucógeno sintasa. Finalizada la incubación se procedía a ultracentrifugar la suspensión a 170000 xg durante 30 minutos a 4° C, descartándose el sedimento y restos microsomales si los hubiera.

2.2.2 CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

El sobrenadante obtenido (generalmente 70-80 ml) era cromatografiado a través de una columna de DEAE-celulosa (Whatman DE 52, 4x6 cm) equilibrada con la solución B exenta de cloruro de magnesio, sulfato de sodio y glucosa-6-fosfato. Tras introducir la muestra, la columna era lavada con 100 ml de la solución de equilibrado y, a continuación, con 600 ml de la misma solución conteniendo cloruro de sodio 50 mM, en un proceso que se prolongaba durante toda una noche. Cuando

los valores de la absorción a 280 nm en el líquido de elución retornaban a los niveles basales, la actividad glucógeno sintasa era eluida aplicando la solución B suplementada con cloruro de sodio 200 mM (aproximadamente 100 ml). Todo el proceso se llevaba a cabo a 4° C.

2.2.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Las fracciones que contenían la actividad glucógeno sintasa se reunían y eran cromatografiadas directamente a través de una columna de afinidad (1,5x2 cm) constituida por Sepharose 4B-hexametilenaminosuccinil-glucosamina-6-fosfato, cuya síntesis se realizaba en nuestro propio laboratorio (véase 2.12.1).

La columna era equilibrada previamente a 4° C con una solución amortiguadora de pH (solución C) compuesta por imidazol 50 mM, sacarosa 250 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM, ajustada a pH 7,4 con ácido clorhídrico. Tras introducir la muestra, la columna era lavada con 10 ml de la misma solución conteniendo cloruro de sodio 200 mM. Finalizado el proceso, el sistema se trasladaba a temperatura ambiente y el lavado se continuaba empleando 10 ml de la solución descrita.

La actividad glucógeno sintasa era eluida empleando la

solución C conteniendo cloruro de sodio 400 mM y glucosa-6-fosfato 10 mM. No se apreciaba posterior elución de actividad glucógeno sintasa a mayores fuerzas iónicas y/o mayor concentración del efector alostérico.

2.2.4 CONCENTRACION Y DIALISIS

Las fracciones con actividad se concentraban por precipitación con etanol absoluto hasta alcanzar la concentración final del 20%, en presencia de glucógeno a la concentración de 1 mg/ml y operando en un baño de hielo-sal entre 0-2° C. La adición del alcohol se efectuaba lentamente y con agitación suave. Una vez finalizada la adición, la agitación se mantenía durante 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se procedía a una centrifugación a 18000 xg durante 20 minutos operando a -15° C. El precipitado recogido se resuspendía en, aproximadamente, 1 ml de solución amortiguadora D, la cual estaba compuesta por Tris 50 mM, glicerol 25% (v/v), EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM, ajustándose el pH a 7,8 con ácido clorhídrico. El resuspendido se dializaba exhaustivamente frente a la misma solución con el fin de eliminar restos de etanol y glucosa-6-fosfato que pudieran contaminar la preparación.

Finalmente, el dializado se distribuía en fracciones que eran conservadas a -70° C.

2.3 OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-GLUCOGENO SINTASA DE HIGADO DE RATA

Las preparaciones de antisuero anti-glucógeno sintasa hepática se obtuvieron mediante inoculación en conejos de muestras del enzima purificado a homogeneidad a partir de hígado de rata.

2.3.1 OBTENCION DEL ANTISUERO ANTI-GLUCOGENO SINTASA

La preparación de la muestra a inocular se llevaba a cabo de la siguiente manera. A un cierto volumen (100-200 μ l) de una preparación de glucógeno sintasa hepática que contenía 25 μ g del enzima se le añadía una disolución acuosa de cloruro de sodio 0,15 M y maltosa al 10% (p/v), ajustada a pH 7,4, hasta completar un volumen de 0,5 ml. A esta solución se añadían 0,5 ml de adyuvante de Freund completo (Difco). La mezcla se agitaba vigorosamente hasta completa homogeneización y, de inmediato, se inyectaba por vía subcutánea en el lomo y cuartos traseros del animal. El volumen total de muestra se distribuía entre 8-12 puntos de inoculación.

Transcurridos de 10 a 12 días de la primera inoculación, el proceso se repetía empleando doble cantidad de enzima. En este caso se utilizaba adyuvante de Freund incompleto, con el fin de no desarrollar pústulas en el animal. Con estas mismas

características se procedía a una tercera inoculación pasados 10-12 días de la segunda inyección.

Transcurridas dos semanas desde la última inoculación se llevaba a cabo la extracción de una muestra de sangre del animal, con el fin de comprobar la formación de anticuerpos y su título en suero.

A tal efecto se disponía al conejo en un soporte adecuado y se humectaba ligeramente una de sus orejas con xilol, lo cual desencadenaba una potente respuesta vasodilatadora. Empleando un bisturí, se seccionaba longitudinalmente la vena marginal de la oreja en una extensión de 2-3 mm y a una distancia de unos 3 cm de la cabeza. La sangre que fluía era recogida en un tubo de centrifuga. En los sangrados que tenían por objeto verificar la presencia de anticuerpos en el animal no se recogían más de 4-5 ml de sangre. Una vez obtenidos se taponaba la herida con un algodón empapado en alcohol etílico hasta que cesaba la hemorragia.

Comprobada la presencia de anticuerpos y el título adecuado de los mismos se repetía el sangrado 2 o 3 veces, con intervalos de una semana, recogiendo en cada caso entre 30 y 50 ml de sangre.

La sangre recolectada se incubaba durante 2 horas a 30° C a fin de lograr la retracción del coágulo. Transcurrido este tiempo se centrifugaba a 5000 xg durante 30 minutos. El

sobrenadante se recogía y se almacenaba a -10° C.

2.3.2 PURIFICACION DE LA FRACCION DE GLOBULINAS DEL ANTISUERO

La preparación de una fracción sérica enriquecida en globulinas se llevó a cabo por precipitación del suero con sulfato de amonio. Para ello, a un volumen de suero se añadió lentamente un volumen igual de una disolución de sulfato de amonio al 90% de saturación, ajustada a pH 7,0. Después de agitar la suspensión durante 30 minutos a 4° C se centrifugó a 10000 xg durante 20 minutos a la misma temperatura. El precipitado obtenido se resuspendió en una solución compuesta por Tris 50 mM y cloruro de sodio 0,15 M, ajustada a pH 7,4, hasta un volumen de, aproximadamente, la mitad del suero inicial. El resuspendido se dializó repetidamente frente a la misma solución y, tras ser distribuido en fracciones, se almacenó a -10° C.

El enriquecimiento en la fracción de globulinas de la preparación así obtenida se comprobó por comparación de los patrones electroforéticos en acetato de celulosa de muestras antes y después de ser precipitadas por la sal.

Paralelamente se obtuvieron preparaciones de globulinas procedentes de sueros obtenidos a partir de animales no inmunes, siguiendo la pauta descrita.

2.4 CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-GLUCOGENO SINTASA

La capacidad de las preparaciones de anticuerpos anti-glucógeno sintasa de hígado de rata para reconocer y precipitar al enzima hepático fue investigada de diferentes maneras.

2.4.1 DOBLE DIFUSION EN AGAR

Las placas de agar empleadas como medio de difusión contenían glicina al 7,5% (p/v), cloruro de sodio al 1% (p/v), azida sódica al 0,1% (p/v) y agar (Difco) al 2% (p/v).

La mezcla era llevada a ebullición hasta disolución completa del agar y, tras ser ligeramente atemperada, se repartía en placas de Petri (90 mm de diámetro) dispuestas sobre un soporte totalmente plano. Una vez solidificada la solución se practicaban orificios de 4 mm de diámetro en los vértices y centro de un hexágono regular. Las placas así preparadas podían almacenarse varios días a 4° C convenientemente selladas.

Las pruebas de doble difusión se llevaban a cabo de la siguiente manera. Se sembraba en el pocillo central una determinada cantidad de antisuero o preparación de globulinas (10-15 μ l). Paralelamente se preparaban placas en cuyo

pocillo central se depositaba el mismo volumen de suero o globulinas procedentes de animales no inmunes. En los pocillos externos se sembraban diferentes diluciones de glucógeno sintasa hepática purificada o, en su caso, de extractos crudos hepáticos.

Tras la siembra, las placas se almacenaban a 4° C en una atmósfera saturada de humedad durante 24-72 horas, verificando diariamente la aparición de arcos de precipitación.

2.4.2 INMUNOELECTROFORESIS SEGUN LAURELL

La reacción entre las preparaciones de anticuerpos anti-glucógeno sintasa hepática y el enzima puro o el existente en extractos celulares se puso de manifiesto mediante inmunolectroforesis "rocket".

Para ello se preparaba una solución que contenía Tris 0,225 M y ácido bórico 0,125 M, cuyo pH era de 8,6. En ella se disolvía en caliente agarosa de baja electroendósmosis, a una concentración final del 1% (p/v). Una vez disuelta, la solución se mantenía a 56° C y se añadía, en agitación, la adecuada cantidad de la preparación del anticuerpo. Inmediatamente la solución era extendida sobre un soporte plástico (8x4 cm), procurándose una distribución uniforme de la misma. Sobre la placa solidificada se practicaban sendos

pocillos de 4 mm de diámetro, aproximadamente a 1 cm de uno de sus extremos. En ellos se depositaban las muestras, cuyo volumen era inferior a 15 μ l.

Las electroforesis se llevaban a cabo utilizando una solución extemporánea compuesta por Tris 0,125 M y glicina 0,15 M, a pH 8,6 y a una intensidad de corriente de 5 mA por placa. La duración del proceso era de 4 a 5 horas.

Finalizada la electroforesis, el gel de agarosa era extraído de su soporte y sumergido en una solución salina isotónica, con el fin de eliminar el exceso de proteínas no precipitadas. Estos lavados se prolongaban por espacio de 24 horas, con numerosas renovaciones de la solución salina.

Los arcos de precipitación, frecuentemente visibles en este momento, podían ser puestos de manifiesto con mayor eficacia mediante un proceso de tinción semejante al descrito en 2.10.1.3 para las electroforesis en gel de poliacrilamida.

2.4.3 TITULACION DEL ANTISUERO

La capacidad del antisuero, así como de la fracción de globulinas obtenidas a partir del mismo, para reconocer e inactivar a la glucógeno sintasa se puso de manifiesto enfrentando las citadas preparaciones con enzima hepático purificado o extractos crudos obtenidos a partir de hígado

entero o de hepatocitos aislados de rata y verificando la desaparición de la actividad enzimática tras la incubación con el anticuerpo.

Estos ensayos se llevaron a cabo empleando cantidades constantes de la fuente de antígeno y variando la cantidad de anticuerpo. En resumen, a un volumen fijo del antígeno que contenía de 40 a 80 mU de glucógeno sintasa se adicionaban volúmenes variables de antisuero o de fracción de globulinas anti-glucógeno sintasa. La concentración de proteína y el volumen final se ajustaban empleando las adecuadas soluciones de albúmina de suero bovino en Tris 50 mM, cloruro de sodio 0,15 mM y β -mercaptoetanol 20 mM, ajustadas a pH 7,4 con ácido clorhídrico.

A continuación la mezcla descrita se incubaba 4 horas a 15° C, según lo descrito en (69) o 2 horas a 4° C. Tras ello se procedía a centrifugar las muestras durante 6 minutos a 12800 xg en una microcentrífuga (Eppendorf modelo 3200). En el sobrenadante obtenido se realizaban las determinaciones de actividad glucógeno sintasa total y, en su caso, de actividad glucógeno fosforilasa.

Paralelamente se realizaban incubaciones en las que las preparaciones de anticuerpos anti-glucógeno sintasa eran sustituidas por sueros o fracciones de globulinas procedentes de animales no inmunes.

2.5 PREPARACION DE LAS PROTEINA QUINASAS EMPLEADAS

A lo largo del presente trabajo se han empleado esporádicamente diversas proteína quinasas con el fin de lograr la fosforilación "in vitro" de la glucógeno sintasa hepática. Resumimos brevemente los métodos de purificación aplicados a cada una de ellas.

La proteína quinasa dependiente de AMPc fue purificada a partir de músculo esquelético de conejo e hígado de rata siguiendo el método descrito por Beavo y col. (279). El proceso implicaba cromatografías en columna de fosfocelulosa, DEAE-celulosa e hidroxapatita.

La obtención de preparaciones de caseína quinasa-1 (CK-1) y caseína quinasa-2 (CK-2) se llevó a cabo a partir de músculo esquelético de conejo o hígado de rata, mediante el empleo de una cromatografía en columna de fosfocelulosa, seguida por una cromatografía de afinidad constituida por Sepharose-caseína y una nueva cromatografía en fosfocelulosa, tal como fue descrito por Itarte y col. (280).

El método utilizado para la obtención de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) a partir de músculo esquelético de conejo fue el descrito por Embi y col. (176). Se llevó a cabo mediante el empleo de cromatografía en DEAE-celulosa, seguida de cromatografía en hidroxapatita.

2.6 FOSFORILACION "IN VITRO" DE LA GLUCÓGENO SINTASA

En primer lugar las preparaciones de glucógeno sintasa hepática eran incubadas durante 30 minutos a 30° C con una disolución que contenía Tris 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, β -mercaptoetanol 50 mM y glucógeno al 1%, ajustada previamente a pH 7,8. A continuación, el enzima era incubado con la proteína quinasa en una mezcla de reacción que contenía β -glicerofosfato sódico 25 mM (pH 7,0), EDTA 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, acetato de magnesio 10 mM y [γ -³²P] ATP 0,125 M. La concentración de glucógeno sintasa era de 0,10 a 0,15 mg/ml y la de la proteína quinasa de 3 a 5 U/ml. La actividad específica del [γ -³²P]ATP empleado oscilaba entre 500 y 1000 cpm/pmol.

Transcurrido el tiempo de reacción (generalmente de 60 a 90 minutos) y con el fin de determinar el número de fosfatos introducidos por subunidad enzimática, se tomaban alícuotas de 10 μ l de la mezcla de reacción que se aplicaban sobre un papel cromatográfico ITLC SG (Gelman Instrument Co.) en el lugar donde previamente habían sido depositados 20 μ l de una solución de ácido tricloroacético al 20% (p/v). A continuación se llevaba a cabo una cromatografía ascendente empleando como fase móvil una solución compuesta por cloruro de potasio 0,2 M y ácido tricloroacético al 20%. Una vez desarrollada la cromatografía, los papeles eran secados por calor y se recortaba un fragmento del papel de 2,5 cm (1,5 cm

por encima y 1,0 cm por debajo del punto de aplicación).

El papel seco era introducido en un vial que contenía 15 ml de una solución de PPO al 0,5% en tolueno y su radioactividad era medida en un espectrómetro de centelleo líquido (Isocap 300, Searle Inc.).

En los casos en que la fosforilación "in vitro" de la glucógeno sintasa era realizada con el fin de someter al enzima a un proceso electroforético o analítico (fragmentación, hidrólisis, etc.), la reacción de fosforilación era detenida por adición de un volumen mitad del volumen de reacción de una solución de EDTA 25 mM, ajustada previamente a pH 7,7. A continuación el enzima era precipitado por adición de TCA a una concentración final del 10% o inmunoprecipitado por adición de la adecuada cantidad de la preparación del anticuerpo e incubación a 4° C durante 2 horas.

2.7 OBTENCION DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

El empleo de células parenquimáticas hepáticas aisladas como material de partida para el estudio de numerosos procesos metabólicos se ha generalizado en los últimos 20 años, sustituyendo en parte a los estudios realizados sobre hígado entero perfundido. Este último sistema experimental, adecuado en numerosas ocasiones, presenta ciertos

inconvenientes como son la falta de homogeneidad (más de un 40% de células hepáticas pueden no ser parenquimáticas), viabilidad limitada, etc.

En 1967, Howard y col. (282) propusieron un método enzimático, basado en el empleo de colagenasa, para la obtención de suspensiones de hepatocitos aislados. Berry y Friend (283) introdujeron en 1969 notables mejoras en el método, basadas en la perfusión del hígado entero con soluciones fisiológicas que incluían colagenasa como agente disgregante. De esta manera era posible obtener preparaciones de células hepáticas intactas y con altos rendimientos. Desde entonces otros autores han introducido en la metodología variaciones particulares (284,285).

El método de obtención de hepatocitos seguido en el presente trabajo se fundamenta en la perfusión del hígado de rata "in situ" con una solución de colagenasa, siguiendo esencialmente lo descrito por Massagué y col. (46).

Las ratas eran anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de fenobarbital (Luminal) en dosis de 200 mg por kilogramo de peso corporal. Cuando el animal no respondía a estímulos externos era dispuesto en un soporte dotado de drenaje y se procedía a abrir el abdomen, dejando al descubierto la vena porta. Esta era canulada con un trocar de 1,2 mm de diámetro que se fijaba mediante una ligadura. De esta manera el medio de perfusión irrigaba el hígado, abandonando el sistema circulatorio del animal por la vena

cava inferior, previamente seccionada a nivel de la zona inferior de la cavidad abdominal.

El medio de perfusión era el descrito por Hanks (286), exento de calcio, siendo su composición: NaCl 137 mM; KCl 5,4 mM; Na HPO_2 6,7 mM y KH PO_2 8,8 mM, ajustado a pH 7,4 con ácido clorhídrico y enriquecido con glucosa a la concentración de 5 mM. Previamente el medio de perfusión era atemperado a 37-38° C y gaseado intensamente con oxígeno medicinal saturado de agua. Todo el proceso de perfusión se llevaba a cabo en una cámara especialmente acondicionada cuya temperatura ambiental era mantenida a 38° C por convección de aire caliente.

Tras canular la vena porta se procedía a abrir la caja torácica, a fin de canular la vena cava inferior a través de la aurícula derecha. Ello se realizaba empleando un tubo de plástico semirígido de 1,5 mm de diámetro, que era fijado con una ligadura. Por esta vía el líquido de perfusión abandonaba el hígado cuando, inmediatamente después, se procedía a ligar la vena cava inferior por encima de las venas renales.

En todo momento el líquido de perfusión era impulsado por una bomba peristáltica (Gilson, Minipuls II con cabezal de alto flujo) que proporcionaba, en esta primera fase, un flujo de 45 ml/minuto. Tanto la solución de perfusión que abandonaba el hígado por la vena cava como la que fluía a través de las paredes del órgano, era desechada (alrededor de 300 ml).

Una vez el volumen del líquido en el reservorio y en el circuito de perfusión se reducía a unos 75 ml, se devolvía al reservorio tanto el perfusato que abandonaba el hígado como el drenaje recogido en el soporte, con lo que la perfusión se tornaba recirculante. En ese momento se añadía al medio de perfusión una disolución, previamente atemperada, de colagenasa (Worthington, tipo I) y albúmina sérica bovina (Fracción V, dializada) en 25 ml de solución de Hanks. El pH final era ajustado a 7,4 empleando una disolución 1 M de hidróxido sódico. Las concentraciones finales de colagenasa y albúmina en el medio de perfusión eran de 0,4 y 15 mg/ml, respectivamente. Durante los siguientes 10 minutos de perfusión, el flujo era elevado paulatinamente hasta alcanzar el valor de 65 ml/minuto.

Transcurridos de 12 a 15 minutos del inicio de la perfusión con colagenasa, el hígado era cuidadosamente extirpado, sumergido brevemente en solución de Hanks y disgregado mediante suave agitación en el seno de 50 ml de una solución de Hanks que incluía glucosa a la concentración de 5 mM y 15 mg/ml de albúmina sérica bovina.

La suspensión celular así obtenida se transfería a un matraz Erlenmeyer el cual, tras ser intensamente gaseado con oxígeno medicinal, se cerraba herméticamente y se mantenía entre 8 y 10 minutos a temperatura ambiente en suave agitación.

La suspensión era filtrada a través de una malla de nylon de 150 μm de trama y el filtrado resultante se centrifugaba a 400 rpm (40 xg) durante 2 minutos en una centrífuga Janetzki (modelo T52.1). El sobrenadante era eliminado por succión o decantación cuidadosa. El sedimento celular se resuspendía en unos 40 ml de solución de Hanks exenta de glucosa y previamente oxigenada. El ciclo de resuspensión y centrifugación era repetido dos veces con el fin de eliminar la mayor parte de las células no parenquimáticas o de las células parenquimáticas dañadas estructuralmente. Este proceso, que se efectuaba a temperatura ambiente, era de gran influencia en la cantidad y calidad de la preparación celular obtenida. Todo el material empleado en contacto con las células era de plástico.

Tras la última centrifugación, el sedimento celular era resuspendido en 40-60 ml de un medio Krebs-Ringer bicarbonatado, compuesto por cloruro sódico 118,5 mM, cloruro potásico 4,8 mM, cloruro cálcico 2,5 mM, bicarbonato sódico 25 mM, fosfato monopotásico 1,2 mM y sulfato magnésico 1,2 mM.

En aquellos experimentos en que las células eran sometidas a incubación con [³²P]ortofosfato, el citado medio se preparaba introduciendo dos importantes modificaciones:

- 1) La concentración de fosfato se reducía a 0,1 mM con el fin de que la radioactividad específica

del medio de incubación fuera suficientemente alta. Paralelamente, la concentración de cloruro de sodio se incrementaba hasta 123 mM.

- 2) Se incluían en la composición del medio lactato sódico y piruvato sódico a las concentraciones de 16 mM y 4 mM, respectivamente, a fin de proveer a las células de sustratos gluconeogénicos durante la incubación. Como se pudo comprobar, la adición de los citados metabolitos no afectaba a los parámetros estudiados.

En cualquier caso el medio era gaseado intensamente con una mezcla de O_2/CO_2 (95:5) por lo menos desde 30 minutos antes de su utilización, precaución necesaria para estabilizar el pH de la misma a 7,4.

En las condiciones citadas la suspensión celular obtenida contenía entre $5 \text{ y } 7 \times 10^6$ células/ml, determinado por conteo microscópico en cámara de Thomas. La evaluación de la viabilidad celular se llevaba a cabo rutinariamente en base al criterio de exclusión del colorante Azul de Tripano, operando esencialmente según (287). El porcentaje de células viables, capaces por lo tanto de excluir el colorante, era de alrededor del 90%.

En determinados experimentos la integridad metabólica celular era comprobada, además, por determinación de los niveles de ATP intracelular al término de las incubaciones.

Una evidencia adicional sobre la calidad de las preparaciones celulares obtenidas la proporcionaba el hecho de que éstas eran sensibles a la acción hormonal en las condiciones descritas.

Según nuestra propia experiencia la viabilidad e integridad metabólica de los hepatocitos obtenidos puede llegar a optimizarse respetando las siguientes condiciones:

- 1) Utilizar lotes de colagenasa suficientemente activos, a fin de no prolongar en exceso la perfusión hepática con el enzima. No parece aconsejable que este período supere los 15 minutos de duración.

- 2) Incluir en el medio de Hanks una albúmina de suero bovino exhaustivamente dializada frente a tampón fosfatos 5 mM, ajustado a pH 7,4 con hidróxido sódico (o emplear preparaciones comerciales que garanticen tal proceso). De esta manera se asegura la eliminación de sustancias tales como etanol y ácido acético que son contaminantes normales tras el proceso de obtención de la proteína y que pueden resultar tóxicos celulares (288).

2.8 INCUBACIONES CELULARES

2.8.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS INCUBACIONES

La suspensión celular obtenida según 2.7 era distribuida rápidamente en viales de plástico de 30 ml de capacidad dotados de tapón de rosca. La dosificación de las células se hacía mediante una pipeta automática (Macro-Set, Oxford), empleando una punta de plástico de boca ancha. Normalmente se incubaban 5 ml de la suspensión de hepatocitos por vial.

Durante todo el período de incubación los viales eran gaseados continuamente con una mezcla de oxígeno y anhídrido carbónico (95:5). La mezcla gaseosa, después de ser humidificada por borboteo en agua tridestilada, era inyectada a flujo constante a través del tapón del vial. De esta manera era posible crear en el interior del vial la atmósfera necesaria para mantener la viabilidad celular y el pH del medio que, en ausencia de CO_2 , tiende a aumentar con el tiempo.

Las incubaciones se realizaban en un baño termostatzado y provisto de agitación (Unitronic-320, Selecta). La temperatura era regulada de tal manera que la suspensión celular se mantuviera a 37° C. La agitación se establecía a 100 oscilaciones por minuto, a fin de impedir la sedimentación de las células.

Previamente a la incubación a 37° C los viales conteniendo las suspensiones celulares eran agitados a temperatura ambiente durante 15 minutos.

2.8.2 PRE-INCUBACION DE LAS CELULAS CON 32 PIFOSFATO

Una vez dispuestos los viales en el baño a 37° C se procedía a añadir, en los tiempos adecuados, el ortofosfato radioactivo. Se adicionaban, normalmente, de 50 a 100 μ l de una disolución del isótopo (5-10 mCi/ml, PBS-13, Amersham).

La incubación se prolongaba por espacio de 45-60 minutos, tiempo suficiente para alcanzar una radioactividad específica constante del ATP intracelular.

2.8.3 INCUBACION CON EFECTORES

Transcurridos de 45 a 60 minutos de la adición del ortofosfato radioactivo, las células eran incubadas con los efectores adecuados. Estos eran añadidos a la suspensión celular en un pequeño volumen (generalmente 50 μ l) a partir de una disolución madre preparada a la concentración conveniente. Cuando el efector era de naturaleza polipeptídica el solvente empleado en todos los casos era una disolución de ácido clorhídrico 3 mM. En el caso de los

esteres de forbol o moléculas de solubilidad análoga se empleaba como disolvente dimetilsulfóxido.

En aquellos experimentos en los que no se requería una incubación previa con fosfato radioactivo el protocolo de incubación con los efectores se llevaba a cabo transcurridos como mínimo 15 minutos desde el momento en que las suspensiones celulares eran llevadas a 37° C.

Una vez transcurrido el tiempo conveniente en cada caso las incubaciones finalizaban al centrifugar el contenido de cada vial (1000 xg, 20 segundos), desechar el sobrenadante y homogeneizar el sedimento celular.

2.9 TECNICAS DETERMINATIVAS

2.9.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTASA

La actividad glucógeno sintasa era determinada en todos los casos en función de la incorporación de [¹⁴C]glucosa en la molécula de glucógeno a partir del sustrato uridina difosfo[U-¹⁴C]glucosa (289).

La solución empleada en los ensayos contenía UDP[¹⁴C]-glucosa 6,7 mM, glucógeno 10 mg/ml, fluoruro potásico 25 mM, EDTA 20 mM y Tris 50 mM, ajustándose el pH a un valor de 7,8

con ácido clorhídrico. La radioactividad específica del sustrato oscilaba entre 8000 y 12000 cpm/nmol. El glucógeno empleado era purificado previamente empleando una resina intercambiadora de iones (AG 501-X8, Bio Rad Lab.), tras lo cual se precipitaba con etanol al 66% y se secaba a 40°. La determinación de la actividad glucógeno sintasa total se conseguía incorporando a la disolución así preparada el efector alostérico glucosa-6-fosfato a la concentración de 10 mM.

La reacción enzimática se iniciaba al adicionar 30 μ l de la disolución enzimática a determinar (convenientemente diluida en su caso) sobre 60 μ l de la solución de ensayo descrita, previamente atemperada a 30° C. La reacción se prolongaba a esta temperatura el tiempo necesario para que la cantidad de sustrato transformado no excediera el 15% de la totalidad del mismo (usualmente 10-15 minutos).

La reacción enzimática finalizaba al tomar 75 μ l de la mezcla de reacción, los cuales se depositaban sobre un cuadrado de papel Whatman 31 ET (2x2 cm) que se sumergía inmediatamente en etanol al 66% mantenido en frío. El glucógeno precipitado sobre la malla del papel era separado del sustrato no transformado mediante sucesivos lavados de 15, 30 y 30 minutos de duración con etanol al 66%.

Finalizados los lavados el papel conteniendo el glucógeno radioactivo se sumergía brevemente en acetona y se secaba en una estufa.

El papel totalmente seco era introducido en un vial que contenía 15 ml de una disolución de PPO al 0,5% en tolueno y su radioactividad medida en un espectrómetro de centelleo líquido.

2.9.2 DETERMINACION DEL ESTADO DE ACTIVACION DE LA GLUCOGENO SINTASA

El estado de activación de la glucógeno sintasa se expresó bien por el clásico cociente de actividades en ausencia y presencia de glucosa-6-fosfato (289) o bien de acuerdo con el método descrito por Guinovart y col. (290), basado este último en la medida de la actividad glucógeno sintasa a dos diferentes concentraciones de glucosa-6-fosfato.

En el primer caso la actividad de los extractos celulares era determinada directamente empleando, por una parte, una solución de ensayo carente de glucosa-6-fosfato y, por otra, la misma solución conteniendo el efector alostérico a una concentración de 10 mM.

En el segundo caso, la mezcla de ensayo contenía una concentración de UDP-glucosa notablemente inferior (0,2 mM). La concentración del efector alostérico en el ensayo de alta concentración de glucosa-6-fosfato era de 10 mM, mientras que en el ensayo de baja concentración la glucosa-6-fosfato era

reducida a unos valores de 250 μM .

La determinación del estado de activación de la glucógeno sintasa por el método baja glucosa-6-fosfato/alta glucosa-6-fosfato se realizaba sobre extractos celulares previamente diluidos 8 veces con la propia solución de homogeneización.

El método diseñado por Guinovart y col. para determinar el estado de activación del enzima ha sido empleado profusamente a lo largo del presente trabajo, debido a que es muy sensible a los cambios en las propiedades enzimáticas causadas por las variaciones en el estado de fosforilación de la glucógeno sintasa.

2.9.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOGENO FOSFORILASA

La actividad glucógeno fosforilasa era determinada en función de la incorporación de [^{14}C]glucosa a glucógeno a partir de [^{14}C]glucosa-1-fosfato, de acuerdo con el método descrito por Gilboe y col. (291).

La solución de ensayo contenía D- [^{14}C]glucosa-1-fosfato 100 mM (siendo su radioactividad específica de unas 4000 cpm/ μmol), fluoruro potásico 200 mM y glucógeno 10 mg/ml, ajustándose el pH a 6,3. Con el fin de determinar únicamente la actividad de la fosforilasa "a" se incluían en la

solución cafeína y EDTA, ambos a la concentración de 10 mM.

El ensayo se realizaba sobre los sobrenadantes de 10000 xg obtenidos a partir de homogenados celulares, prolongándose durante 5 minutos. Las muestras no sufrían dilución alguna y el ensayo era llevado a cabo siguiendo el protocolo detallado en 2.9.1.

2.9.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE ATP

La determinación de los niveles de ATP se llevaba a cabo mediante el método descrito en (292), con algunas modificaciones.

2.9.4.1 Preparación de las muestras

Se partía de 1 ml de la suspensión celular (5-7 millones de células/ml) a la que se añadía 1 ml de ácido perclórico al 5%, agitándose vigorosamente la suspensión durante 45-60 segundos. La mezcla se centrifugaba en frío durante 10 minutos a 6000 xg. Se tomaba 1 ml del sobrenadante obtenido al cual se añadían 10 µl de indicador universal. El sobrenadante ácido era neutralizado con 130-140 µl de una solución compuesta por hidróxido potásico 3 N y Tris base 0,2 M y, tras ello, se dejaba reposar de 5 a 10 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo las muestras eran nuevamente

centrifugadas a 5000 xg durante 10 minutos para, finalmente, tomar 0,95 ml del sobrenadante obtenido. En el caso de no realizar la determinación de inmediato, las muestras eran congeladas en el acto en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C .

2.9.4.2 Determinación de ATP

La solución de ensayo contenía Tris 75 mM (ajustado a pH 7,4 con ácido clorhídrico), NADP^{+} 2 mM, cloruro magnésico 30 mM y glucosa 120 mM. Esta solución era preparada extemporáneamente a partir de disoluciones madre de cada uno de sus componentes, excepto para el caso del NADP^{+} que era preparado diariamente.

El protocolo del ensayo era el siguiente. A 330 μl de la citada disolución se añadían 450 μl de la muestra preparada según el apartado anterior y a continuación se adicionaban 5 μl (0,37 U) de glucosa-6P deshidrogenasa, se agitaba ligeramente y se determinaba de inmediato la absorción a 340 nm (E_0). Tras ello se añadía 10 μl (1,45 U) de hexoquinasa, con el fin de iniciar la secuencia de reacciones enzimáticas. Se efectuaban lecturas de la absorción a 340 nm cada 15 minutos hasta el momento en que la variación de absorción era nula (E_1). La diferencia $E_1 - E_0$ era entonces proporcional a la cantidad de ATP presente en las muestras.

Paralelamente se preparaba un blanco de reacción en el que la muestra era sustituida por agua. En el caso de que la

preparación de hexoquinasa empleada contuviera sulfato amónico era conveniente eliminar la citada sal. Con ello se evitaba el incremento en la absorción del blanco de reacción debido a la transformación de la glucosa por la glucosa-6P deshidrogenasa, reacción favorecida por la presencia de sales en el medio. Tal proceso se llevaba a cabo por filtración en gel (Sephadex G-25 superfine, 0,5x6 cm) forzando el flujo por centrifugación de las columnas a 2000xg durante 1 minuto.

2.9.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL 32 [γ - P]ATP INTRACELULAR.

Se siguió fundamentalmente el método descrito por England y Walsh (293), con las convenientes modificaciones. El citado método se basa en la incorporación de 32 [P]fosfato a partir de 32 [γ - P]ATP a la fosforilasa, en reacción catalizada por la fosforilasa quinasa.

En esencia, 2,5 ml de una suspensión de hepatocitos preincubados con 32 [P]fosfato durante un tiempo determinado se centrifugaron a 1500 xg durante 15 segundos y el sedimento celular fue homogeneizado en presencia de 1 ml de ácido perclórico 0,5 N empleando un baño de hielo-sal. El homogenado obtenido se centrifugó a 2000 xg durante 20 segundos y el sobrenadante ácido fue neutralizado con 175 μ l de una solución saturada de bicarbonato potásico y, finalmente, centrifugado (2000 xg, 2 minutos). El

sobrenadante resultante se congeló inmediatamente a -70° C para su posterior determinación.

El ensayo de la actividad específica del $[\gamma - \text{P}] \text{ATP}$ ³² sintetizado por las células durante el período de incubación con $[\text{P}]$ ³²fosfato se realizó de la siguiente forma. A 150 μl de una disolución que contenía Tris 100 mM, cloruro magnésico 5 mM, β -mercaptoetanol 30 mM y fosforilasa de músculo de conejo (5 mg/ml), ajustada a pH 8,0, se añadían 150 μl del extracto a ensayar preparado tal como se ha descrito anteriormente. La reacción se iniciaba con la adición de 20 μl de una preparación de fosforilasa quinasa de músculo esquelético de conejo (0,1 mg/ml; 8,3 U/mg). Paralelamente se preparaban blancos en los que no se añadía la quinasa. El ensayo se realizaba por duplicado.

La reacción se prolongaba por espacio de 60 minutos, transcurridos los cuales se tomaban 40 μl de la mezcla y se aplicaban sobre un cuadrado de papel (Whatman 31 ET)) sobre el que previamente se habían depositado 40 μl de una disolución de TCA al 20% que contenía ATP 1 mM y pirofosfato sódico 2 mM. El papel era inmediatamente sumergido en una disolución que contenía TCA al 10%, ATP 0,25 mM y pirofosfato sódico 5 mM.

Tras un primer lavado de 15 minutos, que era repetido tres veces empleando una disolución de TCA al 8%, los papeles eran sumergidos en etanol y, a continuación, en acetona durante breves momentos. Finalmente, la radioactividad que

contenían era determinada empleando una disolución de PPO al 0,5% en tolueno como líquido de centelleo.

2.9.6 DETERMINACION DE PROTEINA

La determinación de la concentración de proteína total en las muestras biológicas obtenidas se realizó, para el caso de preparaciones enzimáticas, por el método de Bradford. Esta determinación se fundamenta en la formación de un compuesto coloreado por reacción de la proteína con el colorante Azul de Coomassie G-250, que se cuantifica por fotometría a 595 nm.

En el caso de muestras con alta concentración proteica (superior a 2 mg/ml) la determinación se llevaba a cabo por el método del biuret, basado en la técnica descrita por Gornall y col. (294), modificada por Layne (295). La absorción del complejo coloreado que forman las proteínas en solución con un reactivo formado por sulfato de cobre 6 mM, tartrato sódico-potásico 20 mM e hidróxido sódico 0,75 M, era cuantificada a 550 nm.

Las determinaciones fueron efectuadas en un espectrofotómetro Beckman DB-GT. Los valores de proteína se obtuvieron, en todos los casos, por comparación con los valores obtenidos a partir de soluciones de concentración conocida de albúmina sérica bovina.

2.10 TECNICAS ELECTROFORETICAS Y AUTORRADIOGRAFICAS

2.10.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

Todas las electroforesis en geles de poliacrilamida desarrolladas a lo largo del presente trabajo se llevaron a cabo en placas salvo otra especificación, siendo el espesor del gel de 1 mm. El sistema de soluciones amortiguadoras de pH escogido fue de tipo discontinuo, tal como lo describió Laemmli (296), con ligeras modificaciones.

2.10.1.1 Preparación de los geles

Las soluciones de partida empleadas eran las siguientes:

Acrilamida 40% (p/v)-Bisacrilamida 1,08% (p/v)

Tris.HCl 1,5 M (pH 8,9)

Tris.HCl 0,5 M (pH 6,8)

SDS 10% (p/v)

Persulfato amónico 3% (p/v), preparado extemporáneamente

Se preparaba en primer lugar la solución del gel separador cuya composición era la siguiente: Tris.HCl 0,375 M (pH 8,9), SDS 0,1%, persulfato amónico 0,05% y TEMED 0,025%. La concentración de acrilamida y bisacrilamida era variada según el rango de pesos moleculares de las proteínas o péptidos que se deseaba separar. En ocasiones la mezcla

descrita era desgaseada al vacío mediante una trompa de agua previamente a la incorporación de los catalizadores de la polimerización, TEMED y persulfato amónico.

Inmediatamente después de la incorporación del TEMED la solución era introducida entre dos placas de vidrio adecuadamente selladas con agar caliente al 1,5% (p/v). A continuación se depositaba sobre la misma, empleando una mecha de papel de filtro, una capa de 2 mm de altura de isopropanol, con el fin de generar una interfase totalmente rectilínea. En estas condiciones la polimerización del gel era visible en unos 15 minutos.

La solución del gel apilador contenía Tris.HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 0,1%, persulfato amónico 0,1% y TEMED 0,1%. La concentración de acrilamida en este gel era del 3% cuando la del gel separador no excedía del 10%. En caso contrario se elevaba al 5%.

Con la solución así preparada, exenta de catalizadores, se lavaba la superficie del gel separador polimerizado tras retirar de ella los restos del alcohol isopropílico. A continuación se introducía una matriz formadora de bolsillos hasta 1 cm por encima del gel separador y se añadía la solución del gel apilador evitando la formación de burbujas.

Una vez conseguida la polimerización del segundo gel se retiraba la matriz y se limpiaban los bolsillos empleando una aguja hipodérmica. Las placas así preparadas podían

almacenarse de 1 a 3 días a 4° C en atmósfera saturada de humedad.

2.10.1.2 Preparación de las muestras

Las muestras destinadas a ser sometidas a electroforesis eran, normalmente, residuos secos productos de evaporación al vacío. Estos residuos eran disueltos en 20-25 µl de una solución compuesta de Tris.HCl 42 mM (pH 6,8), SDS 5% y β-mercaptoetanol 5%, preparada extemporáneamente. La solución así obtenida se completaba con 5-7 µl de una solución que contenía Azul de Bromofenol 0,05% y sacarosa 20%.

Puesto que las muestras provenían a menudo de soluciones ácidas, en algunos casos el pH resultante era excesivamente bajo, lo que se detectaba por el viraje del colorante Azul de Bromofenol, que se tornaba amarillo. Cuando esto sucedía se añadían a las muestras un máximo de 2 µl de una solución de Tris 1,5 M (pH 8,9). Tras ello, las muestras se incubaban a 100° C en un baño de agua durante 3 minutos, dejándose atemperar a temperatura ambiente.

2.10.1.3 Condiciones de electroforesis

Tras acoplar los depósitos de las soluciones amortiguadores de pH a las placas de vidrio y sellarlos adecuadamente, se llevaba a cabo la siembra de las muestras. En el caso de que algún bolsillo no albergara muestra alguna se colocaban en él 30 µl de la solución empleada para las

muestras exenta de sacarosa y Azul de Bromofenol.

Los depósitos eran llenados con una solución compuesta por Tris 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS al 2%, cuyo pH quedaba ajustado a 8,3. La electroforesis se llevaba a cabo a intensidad constante. En su inicio se aplicaban 15 mA, elevándose la intensidad a 25 mA cuando el frente formado por el Azul de Bromofenol rebasaba la interfase entre el gel apilador y el separador. El proceso se consideraba finalizado cuando el citado colorante distaba 0,5 cm del extremo inferior del gel.

2.10.1.4 Tinción y secado de los geles

Una vez finalizada la electroforesis, el gel era extraído de entre las placas de vidrio y sumergido en una solución compuesta por Azul de Coomassie R-250 0,25%, ácido acético glacial 10% y alcohol isopropílico 25%, durante 30-45 minutos. El proceso de destinción se llevaba a cabo por inmersión del gel en la solución descrita exenta de colorante, durante varias horas. La solución de destinción era renovada un mínimo de 3 veces durante este tiempo.

Los geles se preparaban para su secado por tratamiento durante varias horas con una solución compuesta por alcohol metílico al 50% y glicerol al 3%. Tras ello se colocaba entre dos hojas de celofán y se secaban al vacío en un secador de geles (GSD-4, Pharmacia), aplicando la adecuada calefacción.

2.10.2 ELECTROFORESIS EN GRADIENTE LINEAL DE ACRILAMIDA

En determinados casos la separación electroforética se realizaba empleando geles constituidos por un gradiente lineal de acrilamida.

La elaboración del gel separador se llevaba a cabo preparando dos soluciones tales como las descritas en 2.10.1.2, una de ellas al 6% de acrilamida y la otra al 20%. En esta última se incluía sacarosa al 15% con objeto de estabilizar el gradiente. Un volumen de 10,5 ml de cada una de ellas era colocado en un sistema de vasos comunicantes dotado de agitación magnética. Una vez añadido a cada solución el persulfato amónico (70 μ l de una solución al 10%) y 7 μ l de TEMED, se introducía la mezcla entre dos placas de vidrio impulsada por una bomba peristáltica (Gilson, Minipuls II) dotada de cabezal de alto flujo el cual se establecía a un valor de 5 ml/minuto.

A partir de este momento, la elaboración del gel y la aplicación de las muestras se realizaba de la manera descrita anteriormente. La concentración de acrilamida en el gel apilador era del 5% y la electroforesis se llevaba a cabo a una intensidad constante de 25 mA, refrigerándose el sistema mediante una corriente forzada de aire.

2.10.3 ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE EN CAPA FINA

Este tipo de electroforesis se empleó para la separación de fosfoaminoácidos procedentes de la hidrólisis parcial de la glucógeno sintasa o de sus productos de fragmentación.

Las electroforesis monodimensionales, empleadas para resolver fosfoserina de fosfotreonina, se llevaban a cabo del siguiente modo. Las muestras, llevadas a sequedad, se disolvían en 10-12 μ l de la solución de electroforesis, compuesta por ácido fórmico, ácido acético y agua (2,5:7,8:89,7), a un pH de 1,9 y a la que se incorporaban fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina como patrones internos. Las muestras se aplicaban con ayuda de un capilar a 2 cm del extremo de una placa de celulosa (10x20 cm, Eastman Kodak 13255). El solvente se eliminaba con ayuda de una corriente de aire caliente.

La superficie de la placa era pulverizada con la solución de electroforesis y el proceso electroforético se desarrollaba empleando como reservorios de la solución dos tiras de electrodo (6x10 mm, Pharmacia 19-3664-01) humectadas en la misma. Las condiciones adecuadas para la separación se conseguían aplicando una diferencia de potencial de 1500 voltios durante 60-80 minutos. Durante el proceso la placa era mantenida a 2-4° C. Transcurrido este tiempo la placa era secada en estufa y pulverizada con una solución de ninhidrina con el fin de detectar la posición de los fosfoaminoácidos

patrón. Finalmente, las placas eran sometidas a autorradiografía tal como se describe en 2.10.5.

Cuando se pretendía separar la fosfotirosina del resto de fosfoaminoácidos se llevaba a cabo la electroforesis de la forma indicada, excepto que la solución de electroforesis estaba compuesta por piridina, ácido acético glacial y agua (0,5:5:94,5), a pH 3,5. El tiempo de electroforesis se reducía en este caso a 25-30 minutos.

Las electroforesis bidimensionales sobre soporte de celulosa se emplearon con el fin de resolver completamente los tres fosfoaminoácidos. Se realizaban en placas de 10x10 cm, efectuándose una electroforesis a pH 1,9 en la primera dimensión. Las condiciones fueron 900 voltios durante 50 minutos. Una vez finalizada la electroforesis se secaba la placa y se sometía a una segunda electroforesis en sentido perpendicular a pH 3,5 y aplicando 1000 voltios durante 20 minutos. A continuación se secaba la placa y se procesaba como se ha indicado anteriormente.

2.10.4 ISOELECTROENFOQUE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

El pequeño tamaño de los fragmentos obtenidos por degradación trípica de la subunidad de la glucógeno sintasa o de sus correspondientes fragmentos de bromuro de cianógeno hacía muy difícil su separación por las técnicas

convencionales de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Es por ello que se recurrió al empleo de técnicas de isoelectroenfoque sobre soporte de poliacrilamida, realizadas tal como se describe a continuación.

2.10.4.1 Preparación de los geles

Las dimensiones de los geles empleados eran de 20x11x0,1 cm. Para su preparación se empleaban 25 ml de una solución compuesta por 4,375 ml de acrilamida al 40%, 4,375 ml de bisacrilamida al 1,08%, 9 g de urea, 1,2 ml de Ampholine pH 2,5-4, 0,6 ml de Pharmalyte pH 4-6,5 y 0,05 ml de ácido fosfórico al 85%, que era desgaseada al vacío.

La polimerización del gel se iniciaba al añadir 65 μ l de una solución de persulfato amónico al 10% y 10 μ l de TEMED. La solución obtenida era inmediatamente introducida entre dos láminas plásticas (GelBond, Pharmacia).

2.10.4.2 Preparación y aplicación de las muestras

Las muestras evaporadas a sequedad se resuspendían en 20 μ l de una solución compuesta por DTT 70 mM y Pharmalyte pH 5-8 al 2%, manteniéndose durante 45-50 minutos a 30° C. La aplicación de las muestras sobre la placa de poliacrilamida se efectuaba con ayuda de rectángulos de papel (Whatman 3 Chroma) de dimensiones 10x5 mm.

2.10.4.3 Condiciones electroforéticas

El proceso se llevaba a cabo en un aparato tipo Multiphor 2117 (LKB) dotado con una fuente de alto voltaje (2197, LKB) y refrigerado por un sistema recirculante (Multitemp 2209, LKB), el cual mantenía la temperatura de la placa entre 2 y 4° C. Para aumentar la eficacia de la refrigeración se aplicaba una solución de Triton X-100 al 2% entre la placa refrigerante y el soporte del gel

Las tiras de electrodo (6x10 mm, Pharmacia) eran impregnadas con la solución anódica (ácido sulfúrico 0,5 M) o catódica (Pharmalyte pH 5-8 al 2%), respectivamente.

La duración del proceso era de 180-200 minutos, empleando una potencia constante de 18-20 vatios y estableciendo un voltaje máximo de 1500 voltios. Rutinariamente se empleaban como marcadores de punto isoeléctrico soluciones diluidas de los colorantes Metil Naranja y Azul de Bromofenol, especialmente útiles por enfocar a bajos valores de pH.

Una vez finalizada la electroforesis el gel era envuelto inmediatamente con una fina película plástica impermeable y sometido a autorradiografía tal como se describe a continuación.

2.10.5 TECNICAS AUTORRADIOGRAFICAS Y DENSITOMETRICAS

La técnica de autorradiografía indirecta fue el sistema de elección a lo largo de todo el trabajo en lo que respecta a poner de manifiesto la localización de proteínas, péptidos o aminoácidos marcados con ortofosfato radioactivo. La razón de ello es la alta sensibilidad de esta técnica, que permite detectar cantidades muy pequeñas del isótopo en cuestión.

Para llevar a cabo las autorradiografías se colocaban los geles de poliacrilamida secos (o envueltos en plástico impermeable en el caso de geles húmedos) en un chásis metálico hermético a la luz que estaba dotado de dos pantallas intensificadoras (Micron R, o Dupont H-Plus). Sobre el gel se colocaba en estrecho contacto una película de radiografía tipo Mafe RP-X1 o Kodak X-OMAT S.

A continuación se colocaba el chásis en un congelador a -70° C, con el fin de obtener una respuesta lineal en la exposición de la película. Transcurrido el tiempo de exposición necesario en función de la radioactividad presente en el gel (de 1-2 horas a varios días), la película era revelada manualmente de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante.

Las autorradiografías, una vez secas, eran cuantificadas con ayuda de un densitómetro dotado de integrador y registro gráfico (Vitatron TLD-100) a una longitud de onda de 546 nm.

2.11 FRAGMENTACION DE LA GLUCOGENO SINTASA

Con el fin de analizar la estructura de la proteína, localizar sus centros de fosforilación y averiguar la naturaleza de sus enlaces fosfato, se procedió a la fragmentación del enzima por diversos métodos.

2.11.1 FRAGMENTACION POR BROMURO DE CIANOGENO

La fragmentación de la glucógeno sintasa por bromuro de cianógeno se llevaba a cabo, generalmente, a partir del enzima inmunoprecipitado siguiendo el método descrito por Gross (297). Este método se fundamenta en el ataque del bromuro de cianógeno en medio ácido a los residuos de metionina de la proteína, provocando la escisión de la cadena polipeptídica por el extremo carboxílico del aminoácido.

Para ello, el inmunoprecipitado obtenido según 3.2.3 se disolvía en 200 μ l de una disolución compuesta por β -mercaptoetanol 50 mM en ácido fórmico al 70%. La presencia del tiol es necesaria para evitar la oxidación de la metionina al correspondiente sulfóxido, el cual es resistente al ataque por el bromuro de cianógeno.

A la disolución obtenida, o a una alícuota en su caso, se añadía el adecuado volumen de una disolución de bromuro de cianógeno en el solvente descrito (0,1 g/ml) para que la concentración final del compuesto fuera de 10 mg/ml. La mezcla se guardaba al abrigo de la luz y herméticamente cerrada, a temperatura ambiente y por espacio de 12 horas, tiempo más que suficiente para completar la reacción.

Tras ello, las muestras eran evaporadas a sequedad en un evaporador centrífugo tipo Speed-Vac (Savant). El residuo era resuspendido en 300 µl de agua tridestilada y nuevamente evaporado. Con ello se conseguía reducir notablemente la acidez al conseguir la casi completa eliminación del solvente, exceso de reactivo y productos secundarios de reacción, todos ellos volátiles. Finalmente, el residuo seco obtenido era disuelto en la adecuada solución de electroforesis (véase 2.10.1.2).

2.11.2 FRAGMENTACION DE LA GLUCOGENO SINTASA POR TRIPSINA

La acción de la tripsina tiene lugar sobre aquellos enlaces peptídicos en que el grupo carboxílico es aportado por un aminoácido básico (arginina o lisina), salvo cuando el aminoácido vecino es la prolina.

Debido a que las preparaciones comerciales de esta proteasa contienen generalmente contaminación por actividad

quimotriptica, se emplearon en todos los casos preparaciones de tripsina tratadas con TPCK. Este compuesto es capaz de bloquear la actividad quimotripsina al reaccionar específicamente con el centro activo del enzima.

La degradación triptica de la glucógeno sintasa se realizaba sobre el fragmento de gel de poliacrilamida que contenía la banda de proteína correspondiente a la subunidad del enzima, obtenido tras electroforesis de los inmunoprecipitados. Para ello, una vez identificado el fragmento del gel que contenía al enzima mediante la correspondiente autorradiografía, éste era incubado durante unos minutos en agua tridestilada. La humectación del gel permitía la retirada de la cubierta de celofán empleada en el secado del mismo. El gel era secado nuevamente en un evaporador centrífugo y una vez seco era incubado a 30° C con 0,6-0,7 ml de una disolución de bicarbonato amónico 50 mM a pH 7,8-8,0 que contenía tripsina a la concentración de 30 µg/ml.

La adición de tripsina se repetía cada 6 horas a partir de disoluciones madre de una concentración de 2 mg/ml que eran almacenadas en alícuotas a -30° C. El tratamiento con la proteasa se continuaba hasta que la radioactividad retenida en el gel era inferior al 10% de la radioactividad inicial. Una vez conseguido, el medio de incubación era tratado como mínimo una vez más con tripsina durante 4 horas.

Finalmente el medio de incubación era evaporado a

sequedad y almacenado a -12°C para su posterior análisis.

2.11.3 HIDROLISIS PARCIAL DE LA GLUCOGENO SINTASA

La hidrólisis parcial de la molécula de glucógeno sintasa, así como la de los fosfopéptidos resultantes de su degradación por bromuro de cianógeno, se llevó a cabo con el fin de efectuar el análisis de los fosfoaminoácidos presentes en la molécula. El citado análisis se realizó por hidrólisis de la molécula aislada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La hidrólisis se llevó a cabo tanto en medio ácido como en medio alcalino ya que en el primer caso la molécula de fosfotirosina es hidrolizada con suma efectividad y su recuperación es muy baja.

2.11.3.1 Hidrólisis ácida

Los fragmentos de gel que contenían la subunidad de la glucógeno sintasa o los fosfopéptidos derivados de su fragmentación por CNBr se incubaban con 0,2-0,4 ml de ácido clorhídrico 6 M durante 2 horas a 110°C en tubos de vidrio Pyrex cerrados al vacío. Transcurrido este tiempo, se añadía a las muestras 2 ml de agua tridestilada y, tras centrifugar brevemente, los sobrenadantes se llevaban a sequedad por evaporación al vacío. El residuo obtenido se disolvía en 10 ml de agua tridestilada a la que se añadía 0,5 ml de una resina de intercambio iónico tipo AG 1X8 (BioRad) en forma de

formiato, ajustándose el pH de la suspensión entre 7,5 y 8,5, de acuerdo con lo descrito en (298). La suspensión se agitaba al menos durante 6 horas a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, los fosfoaminoácidos retenidos por la resina eran eluidos con un volumen de 1-1,5 ml de ácido clorhídrico 0,4 M. El eluido se evaporaba a sequedad y se almacenaba a -12° C para su posterior análisis por electroforesis en capa fina, según lo descrito en 2.10.3.

2.11.3.2 Hidrólisis alcalina

El material de partida era el mismo que el descrito en el apartado anterior. Las muestras eran incubadas, en este caso, con 0,2-0,4 ml de una disolución de hidróxido potásico 5 M durante 35 minutos a 135° C. Tras ello, el proceso de purificación de los fosfoaminoácidos se llevaba a cabo de idéntica manera a lo expuesto anteriormente.

2.12 SINTESIS DE REACTIVOS Y MATERIALES

A lo largo del presente trabajo se ha realizado la síntesis de los siguientes reactivos y materiales.

2.12.1 SINTESIS DE SEPHAROSE-GLUCOSAMINA-6-FOSFATO

El sistema de cromatografía de afinidad empleado en la purificación de la glucógeno sintasa hepática fue diseñado y sintetizado en nuestro laboratorio en base a la bibliografía existente sobre la materia (299-301).

La síntesis se fundamentaba en la activación de una matriz de Sepharose 4B (Pharmacia) mediante bromuro de cianógeno (250 mg/ml de gel empaquetado). La reacción se realizaba a 20° C, manteniendo el pH del medio a un valor de 11 mediante la adición de hidróxido sódico 6 M. Una vez estabilizado el pH del medio, lo cual sucedía pasados 30 minutos del inicio de la reacción, el intermedio imidocarbonato resultante se hacía reaccionar con una disolución acuosa que contenía un exceso de 1,6-diaminohexano (2 mmoles/ml gel), a pH 10 durante 3 horas. Pasado este tiempo el gel era lavado con agua destilada empleando un embudo filtrante hasta que los líquidos de lavado no mostraban reacción alcalina.

La elongación del brazo espaciador y su adecuada funcionalización se consiguieron por reacción con anhídrido succínico. A tal fin se adicionaba sobre la suspensión de gel obtenida un exceso de anhídrido succínico pulverizado (1 mmol/ml de gel), manteniendo la reacción a pH 6,0. Una vez estabilizado el pH, el sistema se mantenía en agitación durante varias horas a 4° C. Tras ello se llevaba a temperatura ambiente y se añadía un exceso de hidróxido sódico 0,1 M, agitándose durante 30-40 minutos. Este tratamiento permitía la eliminación de los grupos carboxilos lábiles remanentes. Por último, el gel era lavado con agua destilada.

La reacción de conexión del ligando, la glucosamina-6-fosfato, se llevaba a cabo de la siguiente manera. La suspensión de succinilhexametilenamino-Sepharose obtenida se llevó a pH 4,5 y sobre ella se adicionó un volumen igual al del gel empaquetado de una disolución de glucosamina-6-fosfato (8 mg/ml) a pH 4,5 y una disolución de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (10 mg/ml) en igual volumen y a idéntico pH. La reacción se prolongaba por espacio de 24 horas a temperatura ambiente y en agitación .

Pasado este tiempo el gel se lavaba con agua destilada y se almacenaba a 4° C, en presencia de azida sódica.

2.12.2 SINTESIS DE [γ-³²P]ATP

El ATP marcado radioactivamente en el fosfato de la posición gamma fue preparado a partir de [³²P]fosfato de acuerdo con el proceso enzimático descrito por Walseth y Johnson (302) y siguiendo las modificaciones introducidas por Palmer y col. (303) que garantizan recuperaciones elevadas.

2.12.3 SINTESIS DE UDP[U-¹⁴C]GLUCOSA

La uridin difosfo[U-¹⁴C]glucosa utilizada en este trabajo fue obtenida mediante las reacciones enzimáticas descritas por Thomas y col (289) teniendo en cuenta las modificaciones introducidas por Tan (304), a partir de α-D-¹⁴[U-¹⁴C] glucosa.

2.13 REACTIVOS Y PRODUCTOS UTILIZADOS

A lo largo del presente trabajo han sido utilizados los siguientes reactivos y materiales, que se presentan agrupados de acuerdo a sus características y firmas suministradoras.

REACTIVOS GENERALES

Sigma Chemical Co.

ATP, sal disódica. AMP cíclico, sal sódica. Albúmina sérica bovina, fracción V. Benzamidina. Cafeína. EDC. EDTA, sal disódica. Glicerol. Glucógeno, de hígado de conejo. Glucosa-1-P, sal dipotásica. Glucosa-6-P, sal monosódica. Glucosamina-6-fosfato. Leupeptina. UDP-glucosa, sal disódica. Tris base. 2,5-dimetil oxazol (PPO).

Merck

Acetato magnésico. Acido fórmico. Bicarbonato sódico. Bromuro de cianógeno. Cloruro magnésico. Cloruro cálcico. Cloruro sódico. Cloruro potásico. Dimetilsulfóxido. Fluoruro potásico. Fosfato monopotásico. Fosfato dipotásico. β -glicerofosfato sódico. Glicina. Glucosa. β -mercaptoetanol. Piridina. Sacarosa. Sulfato cúprico. Sulfato magnésico. Tartrato sódico-potásico. TCA.

Carlo Erba

Azul Tripano.

Bio Rad Labs.

Acrilamida. Azul de Bromofenol. Azul de Coomassie R-250.
N,N-dimetilbisacrilamida. Persulfato amónico. SDS. TEMED.

Panreac

Alcohol isopropílico. Acido acético. Anhídrido
succínico. 1,6-diaminohexano.

PREPARACIONES ENZIMATICAS

Sigma Chemical Co.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, de levadura.
Hexoquinasa, de levadura.

Worthington Biochemical Corp.

Colagenasa, tipo I de C. hystolyticum. Tripsina, tratada
con TPCK.

PRODUCTOS DE ACCION HORMONAL Y FARMACOLOGICA

Sigma Chemical Co.

L(-)Adrenalina, bitartrato. Angiotensina II. Forbol. 4 α -12,13-Didecanoil forbol. 4 β -12,13-Didecanoil forbol. 4 β -12-Tetradecanoil-13-acetil forbol. Glucagón. Ionóforo A23187. Mezereina. Oxitocina. Ortovanadato sódico. Vasopresina.

Merck

Cloruro de litio (Suprapur).

PRODUCTOS RADIOACTIVOS

Radiochemical Center, Amersham

^{14}C glucosa-1-fosfato, sal dipotásica. α -D- ^{14}C glucosa. ^{32}P ortofosfato.

PRODUCTOS PARA CROMATOGRAFIA

Pharmacia Fine Chemicals

Sepharose 4B

Whatman

DEAE-celulosa (DE-52). Papel cromatográfico 31 ET.

Eastman Kodak

Placas de celulosa (13255).

Gelman Instrument

Papel cromatográfico ITLC SG.

Bio Rad Labs.

Dowex AG1X8.

PRODUCTOS PARA AUTORRADIOGRAFIA

Kodak

Placas para radiografía X-OMAT S.

Mafe

Placas para radiografía RP-X1

Agfa-Gevaert

Revelador G 150. Fijador G 334.

3. RESULTADOS

3.1 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-GLUCOGENO SINTASA HEPATICA

Los anticuerpos anti-glucógeno sintasa hepática se obtuvieron inoculando a conejos preparaciones de glucógeno sintasa de hígado de rata purificada a homogeneidad electroforética.

3.1.1 PURIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTASA HEPATICA

La purificación de la glucógeno sintasa hepática se llevó a cabo tal como se describe en 2.2. Las preparaciones enzimáticas obtenidas mostraban una actividad específica del orden de 25 U/mg de proteína y estaban exentas de actividad proteína quinasa o glucógeno fosforilasa. El grado de purificación alcanzado fue de 3300 veces, con una recuperación de la actividad del 12%. La relación de actividades, expresada según el ensayo - glucosa-6-fosfato/ + glucosa-6-fosfato era, en todos los casos, superior a 0,85. Las preparaciones obtenidas, almacenadas convenientemente a -80° C, mantenían su actividad durante períodos de tiempo superiores a un año. Las principales características del proceso de purificación se resumen en la Tabla 1.

Las preparaciones del enzima demostraron ser homogéneas bajo el criterio de electroforesis en geles de poliacrilamida

**TABLA 1. PURIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTASA
DE HIGADO DE RATA.**

FRACCION	UNIDADES TOTALES	U/mg	RECUPERACION	PURIFICACION
Extracto crudo	150	0,008	100	1
Sedimento de glucógeno	140	0,49	93	61
DEAE-celulosa	23	0,76	17	95
C. de afinidad y dializado final	19	26,30	12,6	3300

en presencia de SDS, siendo este dato particularmente importante si se tiene en cuenta su empleo como inmunógeno. Por este mismo criterio mostró un peso molecular aparente de 88 Kd. En determinados casos se podía apreciar en los geles una segunda banda de proteína con un peso molecular aparente de 80 Kd, correspondiente a un producto proteolítico derivado del enzima. En general, la citada banda no constituía más de un 10-15% de la proteína total presente en la preparación. La omisión de sacarosa o inhibidores de proteasas durante el proceso de purificación daba como resultado un notable incremento en la banda de 80 Kd.

3.1.2 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LAS PREPARACIONES DE ANTICUERPOS ANTI-GLUCOGENO SINTASA HEPATICA

La obtención de anticuerpos anti-glucógeno sintasa hepática se llevó a cabo por inoculación en conejo de preparaciones del enzima purificado a homogeneidad, de alta actividad específica y esencialmente exentas de productos de proteolisis. Para ello se siguió la pauta descrita en 2.3, basada tanto en la experiencia previa existente en nuestro laboratorio respecto a la obtención de anticuerpos anti-glucógeno sintasa de músculo esquelético de conejo, como en los datos existentes en la bibliografía.

El antisuero obtenido era parcialmente purificado por precipitación con sulfato amónico tal como se describe en

2.3.2, con el fin de obtener una preparación exenta de albúmina sérica.

3.1.2.1 Inmunodifusión radial

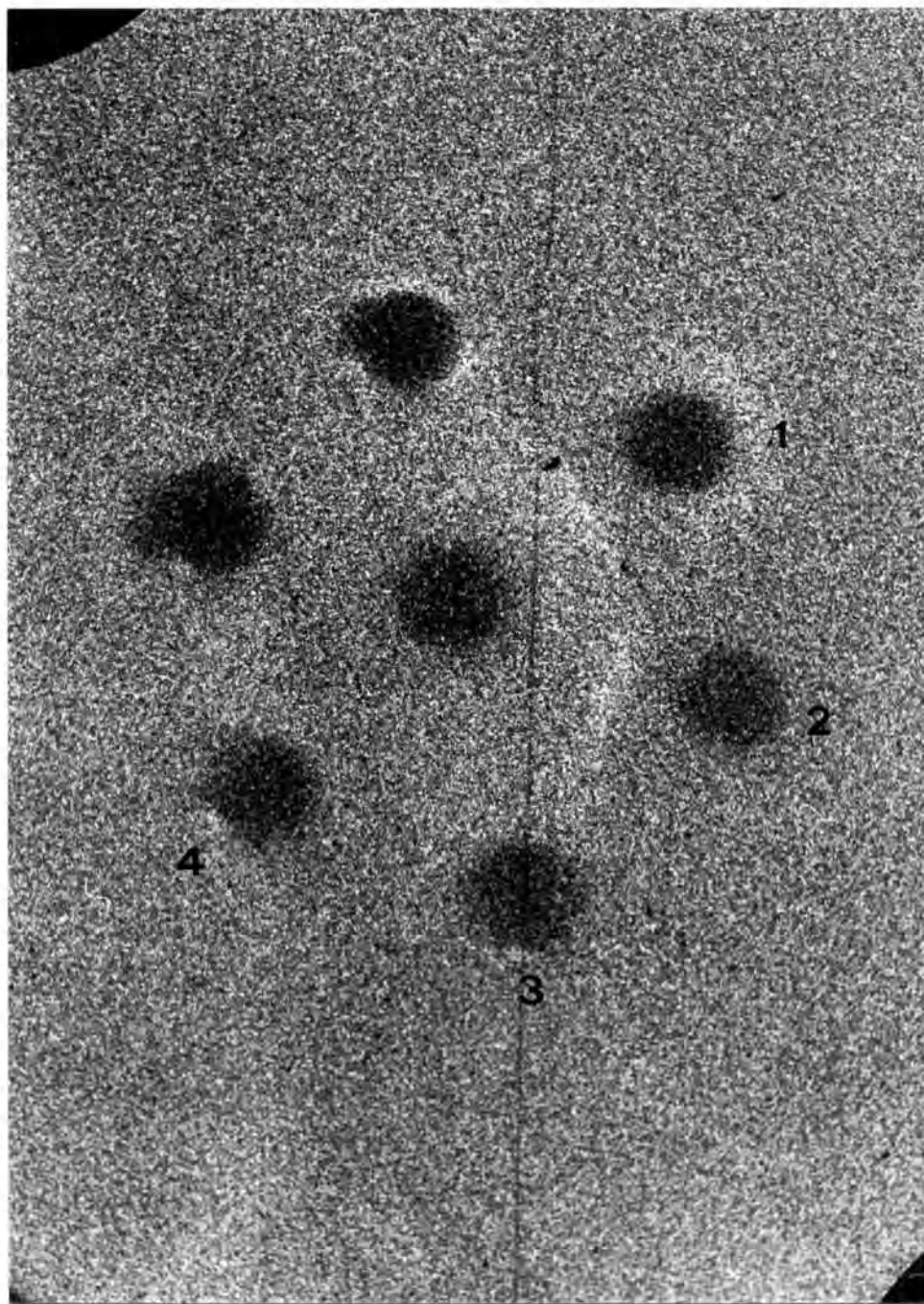
La presencia de anticuerpos anti-glucógeno sintasa hepática en el antisuero obtenido se puso en evidencia mediante técnicas de doble difusión, siguiendo el método de Ouchterlony, tal como se describe en 2.4.1.

Como muestra la Figura 1, la reacción antígeno-anticuerpo se manifiesta en forma de arcos de precipitación. El pocillo central contenía 20 μ l de antisuero anti-glucógeno sintasa hepática. Los pocillos 1 y 2 contenían 15 μ l de una preparación de glucógeno sintasa hepática purificada (0,5 mg/ml). Los pocillos 3 y 4 contenían 23 y 46 μ g, respectivamente, de glucógeno fosforilasa purificada a partir de músculo esquelético de conejo, en un volumen total de 15 μ l. Los volúmenes fueron ajustados, en cada caso, con una solución de cloruro sódico al 0,9%. Los arcos de precipitación podían ser observados a simple vista transcurridas entre 24 y 48 horas de la siembra.

En un experimento paralelo se sembró en el pocillo central 20 μ l de un suero obtenido a partir de un animal no inmunizado. En este caso, no se detectó la formación de arcos de precipitación, excluyendo, por lo tanto, la posibilidad de precipitaciones no específicas.

FIGURA 1. INMUNODIFUSION RADIAL

El pocillo central contenía 20 μ l de un antisuero anti-glucógeno sintasa. 1) y 2) contenían 15 μ l de una preparación de glucógeno sintasa hepática purificada. 3) y 4) contenían 15 μ l de una preparación de glucógeno fosforilasa.



3.1.2.2 Inmunoelectroforesis según Laurell

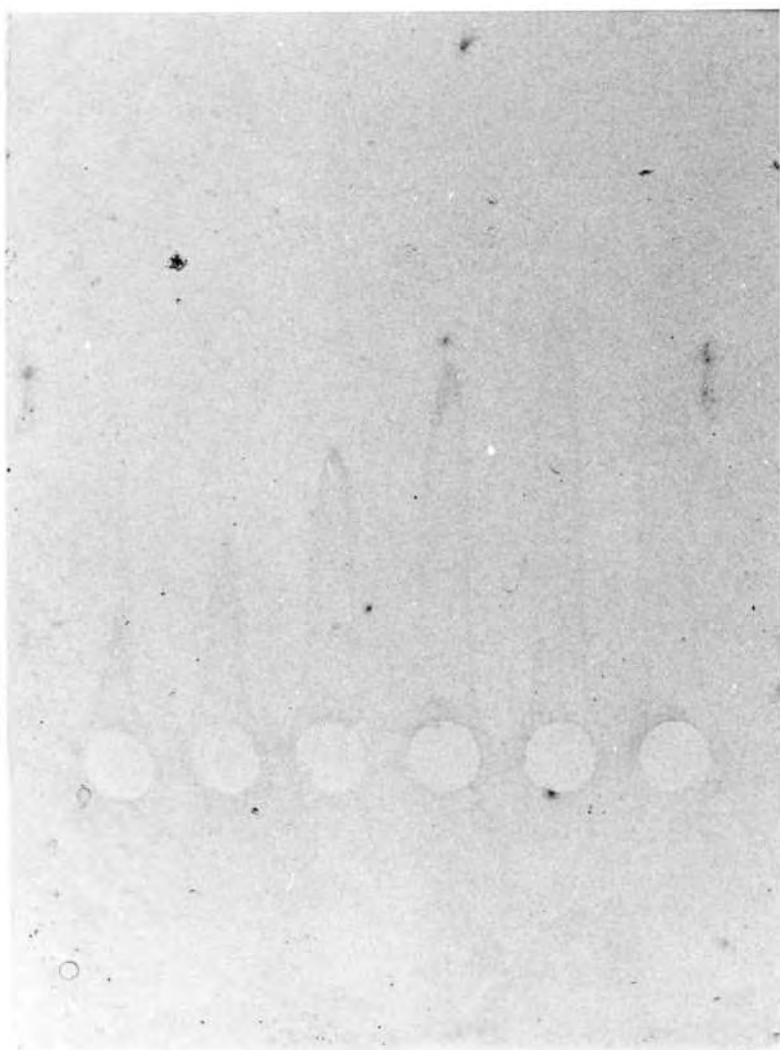
La inmunoelectroforesis "rocket", según la técnica descrita por Laurell, fue utilizada con el fin de poner en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo. Para ello se emplearon como fuente de antígeno tanto preparaciones de glucógeno sintasa homogénea como extractos crudos procedentes de hepatocitos.

Se realizaron pruebas empleando diferentes concentraciones de anticuerpos (obtenidas por precipitación del antisuero con sulfato amónico) en la preparación de la placa. La Figura 2 muestra el patrón obtenido al realizar la inmunoelectroforesis en una placa de agarosa que contenía un 0,3% (v/v) de una preparación de anticuerpos cuya concentración de proteína era de 36 mg/ml. En los pocillos se sembraron muestras de glucógeno sintasa homogénea cubriendo un intervalo de 0,1 a 1 μ g del enzima, en un volumen total de 12 μ l. La electroforesis se desarrolló tal y como se describe en 2.4.2 y pudo observarse que los incrementos en la cantidad de antígeno sembrado provocaron un aumento en la altura de los correspondientes arcos de precipitación.

En la Figura 3 se representa la altura de los arcos de precipitación en relación con la cantidad de antígeno sembrado, para dos diferentes concentraciones de anticuerpos (0,3 y 0,9 % (v/v)). Como se puede observar, se obtuvo una estrecha relación entre ambos parámetros en cualquiera de las condiciones ensayadas.

FIGURA 2. INMUNOELECTROFORESIS "ROCKET"

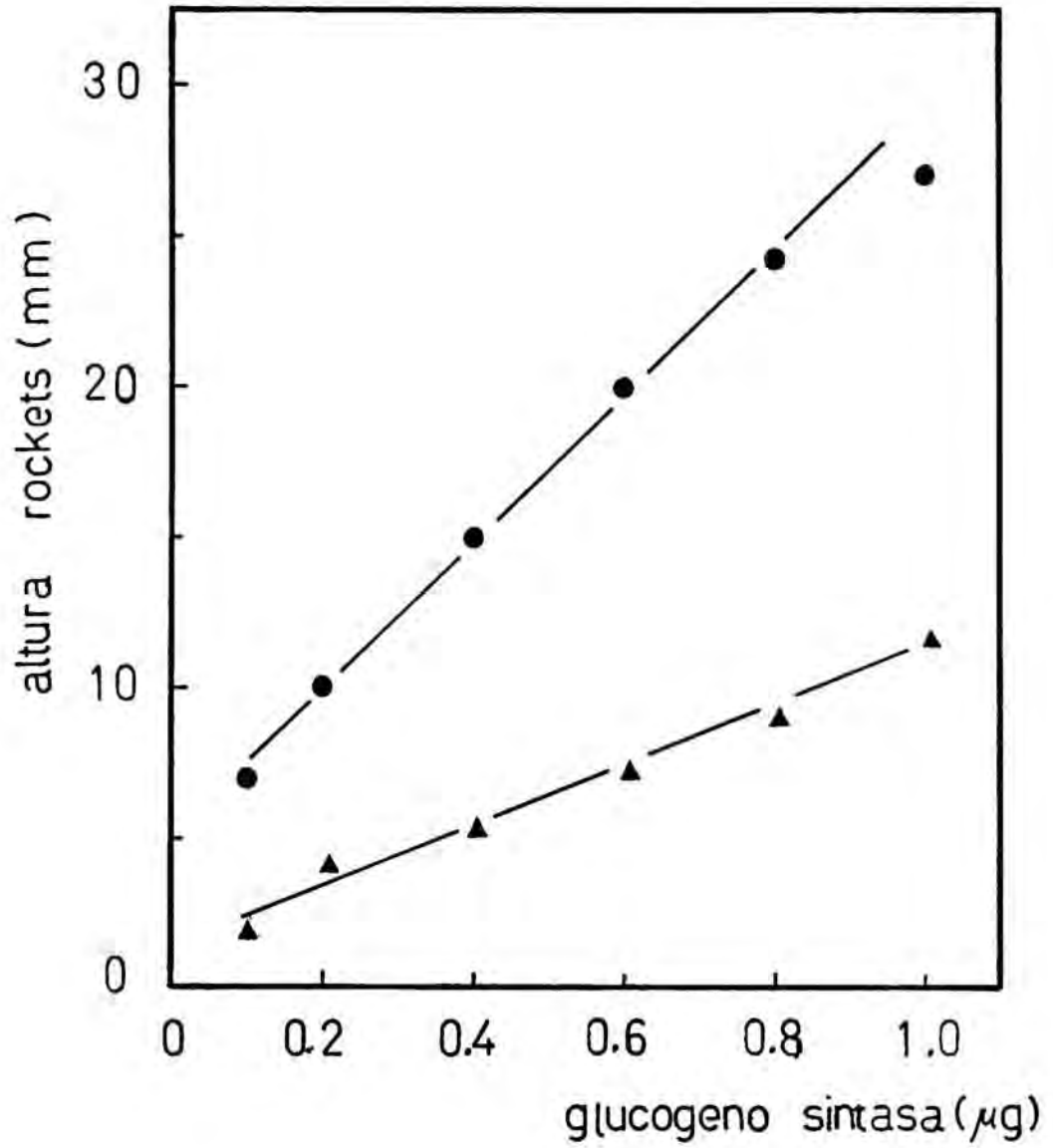
El gel contenía un 0,3% (v/v) de una preparación de globulinas anti-glucógeno sintasa. La cantidad de glucógeno sintasa hepática purificada aplicada era de 1) 0,1 μg , 2) 0,2 μg , 3) 0,4 μg , 4) 0,6 μg . 5) 0,8 μg y 6) 1,0 μg . El volumen total aplicado en cada caso era de 12 μl .



1 2 3 4 5 6

**FIGURA 3. RELACION ENTRE LA CANTIDAD DE
GLUCOGENO SINTASA Y LA ALTURA DE LOS ARCOS DE
PRECIPITACION**

La concentración de anticuerpos en la placa
era del 0,3% (v/v) (●—●) o del 0,9% (v/v)
(▲—▲).



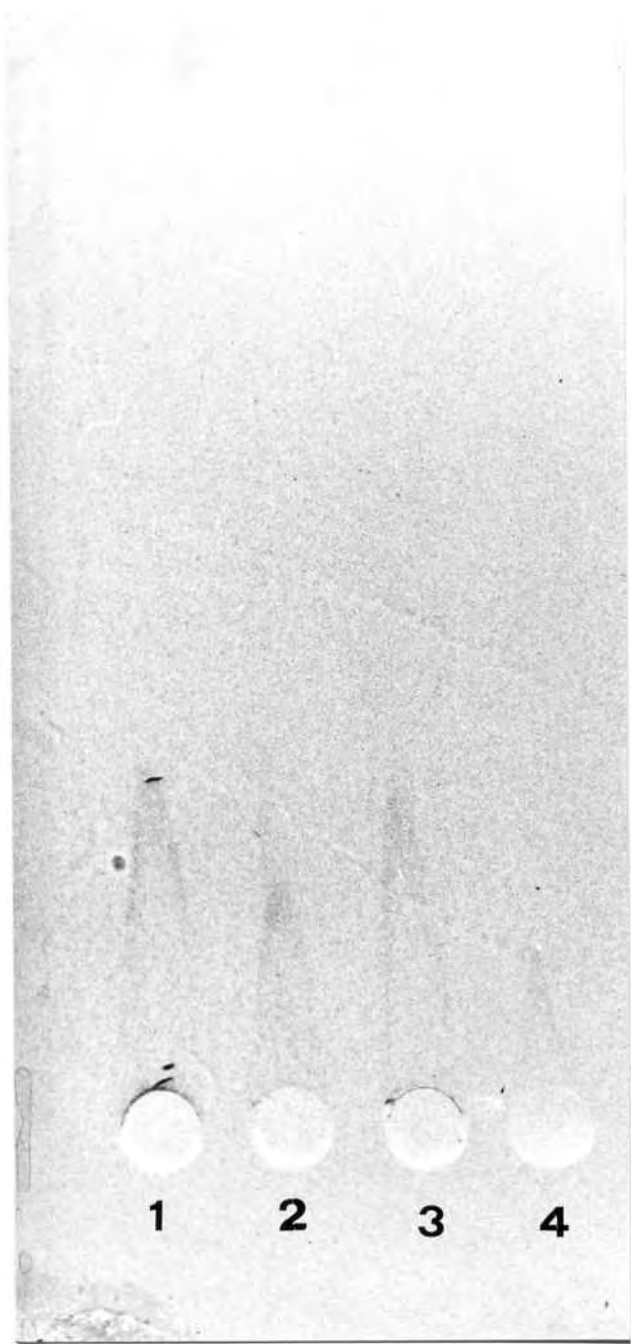
Este tipo de técnica permitió poner en evidencia la especificidad de las preparaciones de anticuerpos. Para ello, se llevaron a cabo inmunolectroforesis en las que se aplicaron diferentes cantidades de un sobrenadante obtenido por centrifugación a 10000 xg de un homogenado de hepatocitos.

Como puede verse en la Figura 4, se obtiene un único arco de precipitación, correspondiente a la interacción del anticuerpo con la glucógeno sintasa presente en el extracto. Este hecho se manifiesta claramente cuando a un determinado volumen del extracto se le añade una cierta cantidad del enzima purificado a homogeneidad. La adición del enzima provoca un incremento en la altura del arco de precipitación correspondiente. Ello demuestra que el arco de precipitación obtenido a partir de extractos crudos de hepatocitos es producto de una reacción antígeno-anticuerpo que involucra a la glucógeno sintasa existente en dichos extractos. En ningún caso se obtuvieron arcos de precipitación al aplicar diferentes cantidades de glucógeno fosforilasa, confirmando así los datos aportados por los experimentos de doble difusión referentes a la incapacidad de los anticuerpos para reconocer a dicho enzima.

De un modo análogo, se realizaron inmunolectroforesis empleando fracciones de globulinas procedentes de animales no inmunizados. Para ello se sembraron tanto extractos crudos de hepatocitos como glucógeno sintasa homogénea. En ningún caso se observó la aparición de arcos de precipitación,

**FIGURA 4. INMUNOELECTROFORESIS "ROCKET"
DE EXTRACTOS DE HEPATOCITOS**

La concentración de la preparación de anticuerpos en la placa era del 0,24%. 1) y 2) contenían, respectivamente, 10 y 5 μ l de un extracto de hepatocitos, 3) contenía 5 μ l del citado extracto más 0,1 μ g de glucógeno sintasa purificada y 4) 0,1 μ g de glucógeno sintasa purificada.



1

2

3

4

descartando así la posibilidad de reconocimientos inespecíficos.

3.1.2.3 Titulación de los anticuerpos

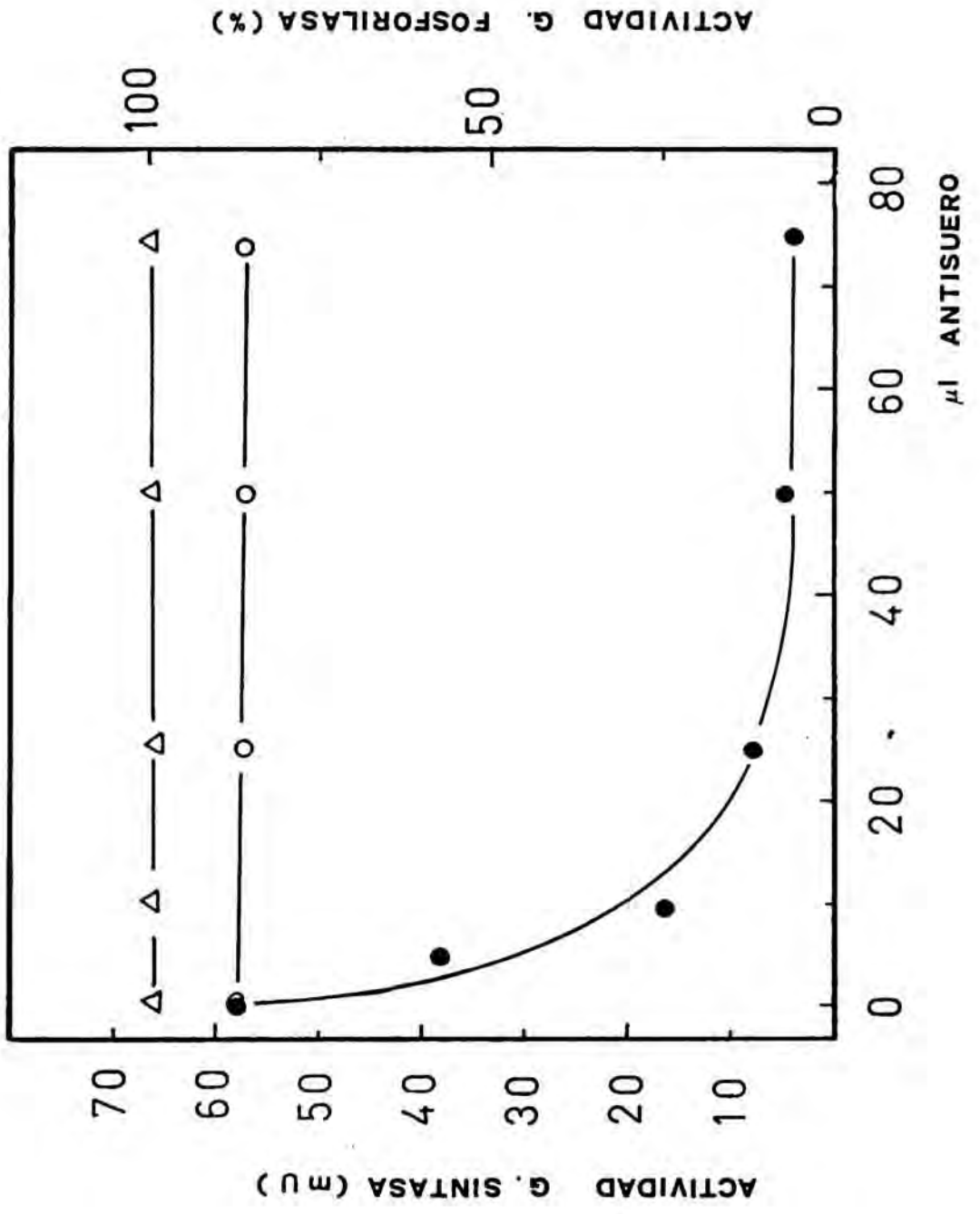
Las preparaciones de anticuerpos anti-glucógeno sintasa obtenidos fueron estudiadas en base al criterio de su capacidad para reconocer e inactivar al enzima hepático existente en un extracto crudo obtenido a partir de hepatocitos aislados. El procedimiento se encuentra detallado en 2.4.3.

Tal como muestra la Figura 5, el antisuero fue capaz de inactivar a la glucógeno sintasa de una forma que dependía de la cantidad de anticuerpo empleado. A partir de una determinada cantidad, la actividad glucógeno sintasa bloqueada por los anticuerpos superaba el 90% de la actividad total presente en el extracto. Por el contrario, la adición de cantidades equivalentes de suero procedente de un animal no inmunizado era incapaz de provocar disminución alguna en la actividad enzimática. Ello indicaba que la disminución de actividad detectada en el primer caso no era producida por una inactivación del enzima durante el proceso de incubación con el suero.

Asimismo se investigó la presencia de actividad fosforilasa en los citados extractos tras la incubación con el anticuerpo. Como puede comprobarse, incluso a las mayores concentraciones de anticuerpo empleadas, capaces de bloquear

FIGURA 5.- INMUNOTITULACION DEL ANTISUERO

Se incubó un determinado volumen de un extracto de hepatocitos con cantidades crecientes de antisuero (●—●) o de suero procedente de animales no inmunes (○—○), según lo descrito en 2.4.3. Tras centrifugar la mezcla se determinaron las actividades glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa (Δ—Δ) en los sobrenadantes.



por completo la actividad glucógeno sintasa, la actividad fosforilasa no se vió afectada en lo más mínimo. Este hecho probaba nuevamente que los animales inoculados no habían desarrollado anticuerpos anti-glucógeno fosforilasa. Las repetidas investigaciones en los lotes de antisueros obtenidos de una hipotética presencia de anticuerpos anti-glucógeno fosforilasa dió resultados negativos en todos los casos, incluso cuando los citados lotes procedían de animales sometidos a varias dosis de recuerdo.

Este mismo tipo de experimentos se realizó enfrentando una cantidad fija de glucógeno sintasa homogénea con diferentes cantidades de antisuero o de fracción de globulinas obtenida por precipitación del mismo con sulfato amónico. En estos casos se constató la necesidad de ajustar cuidadosamente la concentración de proteína en el medio de incubación, puesto que la actividad glucógeno sintasa en aquellas incubaciones donde la cantidad de anticuerpos añadidos era menor, se deterioraba a lo largo del proceso de incubación. Este problema fue superado mediante la inclusión en el medio de incubación de las adecuadas cantidades de albúmina sérica bovina en una disolución amortiguadora compuesta por Tris 50 mM y cloruro sódico 0,14 M, ajustada a pH 7,4. De esta manera se conseguía una concentración final de proteína de 18 mg/ml en cada uno de los puntos estudiados. Ello permitió reproducir la curva de inactivación representada en la Figura 5 empleando como fuente de antígeno preparaciones de glucógeno sintasa homogénea.

3.1.2.4 Inmunoprecipitación de la glucógeno sintasa

Una vez establecida la capacidad de las preparaciones de anticuerpos para reconocer e inactivar tanto a la glucógeno sintasa purificada como a la presente en extractos de hepatocitos, se investigó la utilidad de dichas preparaciones para inmunoprecipitar al enzima.

Con este fin, se llevó a cabo la incubación del enzima puro con la proteína quinasa independiente de AMP cíclico caseína quinasa-1, en presencia de [γ -³²P]ATP. Tras detener la reacción de fosforilación se tomaron dos alícuotas. En una de ellas la proteína fue precipitada con TCA a una concentración final del 10%. La segunda alícuota fue incubada con anticuerpos anti-glucógeno sintasa según lo descrito en 3.2.3.2 y el inmunoprecipitado formado se aisló por centrifugación a 12000 xg durante 5 minutos. A continuación se resuspendió el inmunoprecipitado y, en una alícuota del mismo, se determinó la cantidad de radioactividad asociada a proteína mediante ITLC. De análoga forma se determinó la radioactividad precipitada por el TCA. La comparación de ambos datos permitió averiguar que la recuperación de radioactividad tras la incubación con anticuerpos anti-glucógeno sintasa alcanzaba un valor del 95% de la radioactividad total precipitable por TCA.

Con objeto de conocer la especificidad de las preparaciones de anticuerpos en el proceso de inmunoprecipitación se sometió a una alícuota del

inmunoprecipitado a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. El proceso se llevó a cabo en tubo y, finalizada la electroforesis, el gel fue teñido. Una vez realizada la destinción, el gel fue cortado en segmentos de 2 mm y se determinó la radioactividad de los mismos aprovechando el efecto Cerenkov. Como puede apreciarse en la Figura 6, toda la radioactividad presente en el gel se encontraba asociada a una banda de proteína que exhibía una movilidad electroforética idéntica a la de la subunidad de la glucógeno sintasa hepática.

3.2 AISLAMIENTO DE LA GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS INCUBADOS CON [³²P]FOSFATO

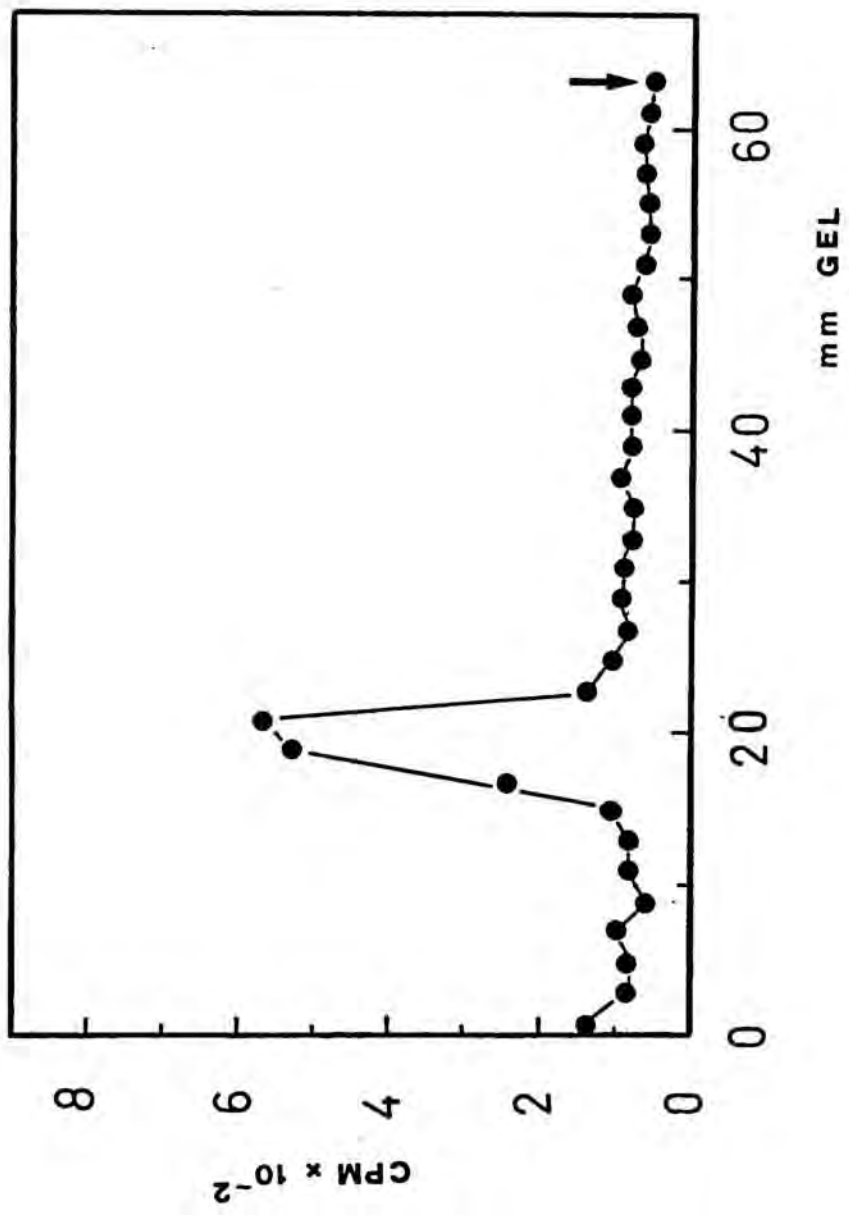
3.2.1 CARACTERISTICAS DE LAS PREPARACIONES CELULARES

Las suspensiones de células parenquimáticas hepáticas, obtenidas a partir de ratas sometidas a 24 horas de ayuno, se preparaban de tal manera que la concentración celular fuera del orden de $5 \text{ a } 7 \times 10^6$ células/ml.

Las citadas preparaciones exhibían una viabilidad del 90%, según el criterio de exclusión del colorante Azul Tripano. Las células presentaban una notable integridad metabólica durante todo el período de las incubaciones, como

**FIGURA 6. INMUNOPRECIPITACION DE LA GLUCOGENO
SINTASA**

El enzima fosforilado "in vitro" fue inmunoprecipitado y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. El gel se dividió en rodajas de 2 mm y la radioactividad presente en cada una de ellas se cuantificó por efecto Cerenkov.



se desprende de los valores de la concentración intracelular de ATP (alrededor de 2,40 μmol / gramo de tejido), los cuales se mantenían constantes a lo largo del período de incubación de las células. Por otra parte, las actividades enzimáticas rutinariamente ensayadas respondían a los estímulos hormonales.

3.2.2 INCUBACION DE LAS CELULAS CON [³²P]FOSFATO

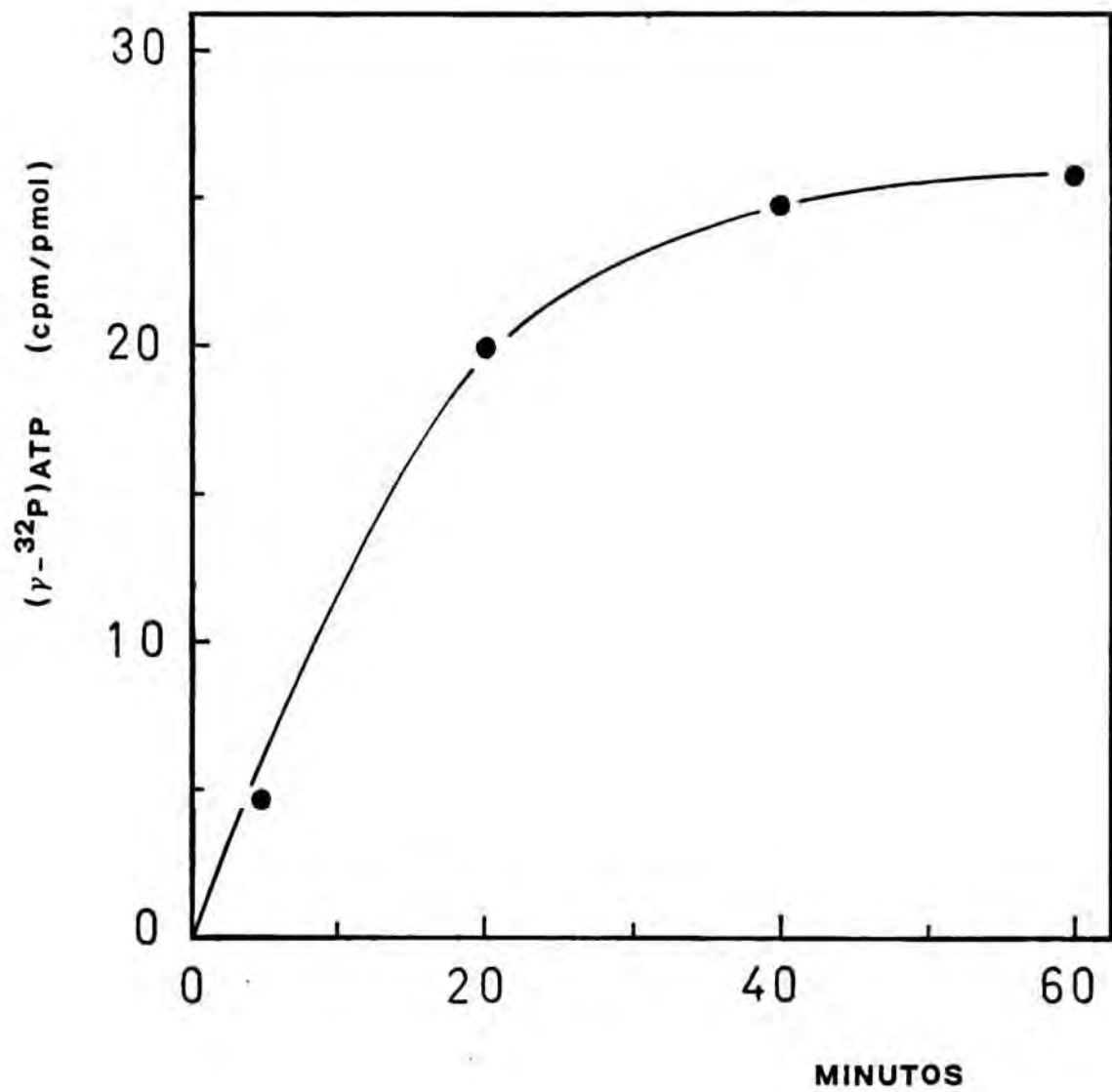
La incorporación de fosfato radioactivo en los compuestos celulares se conseguía mediante la incubación de suspensiones de hepatocitos con ortofosfato radioactivo. La incorporación del isótopo es más o menos rápida para una determinada molécula dependiendo de la velocidad de recambio de los grupos fosfato que ésta posea.

Es evidente que la incorporación de fosfato en la molécula de glucógeno sintasa está catalizada por proteína quinasas. Puesto que el donador de grupos fosforilo en este tipo de reacciones es el ATP, al ceder el fosfato que ocupa su posición gamma, se consideró necesario investigar la formación del compuesto [γ - ³²P]ATP con el fin de establecer los adecuados tiempos de incubación de las células con el isótopo.

La Figura 7 muestra la relación existente entre la radioactividad específica de [γ - ³²P]ATP intracelular y el

**FIGURA 7. DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD
ESPECIFICA DEL [γ -³²P]ATP INTRACELULAR.**

Se incubaron alícuotas de una suspensión celular con [³²P]fosfato (0,1 mCi/ml) durante diferentes tiempos. La actividad específica del [γ -³²P]ATP se determinó según lo descrito en 2.9.5.



tiempo de incubación de los hepatocitos con fosfato radioactivo. La radioactividad específica se determinó midiendo la radioactividad incorporada en la glucógeno fosforilasa a partir del ATP radioactivo formado, en reacción catalizada por la fosforilasa quinasa. La metodología empleada se describe en 2.9.5.

Como puede apreciarse, en las condiciones de incubación habituales (0,1 mCi/ml, $5-7 \times 10^6$ células/ml), la actividad específica del [γ -³²P]ATP intracelular aumentaba rápidamente durante los primeros 20 minutos de incubación para, transcurridos unos 40 minutos, estabilizarse en un valor de aproximadamente 25 cpm/pmol.

Puesto que nuestra intención era estudiar de que manera una serie de efectores podían variar el estado de fosforilación de la glucógeno sintasa, consideramos conveniente verificar si los efectores empleados podían alterar tanto la concentración intracelular de ATP como su actividad específica. De esta manera sería posible averiguar si los efectos sobre la fosforilación del enzima que pudieran observarse podían estar afectados por variaciones en alguno de estos parámetros.

Con este fin se determinaron la concentración intracelular de ATP y la radioactividad específica del fosfato en la posición gamma del nucleótido, tanto en células control como en células tratadas con diversos efectores (glucagon, adrenalina, etc.). En ningún caso se pudieron

observar variaciones significativas en los parámetros estudiados debidas a la incubación con los efectores a las concentraciones y tiempos de incubación que fueron empleados posteriormente en los experimentos de fosforilación del enzima en hepatocitos. En base a ello, pudo establecerse que los incrementos o disminuciones observadas en el estado de fosforilación del enzima no estaban condicionadas por la asequibilidad del ATP intracelular ni por su radioactividad específica.

En virtud de estos resultados y los expuestos en 3.4.1 se consideró apropiado incubar las células con el fosfato radioactivo durante 45-60 minutos, tiempo suficiente para asegurar un alto marcaje radioactivo del enzima sin comprometer la viabilidad ni la integridad celular. Estos tiempos de incubación con el isótopo radioactivo resultaron ser similares a los empleados por otros autores para realizar el marcaje intracelular de numerosas proteínas tanto en hepatocitos aislados de rata como en otros tipos de células y tejidos.

3.2.3 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA GLUCOGENOS SINTASA DE HEPATOCITOS PREINCUBADOS CON [³²P]FOSFATO

3.2.3.1 Centrifugaciones diferenciales

Una vez finalizadas las incubaciones de las células con el isótopo radioactivo y, en su caso, con los adecuados efectores, las suspensiones de células hepáticas eran centrifugadas tal como se describe en 2.8.3.

El paquete celular obtenido ($2,5-3,5 \times 10^7$ células) era resuspendido en 400 μ l de una disolución amortiguadora compuesta por Tris 10 mM, fluoruro potásico 150 mM, EDTA 15 mM, sacarosa 0,6 M, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, leupeptina 25 μ g/ml y β -mercaptoetanol 50 mM, ajustada a pH 7,4 y mantenida a 4° C en un baño de hielo-agua. La suspensión celular era homogeneizada con ayuda de un pistilo de teflón acoplado a un motor eléctrico.

El homogenado se centrifugaba a 10000 xg durante 20 minutos a 4° C, recogándose el sobrenadante. El citado sobrenadante era sometido a ultracentrifugación a 100000 xg durante 60 minutos a la misma temperatura. El sobrenadante obtenido, que contenía más del 90% de la actividad glucógeno sintasa inicial, era diluido con un volumen igual de una disolución compuesta por Tris 10 mM, fluoruro potásico 150 mM y EDTA 15 mM, ajustada a pH 7,4 y mantenida a 4° C. La dilución del sobrenadante obtenido se llevó a cabo teniendo

en cuenta la alta concentración de sacarosa existente en el medio. La presencia del disacárido hacía que la solución fuera notablemente viscosa, fenómeno que influye negativamente en el proceso de inmunoprecipitación.

3.2.3.2 Obtención del inmunoprecipitado

El sobrenadante citoplasmático, una vez diluido, era incubado durante 2 horas a 4° C con 90 µl de la preparación de globulinas anti-glucógeno sintasa (35 mg/ml). Las condiciones de inmunoprecipitación fueron elegidas en un principio en base a lo descrito en la bibliografía, para ser modificadas convenientemente más tarde, según nuestra experiencia personal. Las condiciones iniciales, según pudimos comprobar, eran convenientes en lo que hace referencia a una adecuada precipitación del enzima. Sin embargo, bien porque suponían un tiempo de incubación excesivamente dilatado (4 horas) o bien porque la temperatura de incubación era excesivamente elevada (15° C), a menudo obteníamos evidencias de que el enzima había sufrido una seria proteólisis. Debido a ello consideramos adecuado reducir la temperatura de incubación a 4° C, con una considerable mejora en la integridad del enzima. La posterior reducción del tiempo de incubación de 4 a 2 horas no afectó a la recuperación del inmunoprecipitado, por lo que las nuevas condiciones fueron aplicadas de forma rutinaria en lo sucesivo.

Finalizado el periodo de incubación la mezcla era

centrifugada durante 5 minutos en una microcentrífuga Eppendorf (modelo 3200). El inmunoprecipitado obtenido era resuspendido en 300 μ l de una disolución formada por Tris 10 mM, fluoruro potásico 150 mM y EDTA 15 mM (pH 7,4) con ayuda de un vibrador Eppendorf (modelo 3300) durante 2 minutos. El resuspendido era centrifugado nuevamente con objeto de liberar al inmunoprecipitado de contaminantes precipitados de forma no específica. El proceso de resuspensión y centrifugación del inmunoprecipitado era ejecutado dos veces.

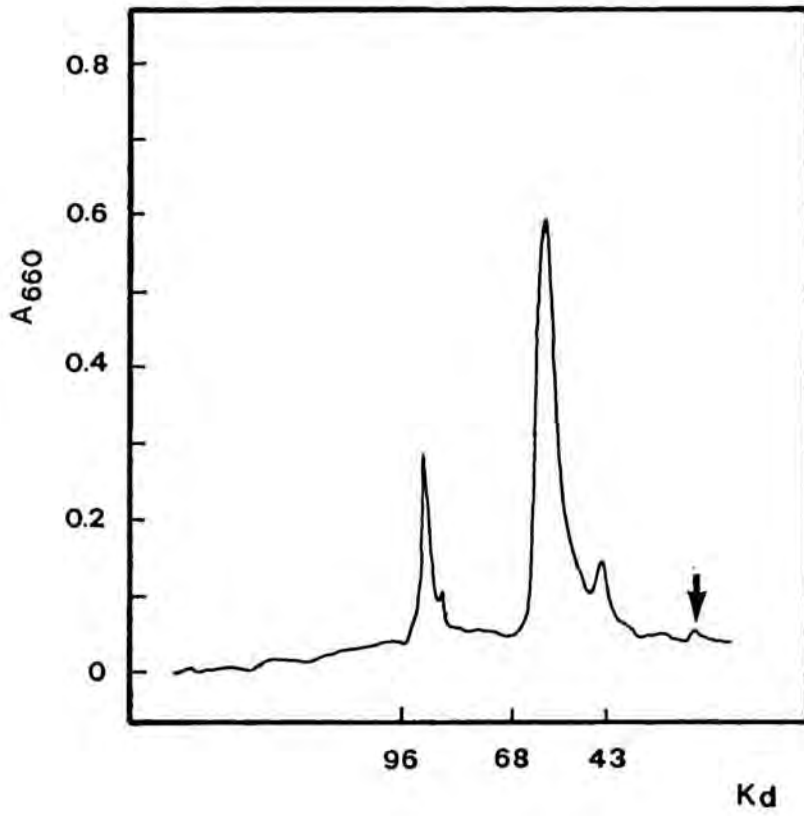
Finalmente, el precipitado obtenido se disolvía en 200 μ l de una disolución compuesta por ácido fórmico al 70% (v/v) y β -mercaptoetanol 50 mM, capaz de disgregar los inmunocomplejos.

3.2.3.3 Análisis del inmunoprecipitado

Con el fin de analizar la composición del inmunoprecipitado, una alícuota (20-40 μ l) de la solución obtenida era llevada a sequedad por evaporación al vacío y sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. La proteína existente en el gel se ponía en evidencia mediante el colorante Azul de Coomassie (véase 2.10.1.4). Como puede verse en la Figura 8, la tinción del gel muestra una banda de peso molecular 88 Kd, atribuible a la subunidad de la glucógeno sintasa. La banda de proteína mayoritaria, de peso molecular aproximado 55 Kd corresponde a la cadena pesada de las inmunoglobulinas empleadas en la precipitación.

**FIGURA 8. INMUNOPRECIPITACION DE LA GLUCOGENO
SINTASA DE EXTRACTOS DE HEPATOCITOS**

El inmunoprecipitado se sometió a electroforesis. Una vez teñido y seco, se obtuvo el perfil densitométrico del gel. En abcisas se representan los pesos moleculares de diversas proteínas patrón de peso molecular conocido. La banda mayoritaria, de aproximadamente 55 Kd, corresponde a la cadena pesada de las IgG.



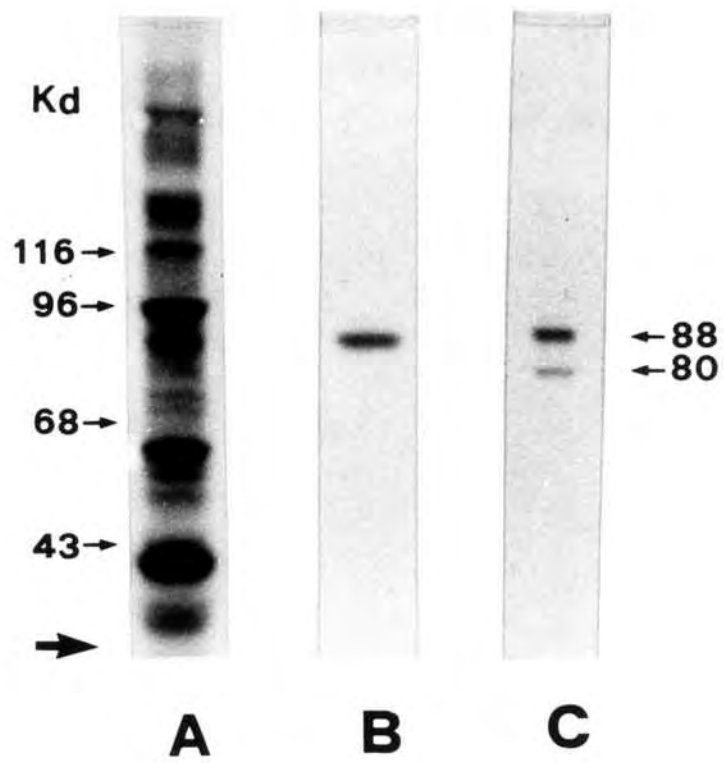
La absoluta especificidad del proceso de inmunoprecipitación se hizo patente al comparar las autorradiografías mostradas en la Figura 9. En A se muestra el patrón electroforético del sobrenadante citoplasmático de 100000 xg, a partir del cual la glucógeno sintasa era inmunoprecipitada. Como puede ser observado, de entre las numerosísimas proteínas que eran capaces de incorporar fosfato radioactivo a lo largo del proceso de incubación celular con el isótopo, las preparaciones de anticuerpos eran capaces de precipitar selectivamente una única banda radioactiva, asociada a una proteína de 88 Kd (B).

La identidad entre esta proteína y la subunidad de la glucógeno sintasa resultaba evidente puesto que presentaba idéntica movilidad electroforética que la de preparaciones de glucógeno sintasa hepática homogénea fosforiladas "in vitro" por diversas proteína quinasas.

La gran labilidad de la molécula de glucógeno sintasa, particularmente susceptible al ataque por proteasas, pudo ser observada cuando no se incluía en la solución de homogeneización celular los inhibidores de proteasas o la sacarosa. En estos casos, el análisis electroforético del inmunoprecipitado revelaba la existencia de una segunda banda de radioactividad (C), correspondiente a una proteína de 78-80 Kd, cuya intensidad podía, en ocasiones, igualar a la de la subunidad original. La movilidad electroforética de esta segunda banda coincidía con la correspondiente al producto proteolítico observado al analizar en las mismas condiciones

**FIGURA 9. ESPECIFICIDAD DE LA REACCION DE
INMUNOPRECIPITACION**

En A) se muestra la autorradiografía correspondiente al patrón electroforético del sobrenadante citoplasmático de hepatocitos de rata incubados con [³²P]fosfato. B) Inmunoprecipitado de glucógeno sintasa. C) Inmunoprecipitado en el que se puede apreciar la degradación proteolítica de la subunidad del enzima.



el enzima purificado por métodos convencionales a partir de hígado de rata.

Con el fin de comprobar que el inmunoprecipitado obtenido no contenía fosfopéptidos de bajo peso molecular, inobservables al analizar el inmunocomplejo en geles al 7% de acrilamida, éste fue sometido regularmente a electroforesis en geles de poliacrilamida formando un gradiente del polímero del 6 al 20%. El análisis de las autorradiografías obtenidas (Figura 10) demostró que en el inmunoprecipitado la única proteína fosforilada correspondía a la banda de 88 Kd. En cualquier caso, el peso molecular de esta proteína fue establecido por interpolación con la recta obtenida a partir de diversas proteínas patrón de peso molecular conocido (Figura 11).

En ocasiones la inmunoprecipitación se realizaba directamente a partir del sobrenadante de 10000 xg, diluido tal como se indica en 3.2.3.1. El análisis electroforético del inmunoprecipitado proporcionaba un patrón idéntico al de la Figura 10, indicando que la omisión del paso de ultracentrifugación no disminuía en absoluto la especificidad propia de la inmunoprecipitación.

FIGURA 10.- ELECTROFORESIS EN GRADIENTE DE POLIACRILAMIDA DE UN INMUNOPRECIPITADO DE GLUCOGENO SINTASA.

El inmunoprecipitado obtenido a partir de hepatocitos incubados con [³²P]fosfato fue sometido a electroforesis en gradiente de poliacrilamida (6-20%) en presencia de SDS. La figura muestra la autorradiografía obtenida a partir del gel fijado y seco. Los valores mostrados a la izquierda indican los pesos moleculares de diferentes proteínas patrón.

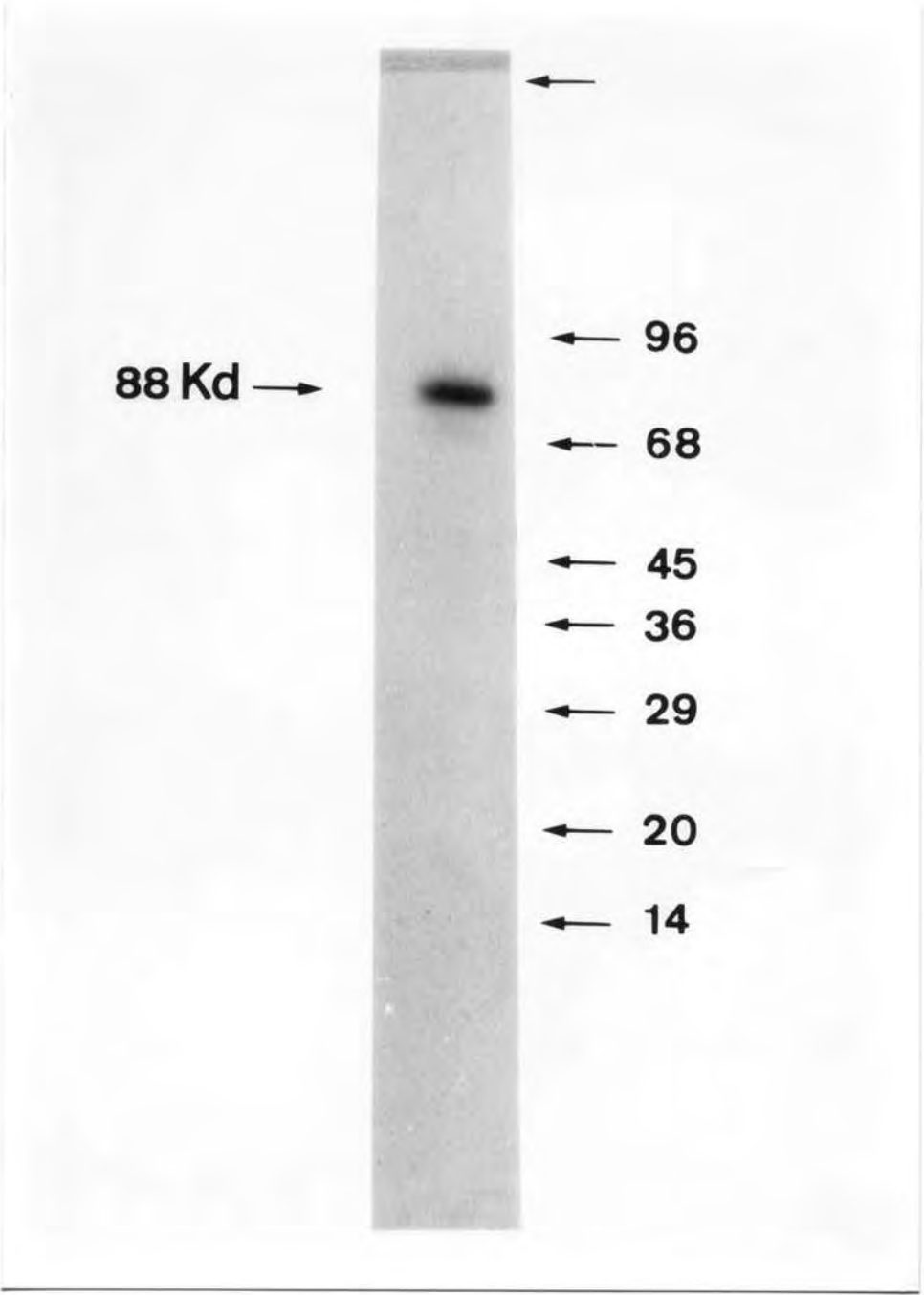
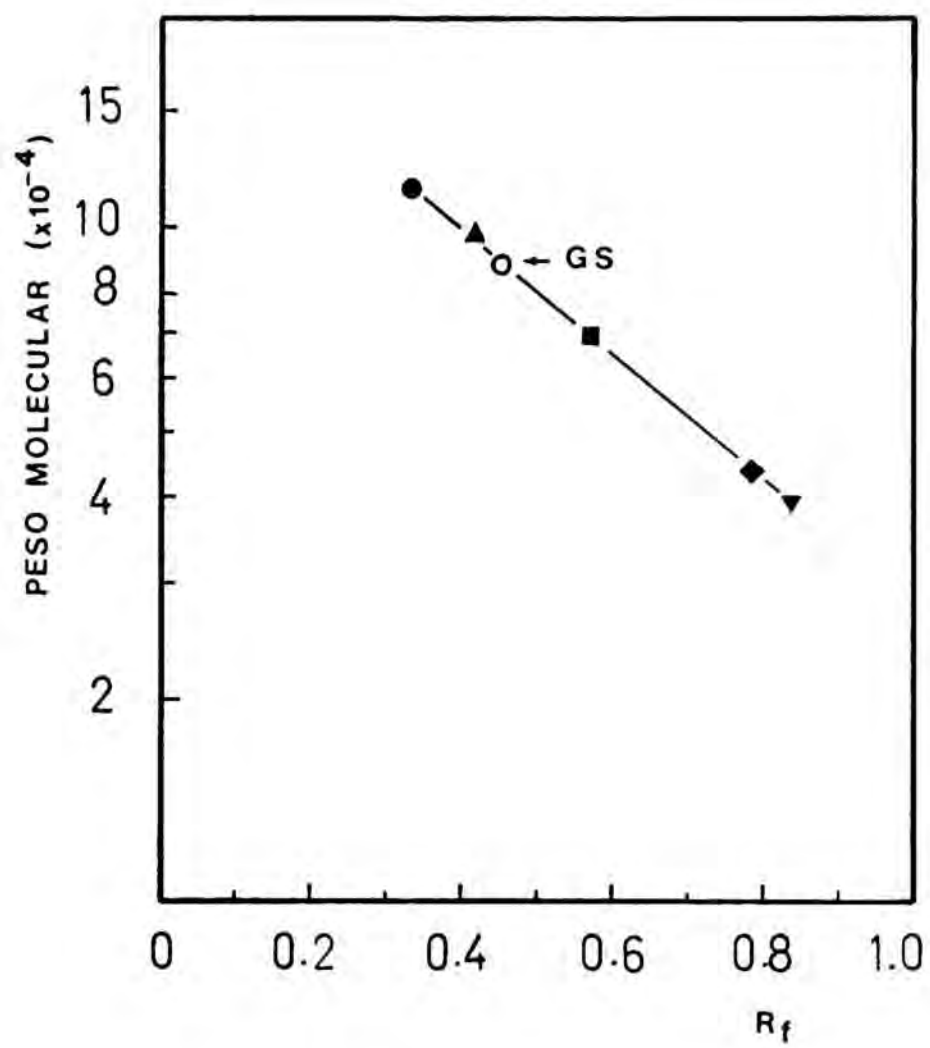


FIGURA 11. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD DE LA GLUCOGENO SINTASA FOSFORILADA "IN VIVO".

Se representa la migración relativa de la glucógeno sintasa (○) y de diferentes proteínas patrón frente al logaritmo de sus pesos moleculares. Los datos se obtuvieron a partir de electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS. Las proteínas empleadas fueron: β -galactosidasa, 116 Kd (●); fosforilasa, 96 Kd (▲); BSA, 68 Kd (■); ovoalbúmina, 43 Kd (◆) y aldolasa, 40 Kd (▼).



3.3 ESTUDIO DEL PATRON DE FOSFORILACION DE PROTEINAS CITOPLASMATICAS EN HEPATOCITOS DE RATA. IDENTIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTASA

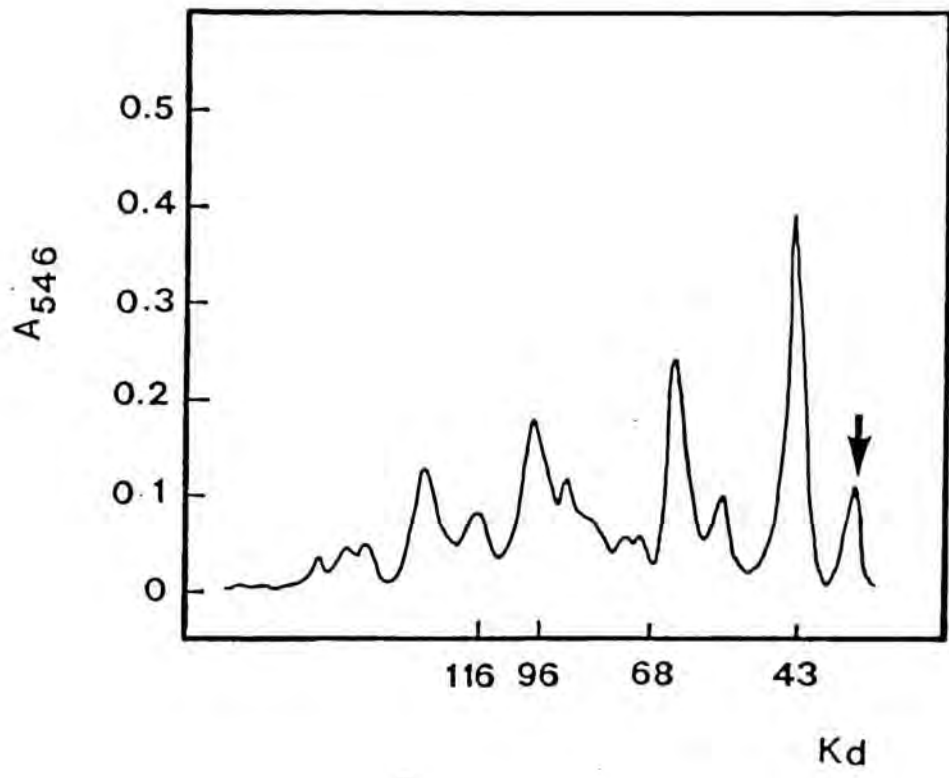
El estudio del conjunto de proteínas citoplasmáticas que incorporan fósforo radioactivo durante el proceso de incubación de las células con el isótopo se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para ello se tomaban alícuotas (20 μ l) del sobrenadante citoplasmático momentos antes de añadir los anticuerpos. Las citadas alícuotas eran tratadas con ácido tricloroacético a una concentración final del 10%. El precipitado de proteína formado se recogía por centrifugación (12500 xg, 3 minutos) y se resuspendía en 60 μ l de una disolución de TCA al 5%. Tras centrifugar, el proceso se repetía una vez más. Finalmente, el precipitado obtenido era tratado con 100 μ l de éter etílico y la muestra se centrifugaba hasta evaporación con el fin de disminuir la acidez de la misma.

El sedimento obtenido era tratado tal como se describió en 2.10.1.2 y era sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida. La Figura 9A muestra el conjunto de bandas radioactivas detectadas por autorradiografía del gel y en la Figura 12 se muestra el perfil densitométrico obtenido a partir de una de estas autorradiografías.

Como puede observarse en ambas figuras, se obtenía un complejo patrón de proteínas fosforiladas de las que pueden

**FIGURA 12. FOSFOPROTEINAS CITOPLASMATICAS EN
HEPATOCITOS DE RATA**

Perfil densitométrico de una autorradiografía correspondiente a las fosfoproteínas presentes en un sobrenadante de 100000 xg. En abcisas se representan los pesos moleculares de diferentes proteínas patrón. En ordenadas se presenta la absorción a 546 nm expresada en unidades arbitrarias.



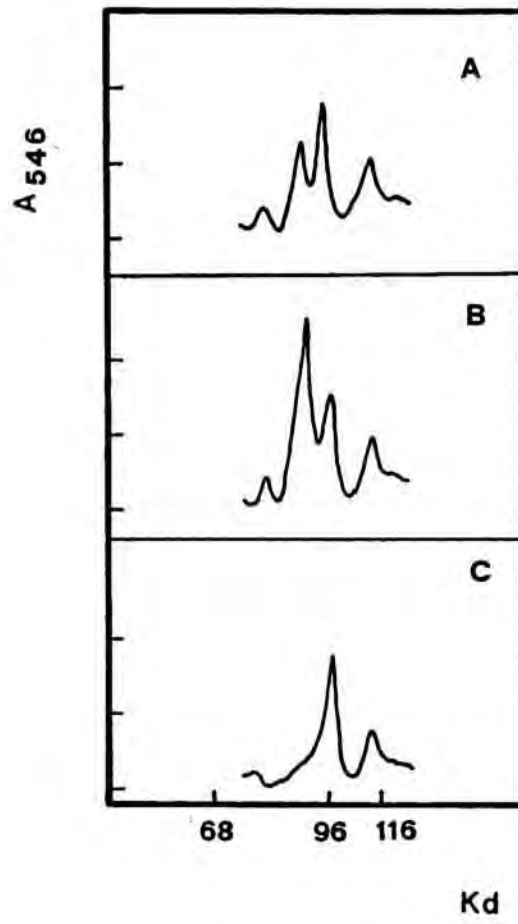
individualizarse no menos de 13 en un intervalo que abarca un rango de pesos moleculares de 200 a 40 Kd. Es indudable que muchas de estas bandas correspondían a mezclas de proteínas que no eran resueltas por el método analítico empleado.

En la Figura 12 es de notar la presencia de dos bandas radioactivas con un peso molecular de 88 y 96 Kd, análogo a los de la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa, respectivamente. En base a ello consideramos la posibilidad de detectar sobre el patrón de proteínas citoplasmáticas la presencia de glucógeno sintasa. La evidencia de que la banda de 88 Kd se correspondía con la glucógeno sintasa se obtuvo de dos diferentes maneras.

En primer lugar se procedió a preparar un sobrenadante citoplasmático a partir de células incubadas con fosfato radioactivo. Se tomaron 2 alícuotas (A y B) que se mantuvieron a 4° C durante dos horas, mientras el resto del sobrenadante era sometido a inmunoprecipitación. Una vez centrifugado y separado el inmunoprecipitado, se tomó una tercera alícuota (C) del sobrenadante de la inmunoprecipitación. El inmunoprecipitado fue entonces disuelto en 200 µl de una solución de ácido fórmico al 70% y β-mercaptoetanol 50 mM. Las tres alícuotas se precipitaron con TCA al 10% y el precipitado se lavó tal como ha sido descrito anteriormente. A la alícuota B le fueron añadidos 5 µl de la solución del inmunoprecipitado y todas ellas se evaporaron a sequedad para ser, finalmente, sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de

**FIGURA 13. IDENTIFICACION DE LA GLUCOGENO
SINTASA**

En A) se presenta el análisis densitométrico de una autorradiografía de las fosfoproteínas citoplasmáticas de los hepatocitos, en el intervalo 60-100 Kd. La adición al sobrenadante citoplasmático de una alícuota del inmunoprecipitado provoca un incremento de la banda de 88 Kd (B). El análisis del sobrenadante tras la inmunoprecipitación muestra la desaparición de la citada banda (C).



SDS.

El resultado de este experimento se muestra en la Figura 13, que ofrece el análisis densitométrico de la zona correspondiente al intervalo 60-100 Kd para las tres muestras. Como puede apreciarse, la comparación entre A y B muestra un notable incremento en la banda de 88 Kd. El resto del patrón no se modificaba significativamente.

Por otra parte, el análisis electroforético del sobrenadante citoplasmático resultante tras la inmunoprecipitación (C) muestra la desaparición casi total de la banda de 88 Kd. El conjunto de estos datos indica que la banda de 88 Kd detectada por autorradiografía de sobrenadantes citoplasmáticos de hepatocitos de rata puede corresponder a la subunidad de la glucógeno sintasa. Por otro lado, proporcionan la evidencia de que los anticuerpos son capaces de retirar del sobrenadante la mayor parte de la glucógeno sintasa existente en el mismo.

3.4 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE INMUNOPRECIPITACION

Se han realizado estudios con el fin de optimizar la recuperación de la glucógeno sintasa en los inmunoprecipitados, así como el marcaje isotópico del enzima por incubación de los hepatocitos con [³²P]fosfato.

3.4.1 ESTUDIO DEL TIEMPO DE INCUBACION DE LOS HEPATOCITOS CON FOSFATO RADIOACTIVO

Las experiencias descritas en 3.2.2, mediante las cuales estudiamos la formación de [γ -³²P]ATP en función del tiempo de incubación de las células con el isótopo, suministraron una primera idea sobre los tiempo de incubación adecuados. No obstante, se consideró pertinente investigar directamente como variaba la radioactividad incorporada en la molécula de glucógeno sintasa con el tiempo de incubación de los hepatocitos. Para ello, alícuotas celulares se incubaron durante diferentes periodos con [³²P]fosfato y se inmunoprecipitó el enzima. Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis en presencia de SDS y la radioactividad incorporada en la molécula de glucógeno sintasa se cuantificó por densitometría de las correspondientes autorradiografías.

El resultado se muestra en la figura 14. En ella puede observarse que en los primeros minutos se produce un rápido incremento en la radioactividad incorporada por el enzima, la cual alcanza un máximo aproximadamente a los 60 minutos de incubación con el isótopo.

Como puede deducirse mediante la comparación de la Figura 7 con la 14, la máxima incorporación de fosfato radioactivo en el enzima se obtiene pocos minutos después de que la actividad específica del $[\gamma - {}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ alcance sus máximos valores. Ello es una indicación de que la molécula de glucógeno sintasa sufre un rápido recambio de sus grupos fosfato.

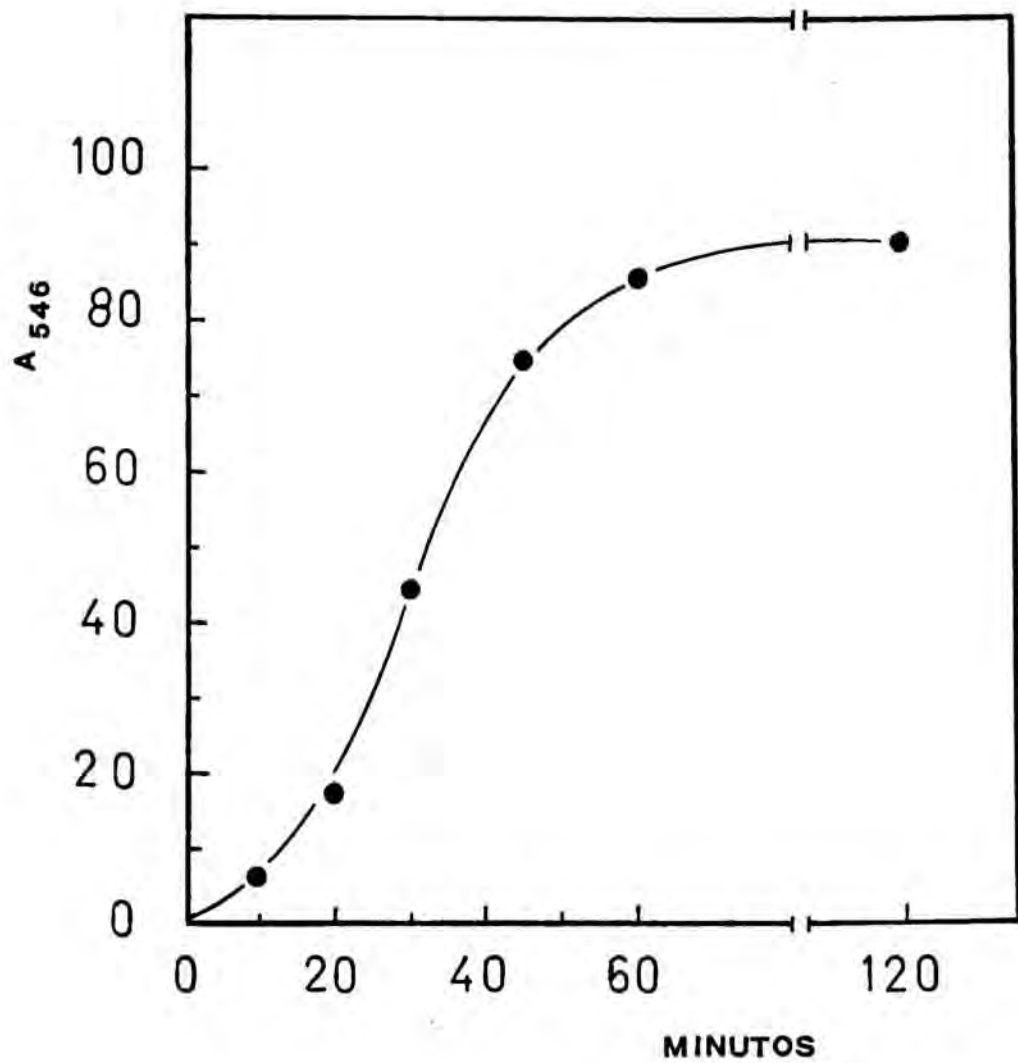
3.4.2 OPTIMIZACION DE LA REACCION DE INMUNOPRECIPITACION

Una vez establecidas las condiciones referentes a concentración celular, tiempo de incubación con el isótopo y cantidad del mismo, se consideró necesario estudiar la óptima relación entre nuestras preparaciones de anticuerpos y el enzima existente en los sobrenadantes citoplasmáticos celulares. De esta manera se pretendía obtener una máxima recuperación en la reacción de inmunoprecipitación.

Si bien se disponía de algunos datos al respecto, extraídos de las curvas de titulación del anticuerpo realizadas, el establecimiento de la relación óptima sólo podía hacerse investigando directamente la cantidad del

**FIGURA 14. MARCAJE ISOTOPICO DE LA GLUCOGENO
SINTASA DE HEPATOCITOS DE RATA**

Los hepatocitos fueron incubados durante diferentes tiempos con [³²P]fosfato. Tras ello, la glucógeno sintasa fue inmunoprecipitada y el inmunoprecipitado se sometió a electroforesis y autorradiografía. La cantidad de radioactividad asociada a la subunidad del enzima se determinó por densitometría de los autorradiogramas.



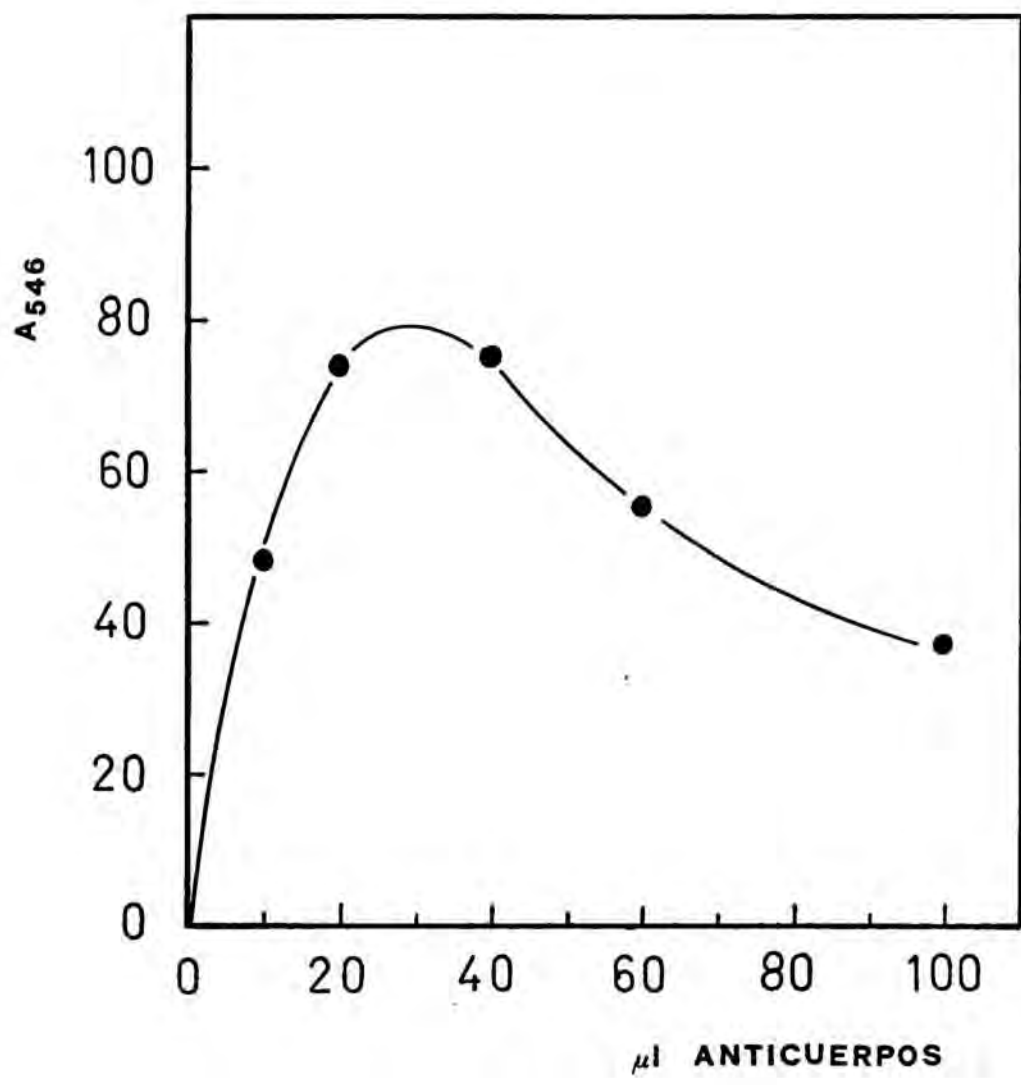
enzima inmunoprecipitado en función de la cantidad de anticuerpos empleados.

Para ello, diversas alícuotas (150 μ l) de un sobrenadante citoplasmático obtenido a partir de células incubadas con fosfato radioactivo, fueron diluidas convenientemente e incubadas en las condiciones establecidas con concentraciones variables del anticuerpo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15, en la que puede verse como el incremento en la concentración de anticuerpo acarrea un aumento paralelo de la cantidad de enzima inmunoprecipitado. Una vez alcanzada la zona de máxima precipitación y ante un exceso de anticuerpo, la recuperación del enzima disminuía paulatinamente. Según estos datos se calculó la cantidad de anticuerpos óptima, que resultó ser de 2,6-3,6 μ l por cada millón de células, y que fue la utilizada a lo largo de la experimental descrita.

Se analizó, por otra parte, la utilidad de la proteína A de S. aureus para incrementar la recuperación de la glucógeno sintasa en el inmunoprecipitado. No obstante, no se detectó un mejora significativa en el proceso y, en consecuencia, se omitió en sucesivos experimentos.

FIGURA 15. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE ANTICUERPOS EN LA REACCION DE INMUNOPRECIPITACION.

Alícuotas de un sobrenadante citoplasmático procedentes de hepatocitos preincubados con ³²P]fosfato se incubaron con diferentes cantidades de anticuerpos. La cantidad de glucógeno sintasa recuperada tras la inmunoprecipitación se determinó por análisis densitométrico de los autorradiogramas obtenidos tras electroforesis de los inmunoprecipitados.



3.5.3 EFEECTO DEL GLUCOGENO

La glucógeno sintasa es capaz de asociarse a las moléculas de glucógeno y de esta manera se encuentra en el hígado. A pesar de que el contenido en glucógeno del hígado de ratas sometidas a un ayuno de 24 horas es muy bajo y en estas condiciones la sintasa se encuentra como proteína soluble en la fracción citoplasmática, consideramos necesario investigar de que manera la asociación con el glucógeno podía afectar el proceso de inmunoprecipitación.

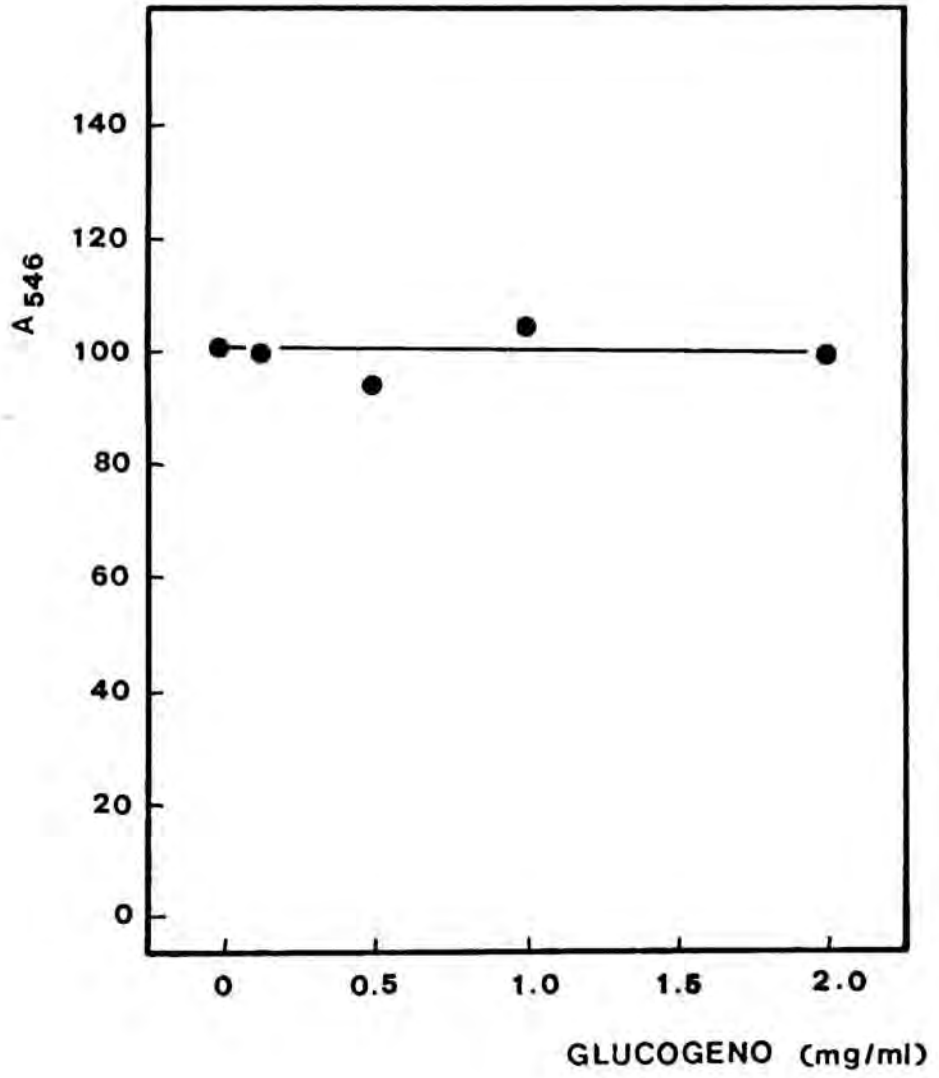
Se incubaron alícuotas de una suspensión celular (2,3 ml, $5-6 \times 10^6$ células/ml) con ortofosfato radioactivo durante 45 minutos. Una vez homogeneizadas las células, el homogenado se centrifugó a 10000 xg durante 20 minutos a 4° C y los sobrenadantes obtenidos se reunieron y, a continuación, se repartieron en alícuotas de 150 µl. A estas alícuotas se les añadieron disoluciones acuosas de glucógeno de hígado de conejo a la concentración necesaria para que la concentración del polisacárido oscilara entre el 0,2 y el 2%. El volumen final de la mezcla era de 263 µl.

Las alícuotas así preparadas se incubaron durante 1 hora a 4° C. Tras ello se les añadieron 40 µl de la preparación de anticuerpos a cada una de ellas, realizándose el proceso de obtención del inmunoprecipitado tal como se ha descrito anteriormente.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos al

FIGURA 16. EFECTO DEL GLUCOGENO EN LA REACCION DE INMUNOPRECIPITACION.

Sobrenadantes citoplasmáticos procedentes de células preincubadas con [³²P]fosfato se incubaron con los anticuerpos en presencia de diferentes concentraciones de glucógeno. Tras realizar la electroforesis de los inmunoprecipitados obtenidos, se determinó la cantidad de glucógeno sintasa recuperada mediante densitometría de los autorradiogramas correspondientes.



cuantificar las autorradiografías obtenidas a partir de las electroforesis de los inmunoprecipitados. Como puede observarse, dentro del rango de concentraciones de glucógeno ensayadas, la presencia del polisacárido no afectaba significativamente el proceso de inmunoprecipitación.

3.5 FRAGMENTACION DE LA GLUCOGENO SINTASA

La propia naturaleza de la glucógeno sintasa en lo que se refiere a su capacidad para ser fosforilada "in vitro" en diferentes lugares de la molécula ha motivado el desarrollo de diferentes técnicas de fragmentación del enzima. Esta fragmentación puede realizarse, de manera general, empleando dos tipos de métodos: químicos y enzimáticos.

El análisis de los productos de degradación de la glucógeno sintasa fosforilada "in vitro", tal como se describe en el capítulo de Introducción, ha proporcionado un conocimiento notable aunque seguramente no exhaustivo de la distribución de los centros de fosforilación en la molécula enzimática. Este conocimiento se ha obtenido, fundamentalmente, estudiando el enzima de músculo esquelético de conejo.

Entre los métodos químicos el más profusamente empleado para el estudio de la glucógeno sintasa es la degradación por bromuro de cianógeno en medio ácido. Los métodos enzimáticos

aprovechan la acción específica de determinadas proteasas, tales como la tripsina, la proteasa V₈ de S. aureus, quimotripsina, etc.

En el trabajo que presentamos hemos estudiado en primer lugar la distribución de los grupos fosfato presentes en el enzima en condiciones basales tras tratamiento del mismo con bromuro de cianógeno.

3.5.1 FRAGMENTACION POR BROMURO DE CIANOGENO

La fragmentación del enzima con CNBr se realizó incubando el inmunoprecipitado con una solución ácida del producto según lo descrito en 2.11.1. Una vez evaporado, el residuo seco era sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Se ensayaron diferentes concentraciones de acrilamida para, finalmente, realizar las electroforesis empleando un gradiente lineal de acrilamida entre el 6 y el 20%, estabilizado con sacarosa.

Las condiciones de fragmentación descritas en 2.11.1 fueron establecidas después de diferentes pruebas. El criterio general fue el de emplear la mínima cantidad de CNBr, debido a la alta acidez que confiere a la muestra. Así, las primeras experiencias se realizaron empleando una concentración final de CNBr de 55 mg/ml. Este valor fue paulatinamente reducido hasta 10 mg/ml. Si bien la reacción

se completaba en pocas horas, por razones prácticas se llevaba a cabo durante 12 horas.

En cualquier caso, las autorradiografías obtenidas indicaban la presencia de dos fosfopéptidos. Estos fragmentos se denominaron, siguiendo la nomenclatura establecida, CB-2 y CB-1 (Figura 17). El fosfopéptido CB-2, que mostraba una menor movilidad electroforética, era el que contenía un mayor porcentaje de radioactividad. Su peso molecular fue estimado por comparación con proteínas de peso molecular conocido y resultó ser de 28 Kd. El fosfopéptido que contenía una menor cantidad de radioactividad (CB-1) mostraba un menor peso molecular que fue cifrado en 14 Kd, de acuerdo con el mismo criterio (Figura 18).

En algunas ocasiones la degradación de la glucógeno sintasa por bromuro de cianógeno producía un tercer fosfopéptido, de movilidad intermedia a los dos citados y con un peso molecular estimado en 20-21 Kd (Figura 17).

La aparición de este fosfopéptido se correlacionaba con una disminución de la radioactividad presente en CB-2 y era más evidente cuanto mayor era el grado de proteólisis observado en la subunidad del enzima. Debido a ello se consideró que este fosfopéptido, al que se denominó CB-2', se producía a partir de la población enzimática que había sufrido proteólisis. Es decir, que derivaba de la ruptura por CNBr de la proteína de 80 Kd reconocida por el anticuerpo y,

**FIGURA 17. FRAGMENTACION DE LA GLUCOGENO
SINTASA DE HEPATOCITOS CON CNBr.**

El inmunoprecipitado de glucógeno sintasa se incubó con CNBr según lo descrito en 2.11.1. Los productos de degradación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. En A) se muestra el análisis densitométrico de un autorradiograma en el caso del enzima no proteolizado. En B) aparece el perfil obtenido cuando el enzima se encontraba notablemente proteolizado.

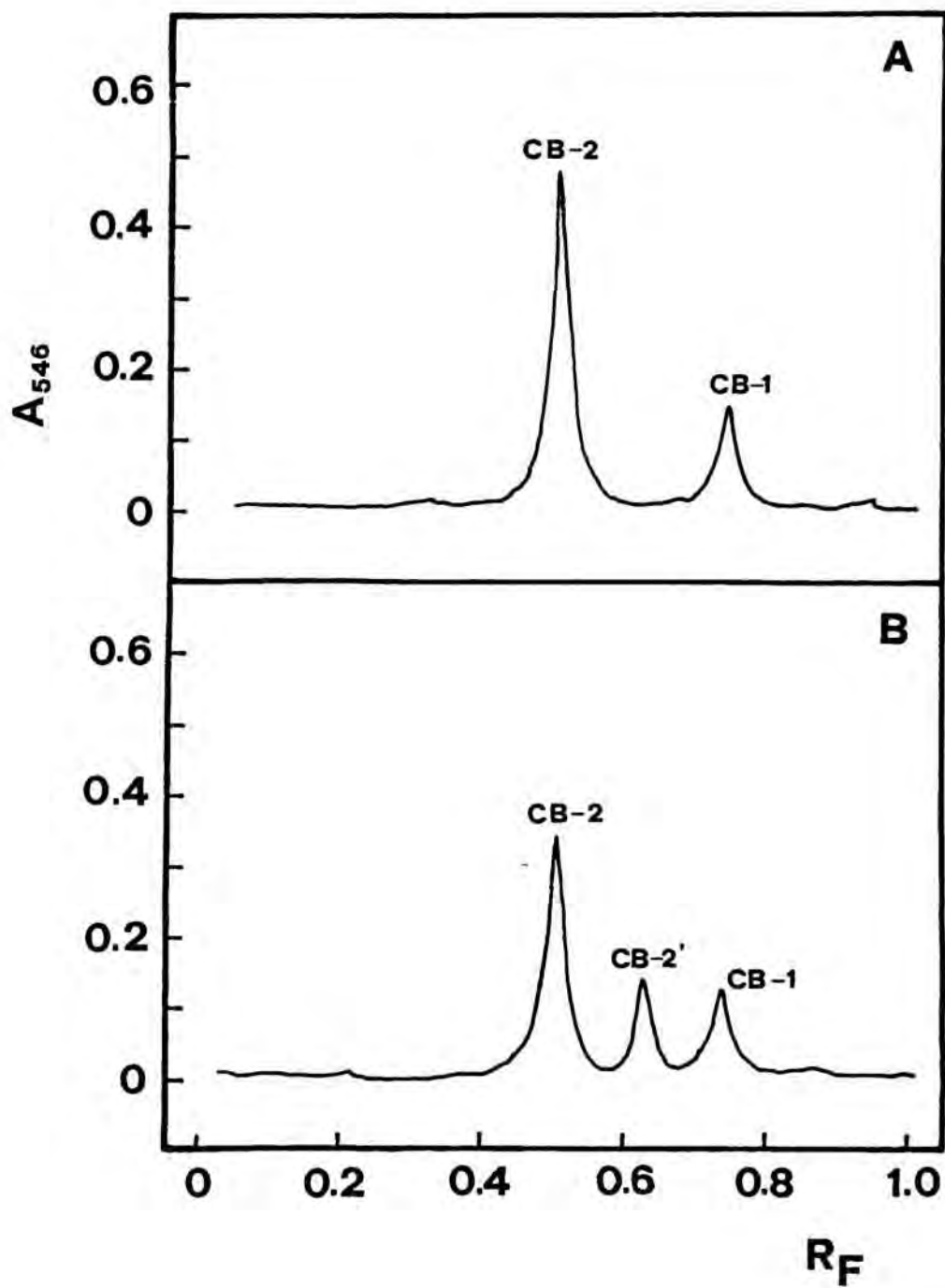
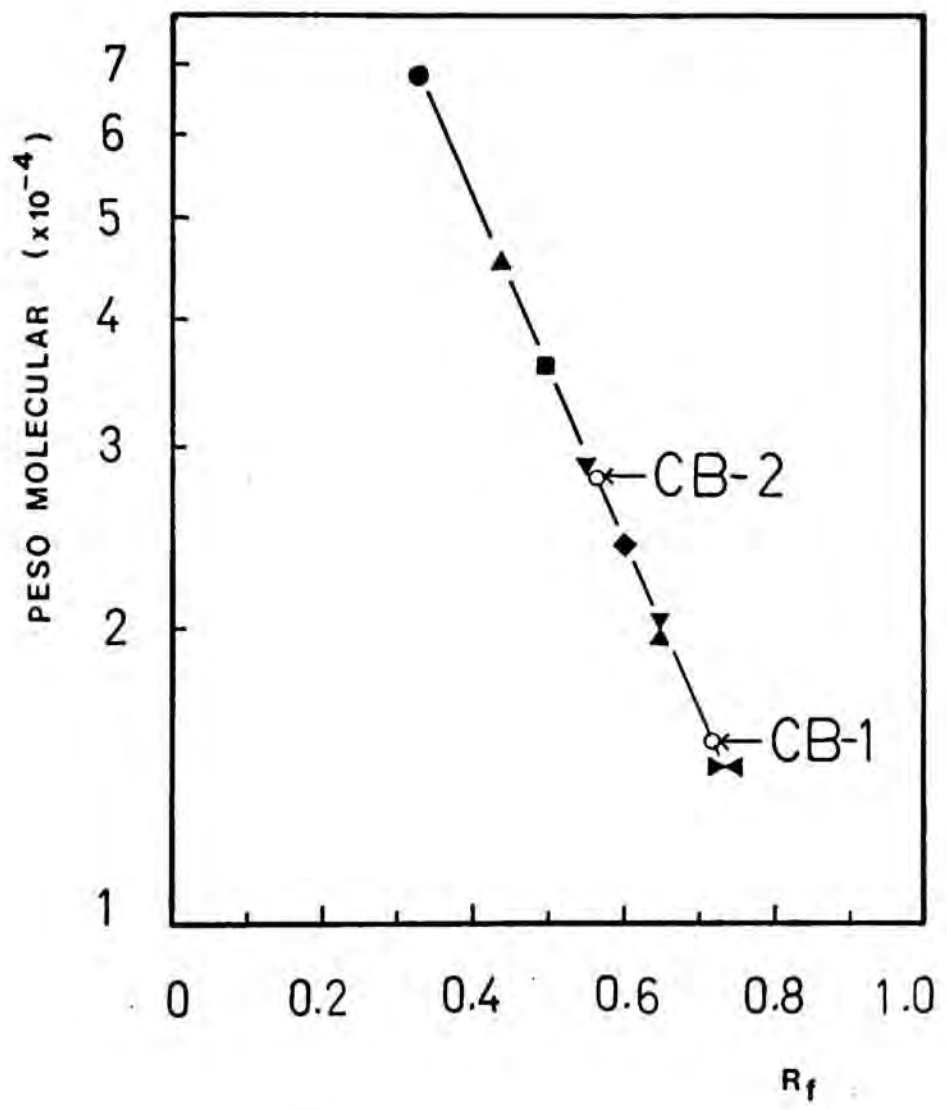


FIGURA 18. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS FOSFOPEPTIDOS CB-2 Y CB-1.

Se representa la migración relativa de los fosfopéptidos CB-2 y CB-1, junto con la de diferentes proteínas patrón de peso molecular conocido. Los datos se obtuvieron a partir de geles en gradiente de poliacrilamida (6-20%). Las proteínas patrón empleadas fueron: BSA, 68 Kd (●); ovoalbúmina, 45 Kd (▲); gliceraldehído-3P deshidrogenasa, 36 Kd (■); anhidrasa carbónica, 29 Kd (▼); tripsinógeno, 24 Kd (◆); inhibidor de tripsina (STI), 20 Kd (⌵) y α -lactalbúmina, 14,2 Kd (▶).



por lo tanto, su estructura correspondería a la de una parte de CB-2.

Como hemos comentado, el fragmento CB-2 contenía la mayor parte de la radioactividad presente en el gel. Este fenómeno ha sido una constante en el caso de células control a lo largo de todos los experimentos realizados. Con el fin de obtener una relación entre el contenido en fosfato radioactivo de ambos fosfopéptidos decidimos considerar el cociente entre la radioactividad asociada a CB-2 y la presente en CB-1. Este cociente variaba ligeramente de experimento a experimento, posiblemente en relación con el estado de activación basal del enzima, si bien no ha sido posible encontrar una estrecha correspondencia entre ambos parámetros.

El valor obtenido para el cociente CB-2/CB-1 en células control a lo largo de un buen número de experimentos ha sido de $3,14 \pm 0,31$, indicando por lo tanto que alrededor del 75% de la radioactividad presente en el enzima se encontraba asociada al fragmento de CNBr de mayor peso molecular.

A diferencia del fosfopéptido CB-2, el fragmento CB-1 no era afectado en sus características (peso molecular, etc.) por los fenómenos de proteólisis descritos.

3.5.2 FRAGMENTACION CON TRIPSINA

La fragmentación con tripsina del enzima inmunoprecipitado a partir de células incubadas con fosfato radioactivo se realizó tras el aislamiento de la subunidad enzimática por electroforesis. Para ello, el fragmento del gel que contenía la proteína (identificado previamente por autorradiografía) se incubó con tripsina tratada con TPCK, de tal manera que la acción de la proteasa se llevaba a cabo directamente sobre la proteína precipitada en el gel.

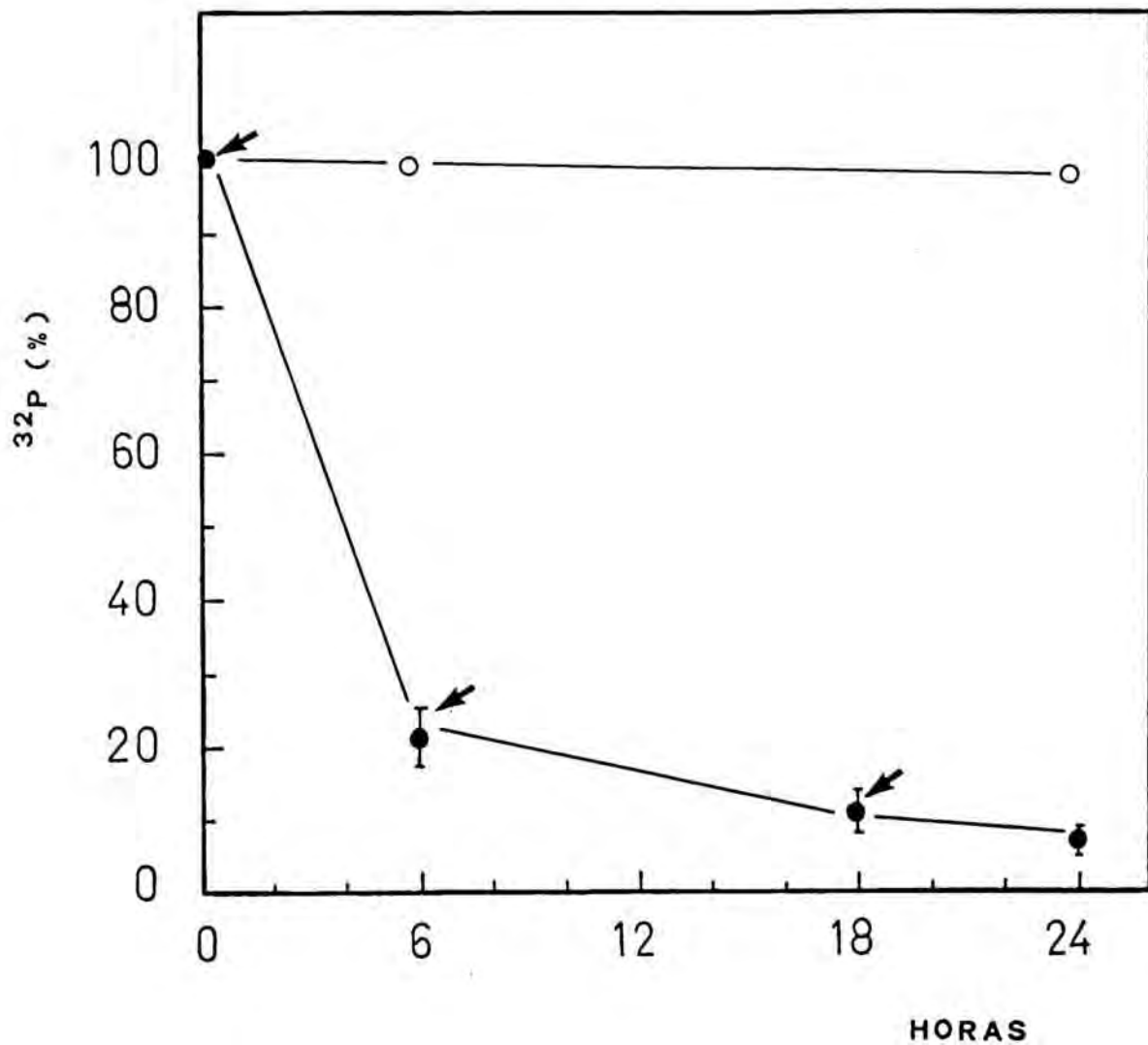
El medio de elección fue una solución de bicarbonato amónico a pH 7,8-8,0. Se ensayaron diferentes concentraciones de la sal, para finalmente optar por una concentración de 50 mM. A esta concentración la sal poseía suficiente capacidad amortiguadora y podía ser eliminada con cierta facilidad en el proceso de evaporación al vacío que se ejecutaba posteriormente.

Los fragmentos trípticos producidos poseían un tamaño suficientemente pequeño y podían difundir a la solución de incubación. De esta manera era posible recuperar más de un 90% de la radioactividad presente en el gel cuando la concentración de acrilamida no superaba el 10%. A concentraciones mayores el tratamiento con tripsina debía prolongarse y la recuperación era del 85% como máximo.

La Figura 19 muestra la solubilización de la

FIGURA 19. DEGRADACION TRIPTICA DE LA
GLUCOGENO SINTASA.

Los fragmentos de gel que contenían la subunidad de la glucógeno sintasa se incubaron en una solución de bicarbonato amónico 50 mM (pH 8,0) en ausencia (O) o presencia (●) de tripsina-TPCK (30 µg/ml). A tiempos determinados se cuantificó la cantidad de radioactividad remanente en el gel aprovechando el efecto Cerenkov. Las flechas indican nuevas adiciones de tripsina a la mezcla de incubación.



radioactividad a partir de un fragmento de gel al 7% de acrilamida que contenía la subunidad de la glucógeno sintasa, previamente fosforilada "in vitro". En cada caso se tomó el sobrenadante y la radioactividad remanente en el gel se cuantificó aprovechando el efecto Cerenkov.

En cualquier caso, los sobrenadantes reunidos se incubaban una vez más con tripsina durante 4-6 horas antes de ser evaporados a sequedad.

La separación de los fragmentos tripticos de la glucógeno sintasa fue intentada empleando distintas técnicas analíticas. En una primera aproximación se ensayaron diferentes sistemas de electroforesis en presencia de SDS, con el fin de caracterizar a los fragmentos en función de su peso molecular. No obstante en ningún caso se consiguió una buena resolución de los fragmentos obtenidos.

Se obtuvieron resultados más esperanzadores empleando electroforesis en capa fina a bajo voltaje seguida de cromatografía ascendente en una segunda dimensión. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la combinación de electroforesis a pH 3,5 y cromatografía en n-butanol/piridina/ácido acético/agua (50:33:1:40). Sin embargo este procedimiento se desestimó por dos razones. En primer lugar, obligaba a procesar separadamente cada muestra, lo cual lo convertía en un proceso muy lento y hacía difícilmente comparable los resultados entre sí. Por otro lado, aun en el mejor de los casos, una parte de la radioactividad aplicada

permanecía en el punto de siembra, lo cual imposibilitaba las comparaciones cuantitativas entre diferentes experimentos.

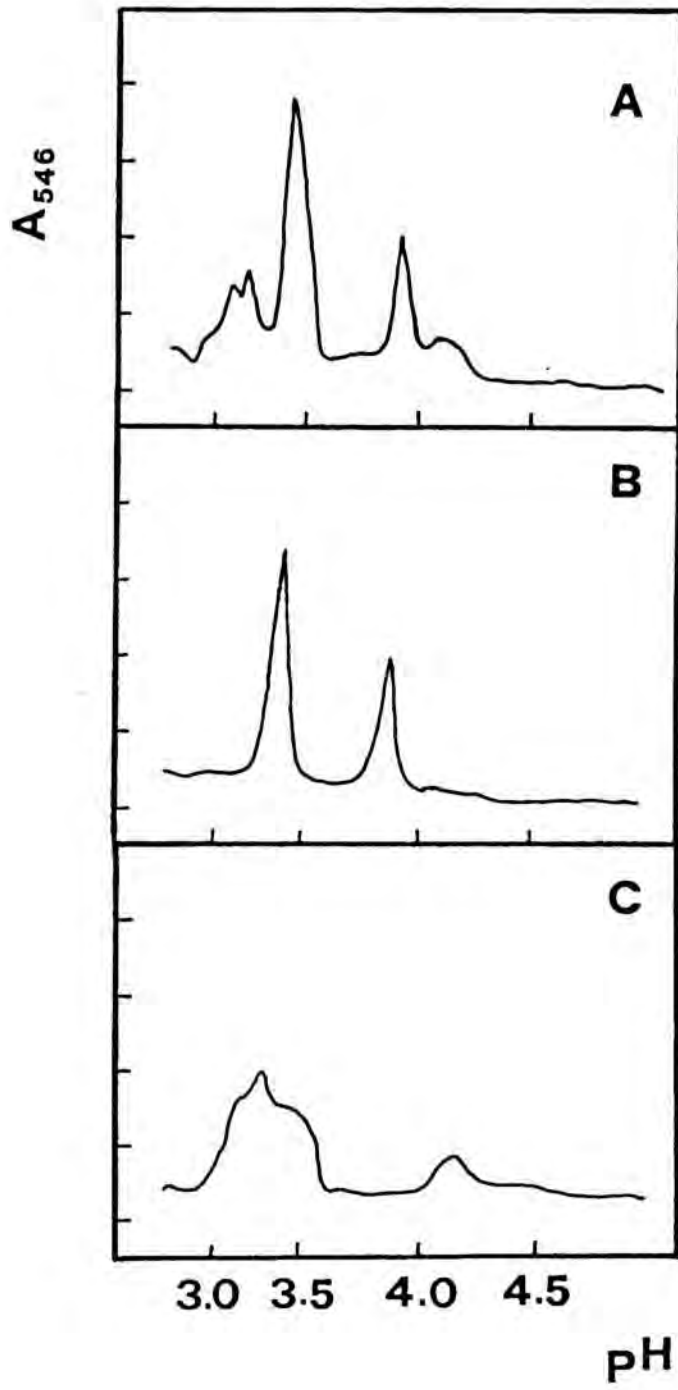
La técnica que mejores resultados nos ha proporcionado a la hora de resolver y cuantificar los fosfopéptidos resultantes de la fragmentación tríptica de la glucógeno sintasa ha sido el isoelectroenfoque empleando como soporte geles de poliacrilamida.

Una característica de los fragmentos trípticos del enzima es su carácter notablemente ácido. Este hecho era conocido ya en el caso del enzima de músculo esquelético de conejo y también había sido comprobado para el enzima hepático fosforilado "in vitro". Puesto que las preparaciones comerciales de anfolitos no cubrían adecuadamente el rango de pH necesario, se ensayaron diferentes combinaciones de los mismos. Por último, se seleccionó el protocolo descrito en 2.10.4.

Cuando los productos de tripsinización de la glucógeno sintasa de hepatocitos incubados con [³²P]fosfato en ausencia de efectores fueron sometidos a isoelectroenfoque, se obtuvo el patrón que se muestra en la Figura 20. Tal como puede observarse, se identifican claramente dos fosfopéptidos mayoritarios y otros minoritarios. El de menor movilidad, que

**FIGURA 20. ANALISIS TRIPTICO DE LA GLUCOGENO
SINTASA Y DE SUS FRAGMENTOS DE CNBr.**

La glucógeno sintasa se aisló por inmunoprecipitación a partir de hepatocitos incubados con [³²P]fosfato. La subunidad del enzima (A), así como los fosfopéptidos CB-1 (B) y CB-2 (C) fueron incubados con tripsina según lo descrito en 2.11.1 y los productos de degradación triptica analizados por isoelectroenfoque. La figura muestra los perfiles densitométricos obtenidos a partir de las correspondientes autorradiografías. En abcisas se indica la variación del pH a lo largo del gel.



posee un pI de 3,9, contiene aproximadamente el 21% de la radioactividad detectada sobre el gel. El segundo fosfopéptido, de carácter más ácido, muestra un pI de 3,4 y alberga el 57% de la radioactividad total.

Además de estos dos fosfopéptidos, fue posible identificar en la zona más ácida del gel la aparición de radioactividad. Se constató entonces la existencia de dos nuevos fosfopéptidos (pI 3,2 y 3,1, respectivamente), cuyo conjunto representa el 18% de la radioactividad total.

En consecuencia, es posible distinguir hasta 4 diferentes fosfopéptidos tras el tratamiento exhaustivo del enzima con tripsina. La presencia de estos fosfopéptidos ha sido detectada en todas y cada una de las experiencias realizadas. El patrón obtenido permanecía invariable aun duplicando el tiempo de exposición a la proteasa. Sin embargo, mediante una adecuada sobreexposición de las placas radiográficas, o en aquellos experimentos en que la incubación celular se llevaba a cabo con mayores cantidades del isótopo, fue posible identificar un quinto fosfopéptido. Al citado péptido se le atribuyó un pI de 4,1. Su aportación al total de la radioactividad presente en el gel era muy minoritaria y fue estimada en un 4%.

En resumen, el conjunto de datos obtenidos permite establecer que la glucógeno sintasa aislada de hepatocitos de rata, en ausencia de cualquier tipo de efector capaz de alterar la actividad basal del enzima, contiene no menos de

cuatro centros de fosforilación, que poseen en común un marcado carácter ácido.

3.5.3 DEGRADACION TRIPTICA DE LOS FRAGMENTOS DE CNBr

De forma paralela a los experimentos realizados para identificar el patrón de fosfopéptidos trípticos de la subunidad de la glucógeno sintasa, se llevaron a cabo análisis trípticos de los fosfopéptidos obtenidos por fragmentación del enzima con CNBr.

Para ello se utilizó el mismo protocolo que el empleado para la tripsinización de la subunidad, es decir, la incubación con tripsina en una solución de bicarbonato amónico de los fragmentos del gel que contenían el fosfopéptido en cuestión. En estos casos la recuperación de la radioactividad no era tan alta como en el caso de la subunidad, debido al mayor porcentaje de acrilamida requerido para la separación de CB-1 y CB-2. Sin embargo, prolongando adecuadamente el tratamiento se conseguía alcanzar más de un 80% de recuperación, siendo los valores obtenidos notablemente constantes en cualquier caso.

La técnica separativa empleada fue el isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en las mismas condiciones que se aplicaban para los fragmentos trípticos de la subunidad. En

estas condiciones la resolución de los fragmentos que provenían del tratamiento de CB-1 con tripsina era excelente. En cambio, los resultados obtenidos para CB-2 eran marcadamente inferiores y en ningún caso fue posible separar adecuadamente los fragmentos resultantes para proceder a una cuidadosa cuantificación de su radioactividad.

El tratamiento con tripsina del fragmento CB-1 da lugar a dos fosfopéptidos, tal como se muestra en la figura 20. Sus puntos isoeléctricos, determinados a partir de las curvas de gradiente de pH obtenidas, fueron de 3,9 y 3,4. El fosfopéptido más ácido contenía una mayor cantidad de radioactividad, a juzgar por los valores obtenidos tras el análisis densitométrico de las autorradiografías. Este fosfopéptido, que se denominó CB-1b, albergaba alrededor del 70% de la radioactividad, mientras que el fosfopéptido de pI 3,9, denominado CB-1a, contenía el 30% restante.

Estos experimentos permitieron poner en evidencia la existencia en condiciones basales de, al menos, dos centros de fosforilación en el fosfopéptido de menor peso molecular producido por fragmentación de la glucógeno sintasa con CNBr. Su aparición tenía lugar aun en condiciones de tripsinización exhaustiva prolongada durante más de 72 horas, indicando que no eran productos de proteolisis incompleta.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la técnica de isoelectroenfoque está fundamentada en la separación de moléculas de diferente punto isoeléctrico, cabía la

posibilidad de que ambos fosfopéptidos fueran un único péptido fosforilado en diferente medida. Ello podría dar lugar a dos bandas radioactivas capaces de enfocar en diferente zona del gel.

Con el fin de averiguar si CB-la y CB-lb eran péptidos diferentes, se procedió a separarlos por electroforesis en presencia de SDS empleando un gradiente de acrilamida del 15 al 25%. Una vez efectuadas las autorradiografías pudo comprobarse que ambos fosfopéptidos mostraban una diferente movilidad electroforética en las condiciones empleadas (Figura 21).

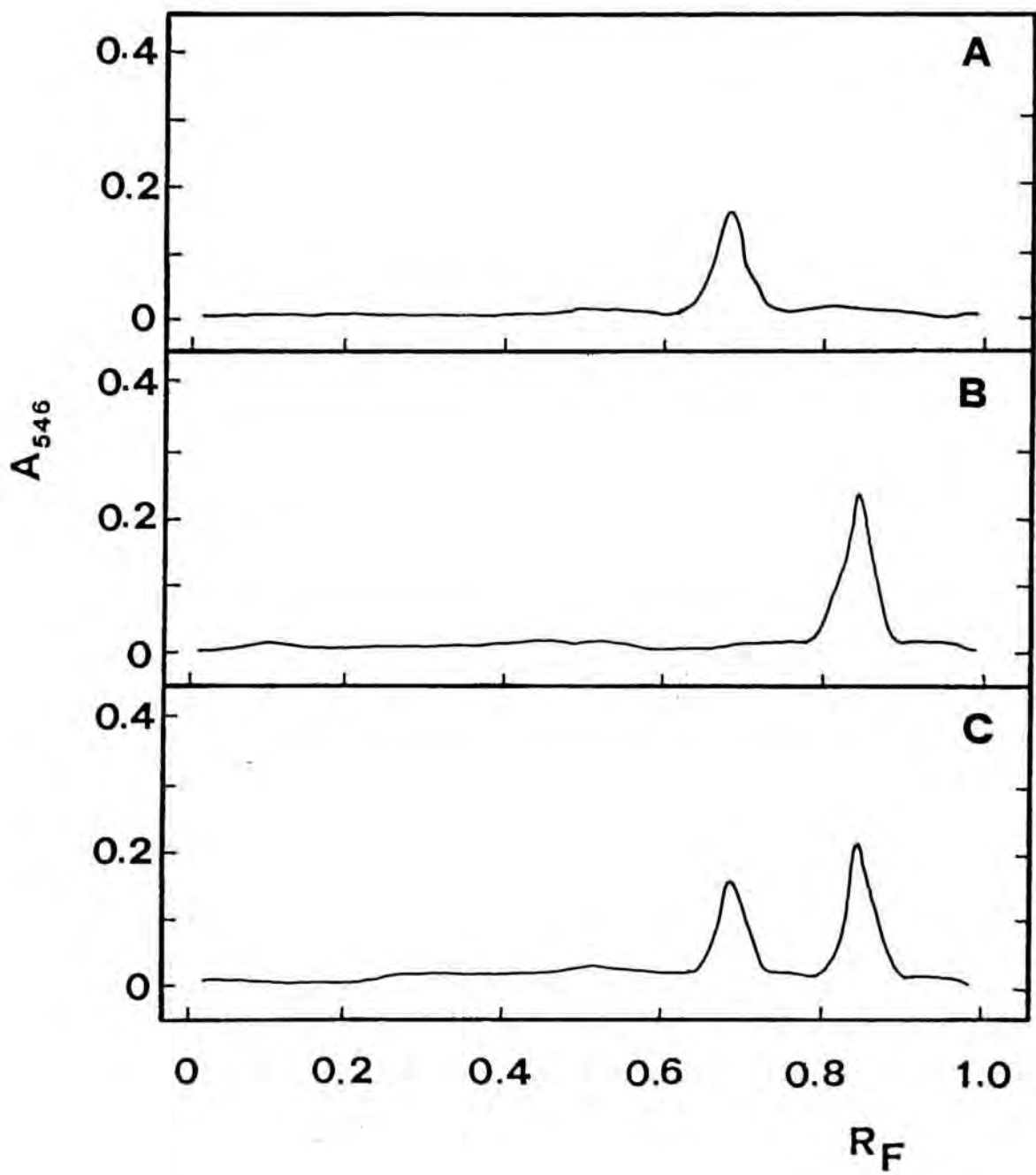
El fosfopéptido CB-la mostraba una menor movilidad ($R = 0,69$). El péptido CB-lb mostraba un R de $0,81$. El peso molecular aparente estimado para estos péptidos fue de 4000 y 3000 daltons, respectivamente. Es de resaltar, no obstante, que la relación entre peso molecular y movilidad electroforética para péptidos de bajo peso molecular dista de ser totalmente lineal. Por ello los valores ofrecidos deben ser considerados como meras aproximaciones.

Cuando una mezcla de ambos fosfopéptidos era sometida a electroforesis en las condiciones descritas era posible separar ambas especies. Sus movilidades electroforéticas eran análogas a las exhibidas por los fosfopéptidos aislados.

De lo expuesto anteriormente se desprende que los puntos isoeléctricos atribuibles a CB-la y CB-lb coinciden con los

FIGURA 21. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS FOSFOPEPTIDOS TRIPTICOS DE CB-1.

Los fosfopéptidos obtenidos por degradación del fragmento CB-1 con tripsina fueron separados por isoelectroenfoque. Una vez aislados fueron sometidos a electroforesis en gradiente de poliacrilamida (15-25%) en presencia de SDS. La figura muestra los perfiles densitométricos correspondientes a CB-1a (A), CB-1b (B) y a una mezcla de ambos (C).



observados para dos de los fosfopéptidos obtenidos por degradación de la subunidad de la glucógeno sintasa. Sin embargo, no es posible asegurar que los péptidos obtenidos en este último caso correspondan de una manera estricta con CB-la y CB-lb. De hecho, el análisis de los fragmentos de degradación triptica de CB-2 demuestra la existencia de fosfopéptidos capaces de enfocar en las proximidades de la zona en que lo hace CB-lb y que, posiblemente, no podrían ser distinguidos de éste.

3.6 INCIDENCIA DE DIFERENTES EFECTORES EN LA ACTIVIDAD Y EL ESTADO DE FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA

Una vez establecidas las condiciones experimentales adecuadas para aislar a la glucógeno sintasa de hepatocitos de rata incubados con [³²P]fosfato, consideramos las posibilidades que estas técnicas ofrecían para estudiar de que manera diferentes efectores podían variar el estado de fosforilación del enzima.

Numerosos estudios realizados en hepatocitos de rata habían demostrado que diferentes hormonas eran capaces de inactivar a la glucógeno sintasa. Se sabía también que, "in vitro", era posible inactivar al enzima mediante la incubación del mismo con diferentes proteína quinasas. Por lo tanto, resultaba muy sugestivo el investigar si aquellas hormonas capaces de inactivar al enzima podían alterar su

estado de fosforilación. Esta relación, que había sido puesta de manifiesto para un reducido número de efectores en el tejido muscular (músculo esquelético, cardíaco, etc.) y en adipocitos, no había podido ser comprobada aún para el caso del hígado.

Nuestra intención fue, por lo tanto, el averiguar si el binomio inactivación-fosforilación era aplicable a la glucógeno sintasa en el hepatocito. Para ello, ensayamos diferentes efectores glucogenolíticos: el glucagon, capaz de desarrollar una respuesta relacionada con los niveles de AMPc, adrenalina, ciertas hormonas peptídicas relacionadas con los flujos de calcio (vasopresina, angiotensina y oxitocina) o efectores capaces de permeabilizar las células al calcio extracelular (ionóforo A23187). Fueron probados, asimismo, iones inorgánicos capaces de alterar el estado de activación de la glucógeno sintasa, bien inactivándola (vanadato) o activándola (litio). Fueron ensayados, por último, un grupo de compuestos relacionados con el forbol (esteres de forbol y mezereina) capaces de influir en la actividad de la glucógeno sintasa.

3.6.1 GLUCAGON

El glucagon es una hormona capaz de inactivar a la glucógeno sintasa y activar a la glucógeno fosforilasa, desencadenando un proceso glucogenolítico.

La incubación de hepatocitos aislados con glucagon a la concentración de 10^{-8} M durante 5 minutos dió lugar a la inactivación de la glucógeno sintasa (Tabla 2). El análisis del inmunoprecipitado obtenido a partir de células tratadas con la hormona, que habían sido preincubadas durante 45 minutos con fosfato radioactivo, demostró que la incorporación de fosfato en la subunidad del enzima era superior a la detectada en células control tratadas idénticamente. Asignando un valor de 100 a la sintasa aislada de células control, el tratamiento con glucagon duplicaba prácticamente la radioactividad asignada a la subunidad del enzima (191 ± 15).

La determinación de la concentración intracelular de ATP de células control o tratadas con glucagon a la concentración de 10^{-8} M demostró que no se producía una variación significativa en los citados valores ($2,34 \pm 0,13$ y $2,36 \pm 0,17$ μ moles/g de hígado, respectivamente).

El inmunoprecipitado obtenido a partir de células control o tratadas con glucagon fue sometido a degradación con CNBr y se realizó el análisis electroforético de los fragmentos

**TABLA 2. EFECTOS DEL GLUCAGON Y LA ADRENALINA
SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACION Y EL GRADO DE
FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA.**

Los resultados se expresan como la media \pm ESM de un mínimo de 8 experimentos independientes. Los valores de fosforilación vienen referidos a los de células control, tomados como 100.

EFECTOR	G. SINTASA REL. ACTIVIDAD 0,25 mM/10 mM ₆ P	FOSFORILASA (mU/mg)	FOSFORILACION SUBUNIDAD G. S.	FOSFORILACION FRAGMENTOS CNBr		
				CB-2	CB-1	CB-2/CB-1
CONTROL	49,0 ± 1,3	90 ± 4	100	100	100	3,14 ± 0,31
GLUCAGON 10 ⁻⁸ M	37,7 ± 1,9	158 ± 11	191 ± 15	143 ± 11	260 ± 21	1,91 ± 0,14
ADRENALINA 10 ⁻⁵ M	38,4 ± 1,3	244 ± 16	282 ± 27	195 ± 10	355 ± 29	1,75 ± 0,12

producidos. Del análisis de las autorradiografías resultantes se desprende que el glucagon induce la fosforilación de ambos fragmentos de bromuro de cianógeno. La incorporación de fosfato en el fragmento de mayor peso molecular fue relativamente pequeña aunque significativa (143 ± 11 sobre un control de 100). El incremento de fosforilación que sufría el fragmento CB-1 era más notable proporcionalmente, alcanzando un valor de aproximadamente 2,5 veces el del mismo fragmento en células control (260 ± 21). No obstante, debido a la mayor cantidad de radioactividad presente en CB-2 en células control, este fosfopéptido sufría, en valor absoluto, un mayor incremento en la cantidad de fosfato incorporado.

A consecuencia de esta diferente incidencia en la fosforilación de ambos fragmentos, el cociente de radioactividad CB-2/CB-1 se reducía a un valor de $1,91 \pm 0,14$.

3.6.2 ADRENALINA

La adrenalina es un potente inductor de la glucogenolisis muscular. Su efecto en el hígado ha sido también comprobado, si bien las concentraciones requeridas son superiores.

En nuestro caso, la incubación de hepatocitos aislados de rata con adrenalina a la concentración de 10^{-5} M durante 5 minutos produjo una notable inactivación de la glucógeno

sintasa, así como una intensa activación de la glucógeno fosforilasa.

Cuando la incubación con adrenalina se realizaba en células previamente incubadas con fosfato radioactivo podía observarse un importante incremento en la radioactividad asociada a la subunidad de la glucógeno sintasa respecto a la de células control (Figura 22). Una vez cuantificado resultó ser de alrededor de tres veces (282 ± 27) el observado en células control (Tabla 2).

La fosforilación inducida por adrenalina afectaba notablemente a ambos fragmentos de bromuro de cianógeno del enzima. El fragmento CB-2 prácticamente duplicaba su contenido en fosfato (195 ± 10) respecto al control. Sin embargo, resultaba ser CB-1 la región más intensamente afectada, ya que su radioactividad se incrementó más de tres veces (355 ± 29). La relación de radioactividad entre ambos fragmentos se veía reducida a un valor de $1,75 \pm 0,12$, casi la mitad del obtenido en células control.

Han sido realizados, asimismo, algunos experimentos destinados a analizar como afectaba la incubación con adrenalina al patrón de fosfopéptidos obtenidos por degradación trípica de la subunidad de la glucógeno sintasa. Si bien el número de experimentos realizados en este sentido no permiten ofrecer datos definitivos, parece claro que la fosforilación provocada por adrenalina afecta a todos y cada uno de los fosfopéptidos que pueden ser observados en células

FIGURA 22. EFECTOS DE LA ADRENALINA SOBRE LA FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA.

Los inmunoprecipitados obtenidos a partir de células control (1 y 3) o tratadas con adrenalina a la concentración de 10^{-5} M (2 y 4) fueron sometidos directamente a electroforesis (A) o incubados previamente con CNBr (B). En cada caso se obtuvieron los correspondientes autorradiogramas. Las cifras indican los pesos moleculares de proteínas patrón.

96→

68→

45→

29→

24→

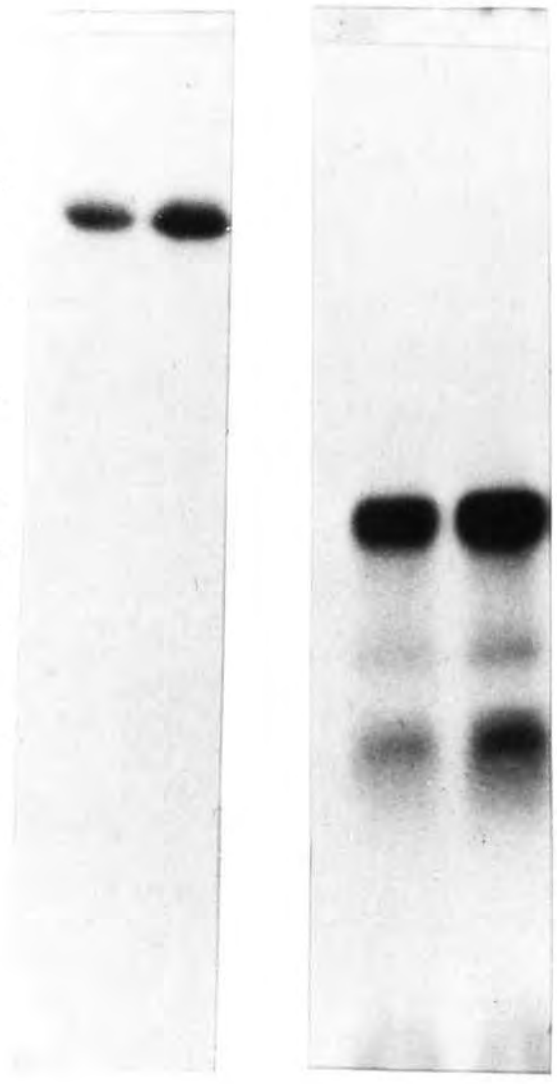
20→

14→

→

1 2

3 4



control. La radioactividad asociada a éstos se incrementaba entre dos y tres veces. No se apreciaba la aparición de ningún nuevo fosfopéptido, si bien es de notar que el péptido que enfoca a pH 4,1, extremadamente minoritario en células control, sufría un importante incremento en su estado de fosforilación, llegando a representar entre el 10 y el 15% de la radioactividad total presente en el gel.

3.6.3 VASOPRESINA, ANGIOTENSINA II Y OXITOCINA

Los efectos de estas tres hormonas polipeptídicas sobre el metabolismo del glucógeno hepático han sido claramente establecidos con anterioridad. Vasopresina y angiotensina son capaces de activar a la glucógeno fosforilasa e inactivar a la glucógeno sintasa a concentraciones notablemente bajas (inferiores a 10^{-8} M). La oxitocina ejerce un efecto similar aunque a concentraciones superiores.

En nuestro caso estas tres hormonas fueron capaces de inactivar a la glucógeno sintasa y activar a la glucógeno fosforilasa. Se emplearon en todos los experimentos a altas concentraciones con el fin de obtener los máximos efectos sobre la actividad el enzima. Así, las células fueron incubadas con vasopresina a la concentración de 10^{-7} M durante un periodo de 8 minutos. La angiotensina II fue empleada a la misma concentración si bien su tiempo de actuación se redujo a 5 minutos, en atención a que en

experimentos previos habíamos comprobado que a este tiempo se obtenía la máxima respuesta. Las condiciones de incubación para el caso de la oxitocina fueron de 8 minutos a una concentración de la hormona de 10^{-6} M.

La incubación de células preincubadas con [³²P]fosfato con cualesquiera de estas tres hormonas daba lugar a un incremento en el estado de fosforilación del enzima. Este incremento era muy notable en todos los casos. Así, en células incubadas con vasopresina y asignando a las células control un valor de 100, se obtuvieron valores que llegaban a triplicar el del control (320 ± 34). Cuando la incubación se realizó con angiotensina se obtuvieron valores de 270 ± 19 y, al emplear oxitocina, el grado de fosforilación de la subunidad alcanzó el valor de 272 ± 19 (Tabla 3).

El análisis de los fragmentos CB-2 y CB-1 nos permitió averiguar que el incremento en la fosforilación de la glucógeno sintasa provocado por estos efectores afectaba tanto a CB-2 como a CB-1.

La incorporación de fosfato en el fragmento CB-2 era importante y llegaba a duplicar los valores obtenidos a partir de células control. En el caso de la vasopresina el valor obtenido era de 221 ± 20 con respecto a un control de 100, mientras que la angiotensina y la oxitocina elevaban el grado de fosforilación de esta región del enzima a 209 ± 25 y 224 ± 22 , respectivamente.

TABLA 3. EFECTOS DE LA VASOPRESINA, ANGIOTENSINA II Y OXITOCINA SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACION Y EL GRADO DE FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA.

Los resultados se expresan como la media \pm ESM de, al menos, 7 experimentos independientes. Los datos de fosforilación vienen referidos a los de células control, tomados como 100.

EFECTOR	G. SINTASA REL. ACTIVIDAD 0,25 mM/10 mM G6P	FOSFORILASA (mU/mg)	FOSFORILACION SUBUNIDAD G. S.	FOSFORILACION FRAGMENTOS CNBr		
				CB-2	CB-1	CB-2/CB-1
CONTROL	49,0 ± 1,3	90 ± 4	100	100	100	3,14 ± 0,31
VASOPRESINA 10 ⁻⁷ M	40,1 ± 2,2	154 ± 16	320 ± 34	221 ± 20	361 ± 33	1,85 ± 0,13
ANGIOTENSINA 10 ⁻⁷ M	40,4 ± 2,5	232 ± 13	270 ± 19	209 ± 25	372 ± 44	1,79 ± 0,18
OXITOCINA 10 ⁻⁷ M	36,8 ± 2,5	167 ± 15	272 ± 19	224 ± 22	347 ± 50	1,88 ± 0,40

Sin embargo, el efecto de estas tres hormonas era todavía más marcado cuando se analizaba el contenido en fosfato del fragmento CB-1. Los valores obtenidos eran notablemente similares entre sí. En el caso de la vasopresina se obtuvieron valores de 361 ± 33 . Los obtenidos para angiotensina y vasopresina fueron de 372 ± 44 y 347 ± 50 , respectivamente.

Como consecuencia de ello los cocientes CB-2/CB-1 eran, una vez más, inferiores a los obtenidos en células control, como puede comprobarse en la Tabla 3.

A tenor de los datos señalados hasta el momento, puede obtenerse la impresión de que los efectos de estas tres hormonas sobre la fosforilación de la glucógeno sintasa son notablemente similares. Es por ello que, en busca de alguna característica distintiva, se llevaron a cabo experimentos de tripsinización de la glucógeno sintasa y análisis de los péptidos resultantes.

Mediante el análisis de las autorradiografías obtenidas pudimos observar que las tres hormonas afectaban a todos y cada uno de los fosfopéptidos que aparecían en células control. El péptido de pI 4,1 resultaba más eficazmente fosforilado en células tratadas con vasopresina u oxitocina que cuando la incubación se realizaba con angiotensina II (aproximadamente dos veces más). El fosfopéptido de pI 3,9 resultaba relativamente poco afectado, salvo en el caso de la oxitocina en que su radioactividad como mínimo se duplicaba.

FIGURA 23. ANALISIS TRIPTICO DE LA SUBUNIDAD DE LA GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS INCUBADOS CON VASOPRESINA, ANGIOTENSINA II Y OXITOCINA.

La autorradiografía muestra el patrón de fosfopéptidos tripticos de la glucógeno sintasa de 1) células control, 2) tratadas con vasopresina 10^{-7} M, 3) angiotensina 10^{-7} M y 4) oxitocina 10^{-6} M. A la izquierda se muestran los pI aparentes de los fosfopéptidos.

-

pI

4.1 →

3.9 →

3.4 →

3.2 →

3.1 →

2.9 →

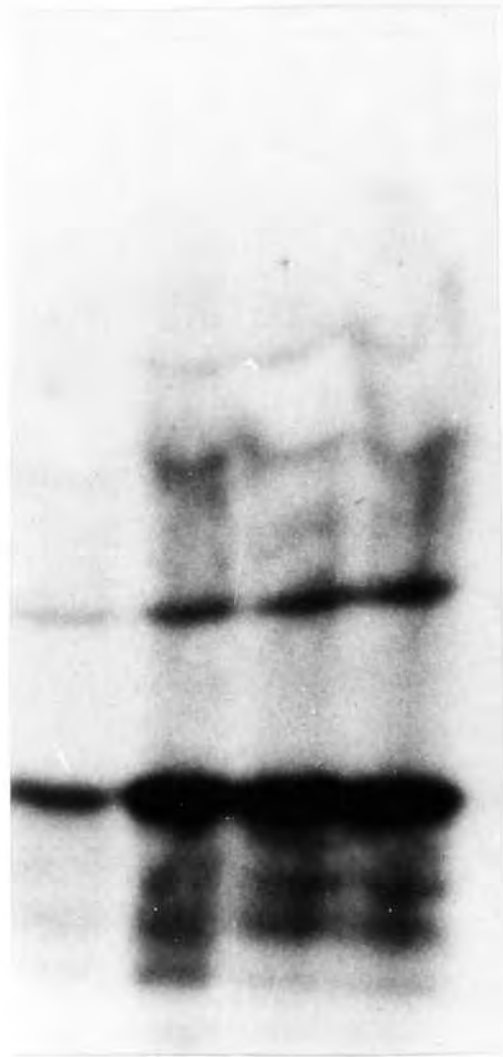
+

1

2

3

4



La acción de las hormonas citadas sobre el péptido de pI 3,4 era notablemente igual y suponía un incremento en su radioactividad entre tres y cuatro veces. En cuanto a los fosfopéptidos más ácidos, éstos eran fosforilados activamente por las tres hormonas sin que, debido a su proximidad, pudieran cuantificarse separadamente. Sin embargo era esta zona de pH la que resultaba más interesante. En efecto, pudimos comprobar que en células tratadas con vasopresina podía detectarse la aparición de una nueva banda de radioactividad que enfocaba a un pH entre 2,8 y 2,9. Esta banda no era visible en células control y prácticamente resultaba inexistente en células tratadas con angiotensina u oxitocina. La radioactividad asociada a esta nueva banda, si bien no tan importante como la correspondiente a los péptidos de pI 3,2 y 3,1, era notablemente significativa (Figura 23).

Con objeto de averiguar si esta banda podía corresponder a fosfato radioactivo libre, se sometieron a isoelectroenfoque de forma paralela una muestra de fragmentos trípticos de glucógeno sintasa procedente de células tratadas con vasopresina y una muestra que contenía una pequeña cantidad de ortofosfato radioactivo. La zona de aparición de radioactividad en el gel en este segundo caso resultó ser diferente a la de la banda radioactiva citada. De esta manera se consideró que esta banda podía corresponder a un nuevo fosfopéptido extremadamente ácido y que no era producido por la incubación de las células con angiotensina II u oxitocina, pero sí cuando se trataban con vasopresina.

La posible implicación que este hecho puede tener en lo que hace referencia a los mecanismos de acción de angiotensina y vasopresina será comentada en el capítulo de Discusión.

3.6.4 IONOFORO A23187

Este compuesto es capaz de permeabilizar las células hepáticas y permitir el paso al interior de las mismas del calcio extracelular. Su capacidad para activar a la fosforilasa e inactivar a la sintasa era conocida y presumiblemente tiene lugar debido a que pone en marcha los mecanismos intracelulares dependientes de calcio.

En nuestro caso el ionóforo fue capaz de inactivar a la glucógeno sintasa en notable grado cuando las células se incubaban con el citado compuesto durante cinco minutos a la concentración de 5×10^{-6} M. Asimismo, pudimos observar que esta inactivación venía acompañada de un incremento en el estado de fosforilación del enzima (Tabla 4). La fosforilación afectaba a ambos fosfopéptidos de bromuro de cianógeno, doblándose la cantidad de fosfato radioactivo en el caso de CB-2 y casi triplicándose en el fragmento CB-1.

Dado el característico patrón tríptico de las hormonas dependientes de calcio, en particular de la vasopresina, realizamos el mismo análisis para el enzima obtenido de

TABLA 4. EFECTOS DEL IONOFORO A23187 SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACION Y EL GRADO DE FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA

Las células control fueron incubadas con DMSO (1% v/v). La concentración del ionóforo en el medio de incubación era de 5 μ M. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de, al menos, 4 experimentos independientes. Los valores de fosforilación están referidos a los de células control tomados como 100.

EFECTOR	G. SINTASA REL. ACTIVIDAD 0,25 mM/10 mM G6P	FOSFORILASA (mU/mg)	FOSFORILACION SUBUNIDAD G. S.	FOSFORILACION FRAGMENTOS CNBr	
				CB-2	CB-1 CB-2/CB-1
DMSO	50,2 ± 2,6	90 ± 4	100	100	3,48 ± 0,43
A23187	38,5 ± 3,4	313 ± 8	240 ± 28	225 ± 39	284 ± 35 2,30 ± 0,20

células tratadas con el ionóforo (Figura 24). En este caso pudimos comprobar la semejanza del patrón obtenido con el producido por la vasopresina. Esta semejanza se manifestaba sobre todo en la aparición del péptido de pI 2,9, característico de la hormona citada.

3.6.5 VANADATO Y LITIO

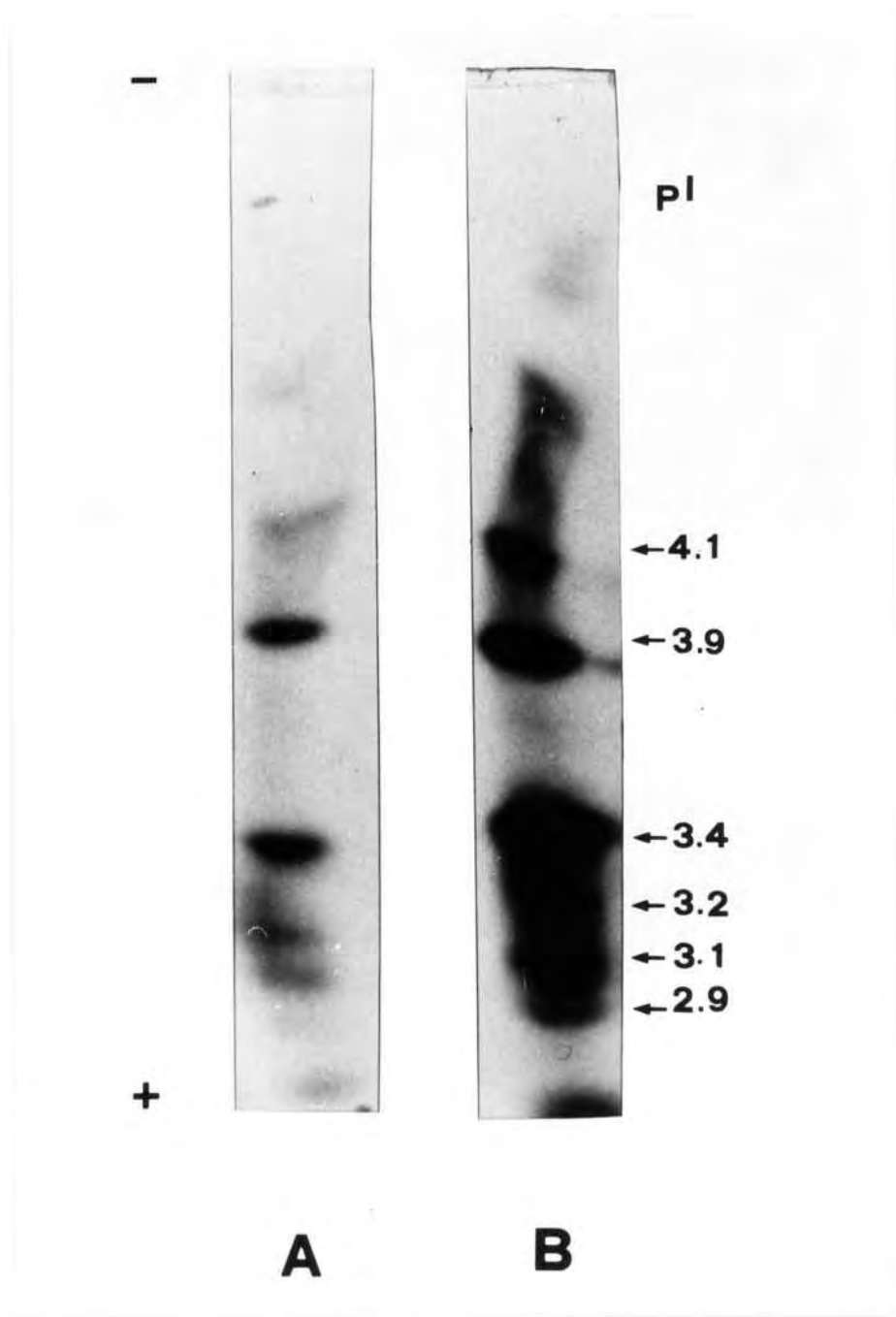
3.6.5.1 Vanadato

El vanadato ejerce una serie de efectos en la célula que, en ciertos tejidos, han resultado ser similares a los producidos por la insulina. Sin embargo, evidencias obtenidas en nuestro propio laboratorio han demostrado que este ion es capaz de inactivar a la glucógeno sintasa y activar a la glucógeno fosforilasa de hepatocitos aislados de rata y, por lo tanto, dar lugar a una respuesta opuesta a la de la hormona. Estos efectos son significativos a concentraciones del orden de 0,1 mM.

En efecto, la incubación de hepatocitos con vanadato (VO Na) la concentración de 2 mM durante cinco minutos dió lugar a una inactivación de la glucógeno sintasa. Esta inactivación venía acompañada de un incremento en el estado de fosforilación del enzima de, aproximadamente, el doble del observado en células control (217 ± 21) (Tabla 5).

FIGURA 24. ANALISIS TRIPTICO DE LA SUBUNIDAD DE LA GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS INCUBADOS CON EL IONOFORO A23187.

El autorradiograma muestra los fosfopéptidos producidos por degradación triptica de la glucógeno sintasa de: (A) células control (incubadas con DMSO) y (B) células incubadas con el ionóforo a la concentración de 5 μ M.



Cuando los inmunoprecipitados eran degradados mediante bromuro de cianógeno y analizados por electroforesis, podía observarse que la incorporación de fosfato se realizaba preferentemente en el fragmento CB-1 (237 ± 26 respecto a un control tomado como 100), si bien la incorporación de fosfato radioactivo en CB-2 era también significativa (159 ± 12). El análisis tríptico del fragmento CB-1 demostró que la incorporación de fosfato tenía lugar tanto en CB-1a como en CB-1b y ello sucedía con una intensidad similar.

3.6.5.2 Litio

Había sido descrito que el litio es capaz de activar a la glucógeno sintasa de adipocitos y hepatocitos de rata, comportándose en este sentido de manera análoga a la de la insulina. Sin embargo, a diferencia de la hormona, produce un efecto activador de la glucógeno fosforilasa en hepatocitos de rata.

Con el fin de reproducir estos resultados, procedimos a la incubación de células hepáticas aisladas de rata en presencia de cloruro de litio a la concentración de 20 mM y durante un período de 15 minutos. Estas condiciones habían sido descritas como más que suficientes para provocar los efectos citados sobre la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa.

En nuestras condiciones de trabajo pudimos comprobar que, en efecto, el litio era capaz de producir un notable

TABLA 5. EFECTOS DEL VANADATO Y DEL LITIO
SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACION Y EL GRADO DE
FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA.

Los resultados corresponden a la media \pm ESM
de un mínimo de 5 experimentos independientes.
Los datos de fosforilación se expresan
referidos a células control.

EFECTOR	G. SINTASA REL. ACTIVIDAD 0,25 mM/10 mM G6P	FOSFORILASA (mU/mg)	FOSFORILACION SUBUNIDAD G. S.	FOSFORILACION FRAGMENTOS CNBr		
				CB-2	CB-1	CB-2/CB-1
CONTROL	49,0 ± 1,3	90 ± 4	100	100	100	3,14 ± 0,31
VANADATO 2 mM	40,8 ± 0,6	286 ± 29	217 ± 21	159 ± 12	237 ± 26	1,56 ± 0,21
LITIO 20 mM	75,0 ± 2,3	141 ± 12	78 ± 2	75 ± 16	74 ± 4	3,18 ± 0,20

incremento del estado de activación de la glucógeno sintasa, activando ligeramente a la fosforilasa.

Este incremento en la actividad glucógeno sintasa estaba asociado a una disminución de la cantidad de fosfato unido covalentemente al enzima, como se pudo comprobar incubando con litio en las condiciones citadas células hepáticas marcadas con fosfato radioactivo. Esta disminución de la radioactividad ligada al enzima era pequeña y el valor obtenido fue de 78 ± 2 con respecto a un promedio de valores obtenidos a partir de células control y considerados como 100.

Se decidió entonces investigar de que manera la defosforilación observada afectaba a los fosfopéptidos CB-2 y CB-1. Para ello se llevó a cabo la digestión del enzima inmunoprecipitado con bromuro de cianógeno y se analizaron los fragmentos resultantes. De este análisis pudo obtenerse la evidencia de que ambos fragmentos eran defosforilados bajo la influencia del litio en una cuantía similar. Los valores obtenidos fueron de 75 ± 16 para CB-2 y de 74 ± 4 para el fragmento CB-1 (Tabla 5).

3.6.6 ESTERES DE FORBOL Y MEZEREINA

Como se ha comentado en la Introducción del presente trabajo, los esteres de forbol son unos compuestos capaces de producir múltiples efectos en las células. En lo que concierne al metabolismo del glucógeno las características de estos efectos están sujetas a controversia, en el sentido de que algunos autores sugieren que los esteres de forbol pueden remedar los efectos de la insulina sobre el metabolismo del polisacárido, mientras que otros les atribuyen efectos glucogenolíticos.

En consecuencia, en primer lugar decidimos averiguar de que manera incidían estos compuestos en la actividad glucógeno sintasa hepática, estudio que hasta el momento tan sólo había sido llevado a cabo en un laboratorio, si bien incubando a la vez los hepatocitos con glucosa.

Para ello incubamos hepatocitos con diferentes esteres de forbol o con el propio forbol. Las células control fueron incubadas paralelamente con DMSO a la concentración final del 1% (v/v), puesto que este disolvente era el vehículo utilizado para los efectores.

La elección de los esteres de forbol empleados se fundamentó en su capacidad para activar "in vitro" a la proteína quinasa C y para desencadenar efectos biológicos. Así, se empleó el 12-0-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) y

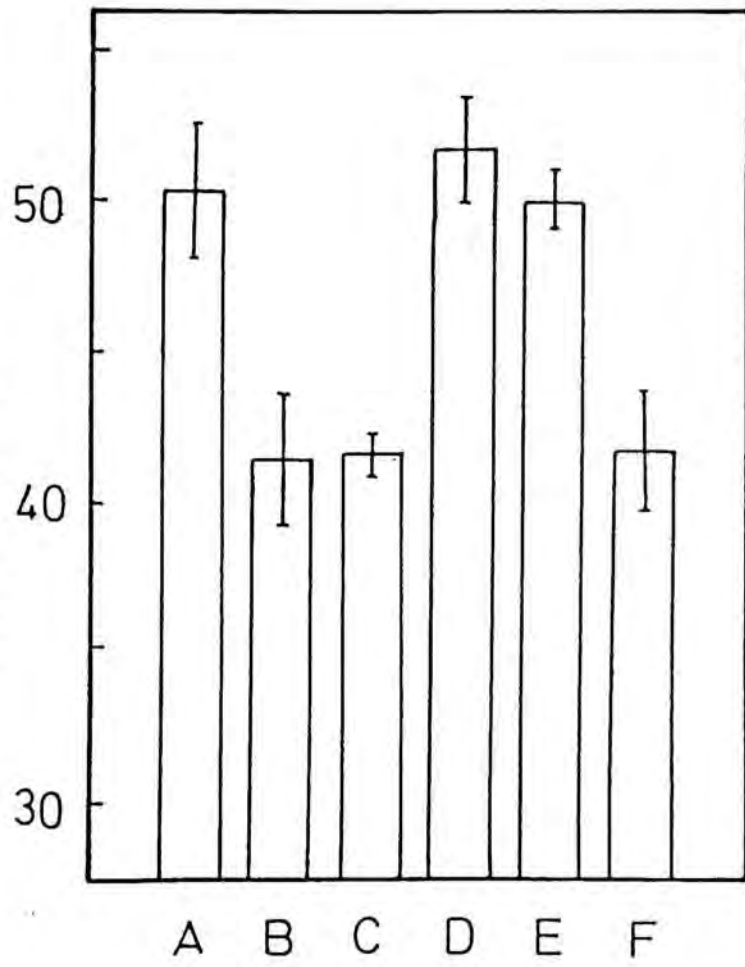
el 4 β -forboldidecanoato (4 β -PDD) dentro del grupo de efectores que son activos en las células y tienen efecto sobre la actividad proteínica quinasa C. Otros esteroides de forbol, bien debido al tipo de ácidos que esterifican los grupos alcohol de las posiciones 12 y 13 o bien debido a la configuración del carbono en 4 (α o β), no presentan actividad biológica ni activan a la proteína quinasa C. Un ejemplo de los mismos lo constituye el 4 α -forboldidecanoato (4 α -PDD), que también fue empleado en nuestros experimentos. Por último realizamos incubaciones de las células con forbol, el cual tampoco muestra actividad en base a los criterios expuestos.

La Figura 25 muestra el resultado de incubar suspensiones de hepatocitos con los diferentes agentes citados. Los esteroides de forbol fueron empleados a la concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de suspensión celular, mientras que el forbol se utilizó a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. El tiempo de incubación con los efectores fue, en todos los casos, de 10 minutos. Como puede verse, tanto el TPA como el 4 β -PDD fueron capaces de inactivar a la glucógeno sintasa de manera sustancial. Por el contrario, tanto el compuesto parental, forbol, como el 4 α -PDD no produjeron cambios significativos en el estado de activación del enzima. Pudo comprobarse, asimismo, que la incubación de las células con el disolvente DMSO a la concentración final del 1% (v/v) no producía cambios en el estado de activación del enzima, con respecto a células que eran incubadas en ausencia del disolvente. Sin embargo, la adición de DMSO a las células

FIGURA 25. EFECTO DEL FORBOL, ESTERES DE FORBOL Y MEZEREINA SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACION DE LA GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS.

Los hepatocitos fueron incubados con DMSO (A), TPA (B), 4 β -PDD (C), 4 α -PDD (D), forbol (E) y mezereína (F). Todos los efectores se emplearon a la concentración de 100 ng/ml, excepto el forbol (1 μ g/ml). Los resultados se expresan como la media \pm ESM de un mínimo de 4 experimentos independientes.

RELACION DE ACTIVIDADES
0,25/10 mM G-6P



control no fue omitida en ningún caso.

La mezereína es un compuesto relacionado con los esteres de forbol y capaz de activar a la proteína quinasa C, pero que no incluye en su molécula la estructura del diacilglicerol. Por lo tanto, consideramos interesante averiguar si este compuesto podía mimetizar los efectos de los esteres de forbol activos en lo que hacía referencia a la inactivación de la glucógeno sintasa. Con este fin, incubamos durante 10 minutos suspensiones celulares con mezereína (empleando como disolvente DMSO) a la concentración de 0,1 µg/ml y determinamos el estado de activación de la glucógeno sintasa en los extractos celulares. Como muestra la Figura 25, la mezereína fue capaz de provocar la inactivación del enzima en un grado comparable al que lo hacían los esteres de forbol activos.

Estas evidencias nos llevaron a investigar si los esteres de forbol y la mezereína eran capaces de provocar la fosforilación de la glucógeno sintasa a la vez que su inactivación. Para ello incubamos con los citados efectores suspensiones celulares preincubadas con [³²P]fosfato durante 45 minutos y analizamos electroforéticamente el inmunoprecipitado obtenido.

Como muestran la Figura 26 y la Tabla 6, tanto el TPA como el 4β-PDD y la mezereína fueron capaces de incrementar la cantidad de fosfato radioactivo unido a la subunidad de

**FIGURA 26. FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO
SINTASA POR ESTERES DE FORBOL Y MEZEREINA.**

Los hepatocitos fueron incubados con DMSO (1% v/v) (A), TPA (B), 4 β -PDD (C), mezereína (D) y forbol (E). Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis y se obtuvo el correspondiente autorradiograma. Todos los efectores se emplearon a la concentración de 100 ng/ml, excepto el forbol (1 μ g/ml). A la derecha se indica la posición en el gel de proteínas patrón de peso molecular conocido.

88 Kd



Kd
-96
-68
-45
-36
-29
-20
-14

A B C D E

TABLA 6. EFECTOS DEL FORBOL, ESTERES DE FORBOL Y MEZEREINA SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACION Y EL GRADO DE FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA.

Los resultados se expresan como la media \pm ESM de al menos 4 experimentos independientes. Los datos de fosforilación están referidos a los correspondientes a células control.

EFECTOR	G. SINTASA REL. ACTIVIDAD 0,25 mM/10 mM G6P	FOSFORILACION SUBUNIDAD G. S.	FOSFORILACION FRAGMENTOS CNBr		
			CB-2	CB-1	CB-2/CB-1
DMSO	50,2 ± 2,6	100	100	100	3,48 ± 0,43
TPA	41,3 ± 2,3	179 ± 16	145 ± 21	263 ± 33	1,87 ± 0,19
4β - PDD	41,5 ± 0,7	181 ± 15	132 ± 25	240 ± 40	1,89 ± 0,14
4α - PDD	52,2 ± 1,7	92 ± 5	85 ± 7	95 ± 8	3,35 ± 0,18
FORBOL	49,6 ± 1,4	99 ± 11	90 ± 10	105 ± 5	3,33 ± 0,25
MEZEREINA	41,8 ± 2,1	194 ± 12	142 ± 20	280 ± 20	1,64 ± 0,15

glucógeno sintasa y este aumento era cuantitativamente similar. En cambio, la incubación de los hepatocitos con forbol no daba lugar a la fosforilación del enzima. Por lo tanto, los resultados de estos experimentos permitían asociar la inactivación de la glucógeno sintasa producida por estos compuestos con el incremento en el grado de fosforilación del enzima.

Cuando la glucógeno sintasa era fragmentada por CNBr pudimos comprobar (Tabla 6) que la incubación con TPA, 4β -PDD o mezereína producía un incremento en la cantidad de radioactividad asociada a ambos fragmentos de bromuro de cianógeno. Sin embargo, el incremento en la fosforilación del fragmento CB-2 era relativamente escaso, mientras que CB-1 veía aumentado su grado de fosforilación de manera notable.

Como se ha comentado anteriormente, tanto los esteres de forbol como la mezereína son capaces de activar a la proteína quinasa C. Ahora bien, las evidencias existentes hasta el momento indicaban que la incubación "in vitro" de la glucógeno sintasa hepática con la citada quinasa provocaba la fosforilación del fragmento CB-1 únicamente. Esta evidencia, junto con la impresión general de que tan sólo a bajas concentraciones de estos efectores es posible responsabilizar de manera directa a la proteína quinasa C de los efectos producidos, nos llevaron a estudiar la fosforilación e inactivación del enzima a un rango menor de concentraciones de los mismos.

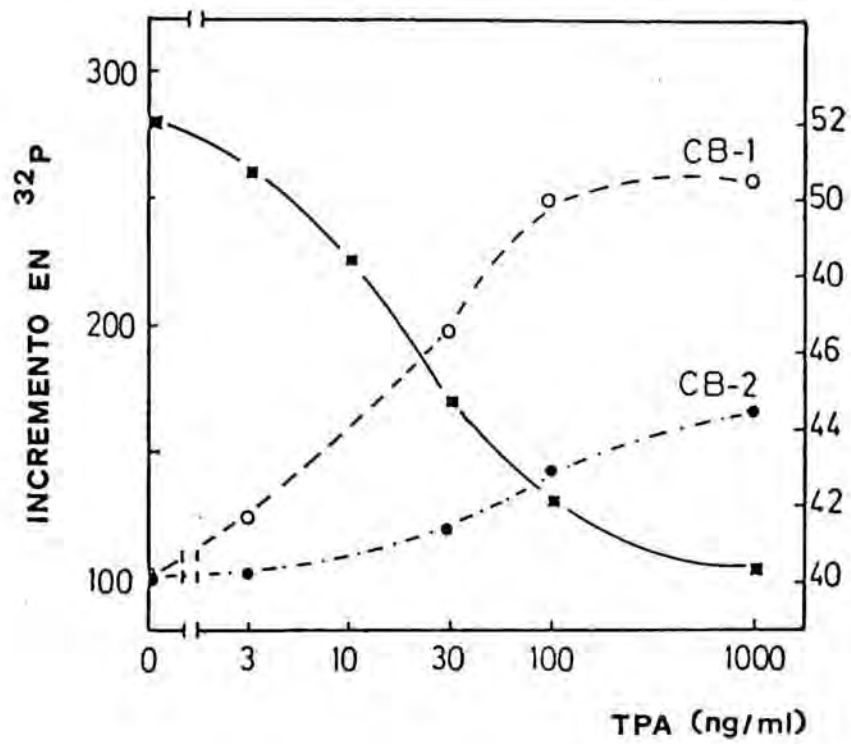
A tal efecto, incubamos suspensiones celulares durante 10 minutos con TPA en un rango de concentraciones desde 3 a 1000 ng/ml. Los resultados obtenidos están reflejados en la Figura 27. Como puede verse, concentraciones de TPA del orden de 10 o 30 ng /ml fueron capaces de producir una significativa inactivación de la glucógeno sintasa.

Cuando se estudió el nivel de fosforilación alcanzado por los fragmentos CB-2 y CB-1 con respecto a células control pudo observarse que, a bajas concentraciones del efector, el grado de fosforilación del fosfopéptido CB-1 era ya notable y se correlacionaba perfectamente con la curva de inactivación del enzima. Por el contrario, a concentraciones en las que el enzima mostraba un importante cambio en su estado de activación, la cantidad de radioactividad incorporada en el fragmento CB-2 prácticamente no difería de la presente en células control. Tan sólo a las mayores concentraciones de TPA empleadas el incremento de radioactividad en CB-2 era significativo.

El hecho de que la fosforilación de los centros localizados en el fragmento CB-1 parecía influir decisivamente en el cambio de actividad de la glucógeno sintasa, nos llevó a estudiar con más detalle esta porción de la molécula del enzima. Para ello, el fosfopéptido CB-1 se aisló por electroforesis a partir del enzima procedente de células control o tratadas con TPA a la concentración de 0,1 µg/ml durante 10 minutos. El fragmento aislado fue sometido a digestión triptica y los productos de degradación se

FIGURA 27. EFECTO DEL TPA SOBRE LA FOSFORILACION DE CB-2 Y CB-1.

Los hepatocitos se incubaron con diferentes concentraciones de TPA. Se determinó el estado de activación de la glucógeno sintasa (■—■) y la incorporación de fosfato radioactivo en los fosfopéptidos CB-2 (●—●) y CB-1 (○—○).



RELACION DE ACTIVIDADES
0,25/10 mM G-6P

analizaron por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida.

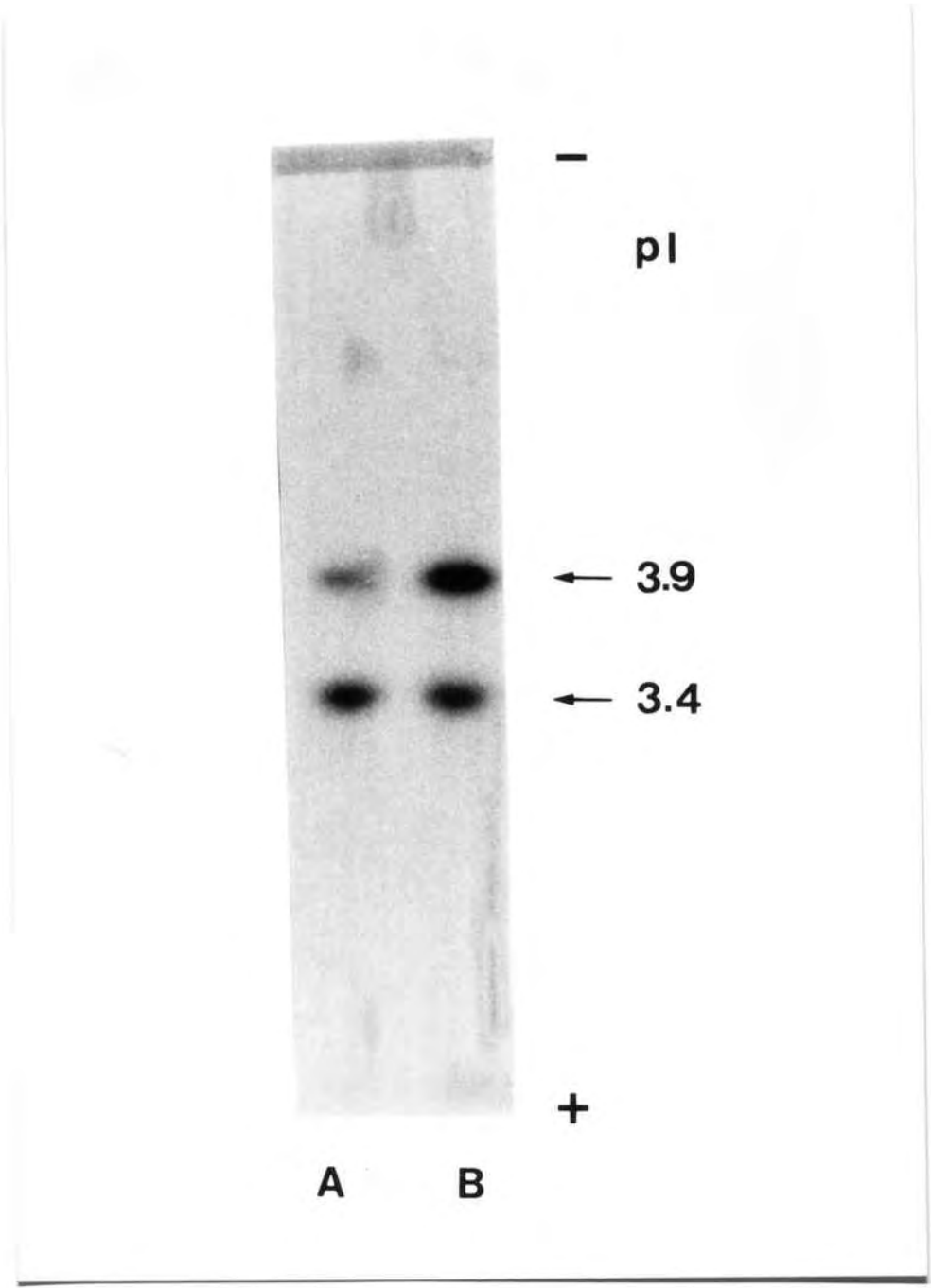
La Figura 28 muestra el patrón electroforético obtenido. Como puede observarse, el fragmento CB-1 contiene como mínimo dos péptidos trípticos que incorporan fosfato radioactivo. Uno de ellos muestra un punto isoeléctrico de 3,9 (CB-1a) mientras que el otro enfoca a pH 3,4 (CB-1b). La comparación entre los productos de degradación de CB-1 procedentes de células control o tratadas con TPA puso claramente de manifiesto que tan sólo uno de los fosfopéptidos incrementaba su estado de fosforilación (CB-1a, 279 ± 61 sobre un control de 100), mientras que el péptido restante no variaba significativamente su grado de fosforilación (111 ± 14).

Por lo tanto, el conjunto de los datos presentados indican que los esteres de forbol, así como la mezereína pueden incidir en el estado de activación de la glucógeno sintasa en hepatocitos de rata, produciendo la inactivación del enzima. Este efecto se realiza a través de un incremento en el estado de fosforilación de la glucógeno sintasa. La fosforilación producida por estos efectores parece ser notablemente específica y, en determinadas condiciones, puede afectar a un determinado centro de la molécula enzimática localizado en el fragmento CB-1.

Paralelamente se ha investigado el efecto de los esteres de forbol y la mezereína sobre la actividad glucógeno

FIGURA 28. EFECTO DEL TPA SOBRE LA FOSFORILACION DE CB-1a Y CB-1b.

Se sometió a digestión triptica el fosfopéptido CB-1 obtenido a partir de células control (A) o tratadas con TPA 100 ng/ml (B) y los productos fueron resueltos por isoelectroenfoque. A la derecha se indican los pI de los fosfopéptidos.



fosforilasa en hepatocitos de rata. Nuestros estudios han indicado que tanto los esteres de forbol como la mezereína afectaban muy escasamente dicha actividad. De hecho, la actividad fosforilasa no se modificaba apreciablemente en aquellas condiciones en las que la glucógeno sintasa era inactivada. Tan sólo en condiciones extremas, como puede ser el empleo del TPA a la concentración de 1 µg/ml, podía apreciarse un ligero aunque significativo descenso de la actividad glucógeno fosforilasa (Figura 29).

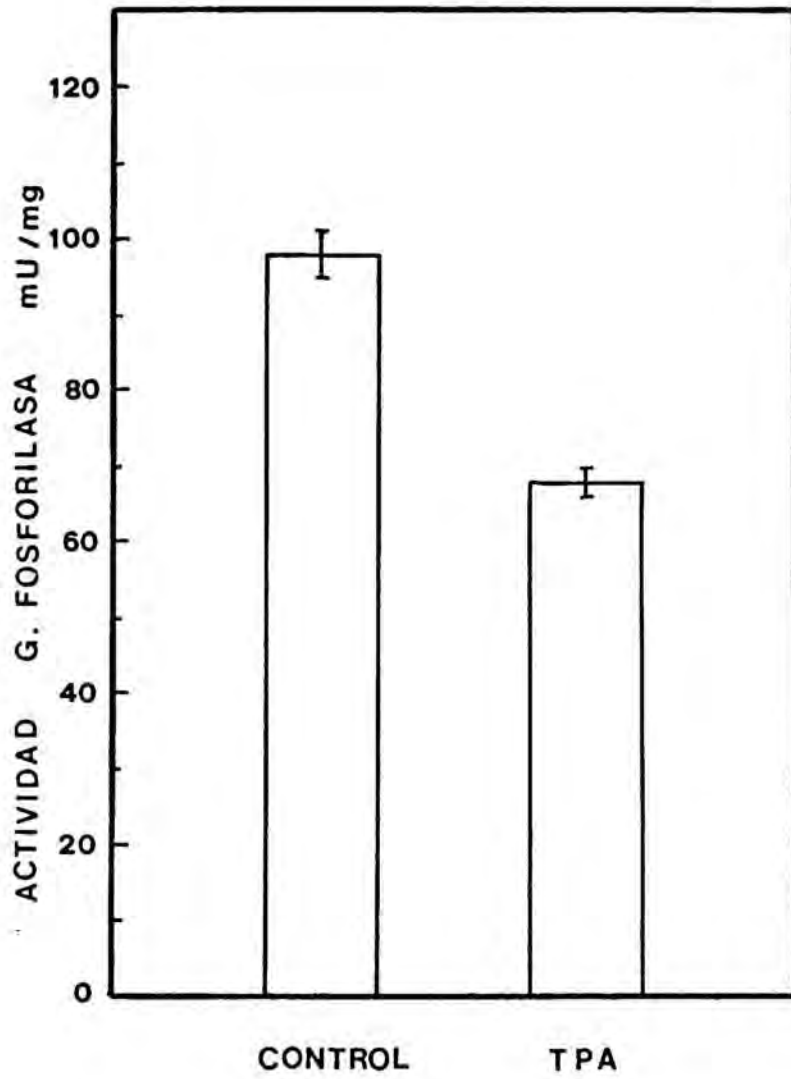
3.7 ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS

Con el fin de identificar el tipo de aminoácidos de la molécula de glucógeno sintasa que podían sufrir un recambio apreciable de fosfato durante el período de incubación celular con [³²P]fosfato, se realizaron una serie de experimentos en los que la molécula del enzima fue hidrolizada parcialmente. El hidrolizado resultante fue resuelto mediante electroforesis en capa fina de celulosa y los fosfoaminoácidos marcados radioactivamente identificados por autorradiografía.

De la misma manera se estudió el tipo de fosfoaminoácidos que se generaban por incubación del enzima purificado a partir de hígado de rata con diferentes proteína quinasa y [³²γ-P]ATP.

**FIGURA 29. EFECTO DEL TPA SOBRE LA ACTIVIDAD
GLUCOGENO FOSFORILASA EN HEPATOCITOS.**

Se determinó la actividad glucógeno fosforilasa "a" en extractos de hepatocitos incubados con DMSO o TPA (1 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados se expresan como la media \pm ESM de un mínimo de 6 experimentos independientes.



3.7.1 ANÁLISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE LA GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS

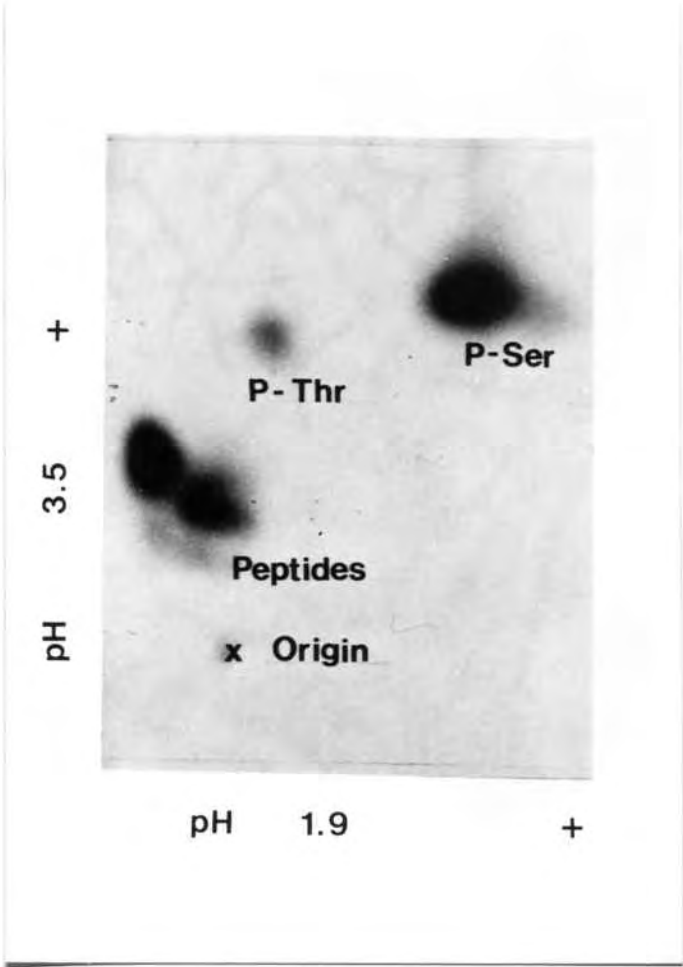
La hidrólisis del enzima se llevó a cabo sobre el fragmento de gel de poliacrilamida que contenía la subunidad del enzima previamente aislado por inmunoprecipitación. De esta manera se obtenía la seguridad de que los fosfoaminoácidos detectados correspondían exclusivamente a la glucógeno sintasa.

Se realizó en primer lugar una hidrólisis ácida a 110° C durante dos horas. En estas condiciones la fosfoserina y la fosfotreonina son notablemente estables, aunque la fosfotirosina se hidroliza en buena parte. El hidrolizado, tras ser purificado parcialmente empleando una resina de intercambio iónico, fue sometido a electroforesis bidimensional de alto voltaje sobre soporte de celulosa, tal como se describe en 2.10.3.

El análisis de las autorradiografías obtenidas (Figura 30) indicaba claramente que, además de los esperados residuos de fosfoserina, la glucógeno sintasa aislada de hepatocitos de rata contiene cantidades significativas de fosfotreonina. La fosfotreonina encontrada equivale como promedio al 7% del total de fosfoaminoácidos (fosfoserina más fosfotreonina). En ningún caso fue detectada la presencia de radioactividad en la zona correspondiente al patrón de fosfotirosina incluido en la electroforesis.

**FIGURA 30. ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE LA
GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS.**

Autorradiograma correspondiente a una electroforesis bidimensional en capa fina de celulosa del inmunoprecipitado de glucógeno sintasa tras hidrólisis ácida. Las manchas radioactivas se identificaron empleando patrones de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina.



Con el fin de reinvestigar la presencia de fosfotirosina en la molécula de glucógeno sintasa, fragmentos de geles conteniendo la subunidad del enzima fueron sometidos a hidrólisis alcalina, empleando hidróxido potásico 5 M durante 35 minutos y a 135° C. En estas condiciones, tanto la fosfoserina como la fosfotreonina son rápidamente destruidas, mientras que la fosfotirosina puede recuperarse en un alto porcentaje. El análisis mediante electroforesis monodimensional del hidrolizado mostraba una total desaparición de la radioactividad en las zonas correspondientes a fosfoserina y fosfotreonina, sin que pudiera detectarse radioactividad asociada a fosfotirosina.

Una vez establecida la presencia de residuos de fosfotreonina en la molécula de glucógeno sintasa se intentó averiguar la localización del citado fosfoaminoácido en la cadena polipeptídica. Con este fin, la molécula del enzima obtenida por inmunoprecipitación a partir de hepatocitos incubados con [³²P]fosfato fue fragmentada mediante tratamiento con bromuro de cianógeno. Los fosfopéptidos resultantes de este tratamiento, CB-2 y CB-1, fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Los fragmentos de gel que contenían los citados fosfopéptidos fueron sometidos a hidrólisis ácida y los fosfoaminoácidos resultantes se separaron por electroforesis monodimensional en capa fina de celulosa.

Las autorradiografías correspondientes a los hidrolizados de ambos fosfopéptidos pueden observarse en la

**FIGURA 31. ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE
LOS FOSFOPEPTIDOS CB-2 Y CB-1.**

Autorradiograma correspondiente a una electroforesis monodimensional en capa fina de celulosa de los fragmentos CB-2 y CB-1 tras hidrólisis ácida. Las flechas indican la migración de patrones de fosfoserina y fosfotreonina.

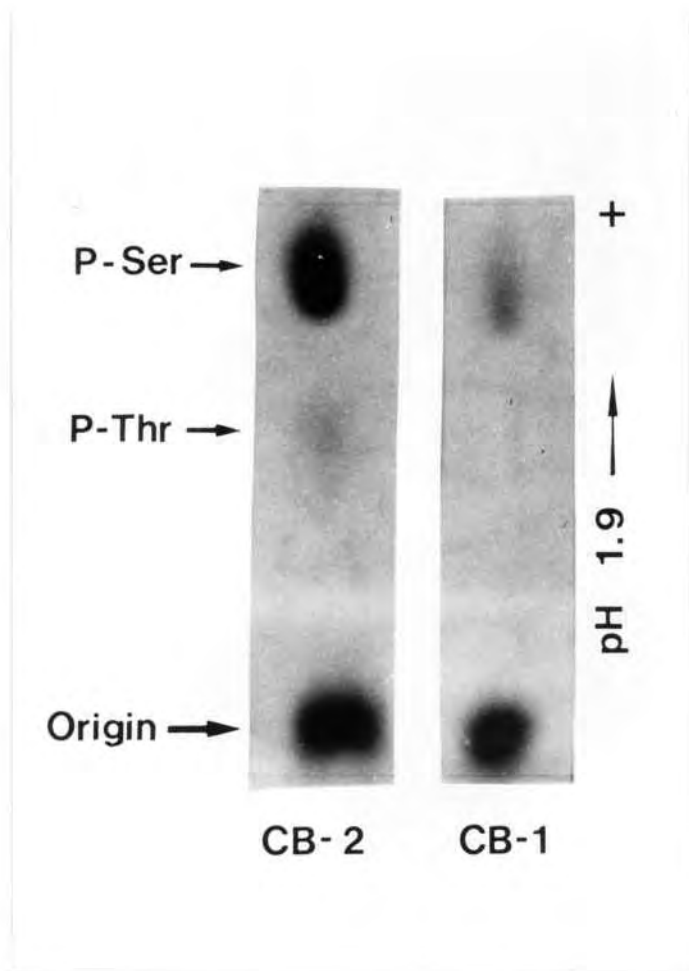


Figura 31. Tal como es posible apreciar, la hidrólisis del fragmento CB-2 daba lugar a la aparición de dos fosfoaminácidos que, según su migración electroforética, correspondían a fosfoserina y fosfotreonina. En cambio, la hidrólisis en las mismas condiciones del fragmento CB-1 tan sólo permitía recuperar residuos de fosfoserina. En consecuencia, los residuos de fosfotreonina identificados en la subunidad de la glucógeno sintasa se encontraban ubicados exclusivamente en la porción de la molécula denominada CB-2.

3.7.2 ANÁLISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE LA GLUCOGENO SINTASA FOSFORILADA "IN VITRO" POR DIVERSAS PROTEINA QUINASAS

Los resultados expuestos establecían la existencia en la glucógeno sintasa de centros de fosforilación que involucraban residuos de treonina e indicaban, de modo aproximado, su localización en la molécula del enzima. Por lo tanto nos propusimos investigar cual, de entre las diferentes glucógeno sintasa quinasas, era capaz de catalizar la reacción de transferencia de fosfato sobre el citado aminoácido.

Teniendo en cuenta que los residuos de fosfotreonina identificados en la glucógeno sintasa se encontraban situados en el fragmento CB-2, se llevaron a cabo reacciones de fosforilación "in vitro" del enzima empleando precisamente aquellas proteína quinasas capaces de fosforilar al enzima en

centros situados en el mencionado fragmento. Con este criterio, fueron utilizadas las siguientes proteína quinasas: caseína quinasas -1 y 2 (CK-1 y CK-2), glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) y la proteína quinasa dependiente de AMPc.

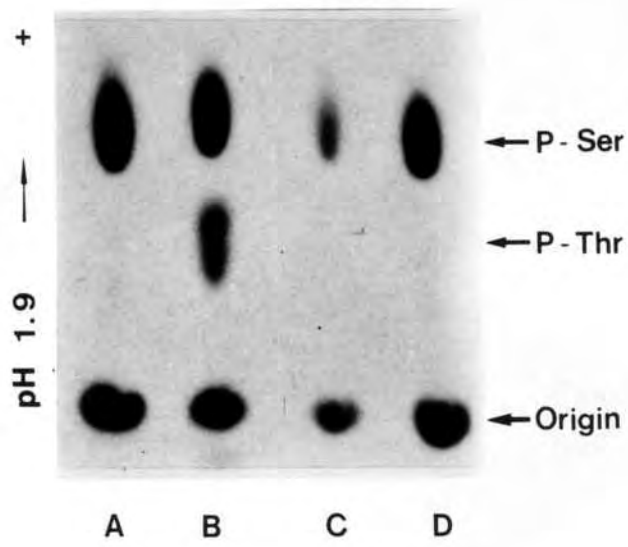
Una vez efectuadas las reacciones de fosforilación, la glucógeno sintasa fue inmunoprecipitada y el inmunoprecipitado sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Tras someter a hidrólisis ácida el fragmento de gel que contenía la subunidad de la glucógeno sintasa el hidrolizado se analizó tal como se ha descrito anteriormente.

La Figura 32 muestra el resultado de este experimento. Como se puede ver, la fosforilación provocada por la CK-1, la GSK-3 y la proteína quinasa dependiente de AMPc implica la transferencia de fosfato sobre residuos de serina. Por el contrario, el análisis del hidrolizado de glucógeno sintasa correspondiente a la fosforilación por CK-2 muestra claramente dos diferentes tipos de fosfoaminoácidos. Uno de ellos, común al resto de quinasas estudiadas y que corresponde a la fosfoserina, y un segundo que muestra una migración electroforética idéntica a la de un patrón de fosfotreonina.

Con el fin de averiguar si los grupos fosfatos introducidos por la CK-2 sobre residuos de treonina en la molécula de la glucógeno sintasa coincidían en su localización con los observados en el enzima

**FIGURA 32. ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE LA
GLUCOGENO SINTASA FOSFORILADA "IN VITRO" POR
DIFERENTES PROTEINA QUINASAS.**

Se llevó a cabo la fosforilación "in vitro" de preparaciones homogéneas de glucógeno sintasa hepática con A) CK-1, B) CK-2, C) Proteína quinasa dependiente de AMPc y D) GSK-3. La glucógeno sintasa fue inmunoprecipitada, aislada por electroforesis y sometida a hidrólisis ácida. Los productos de hidrólisis fueron separados por electroforesis monodimensional. Las flechas indican la migración de fosfoaminoácidos patrón.



inmunoprecipitado a partir de hepatocitos de rata, se procedió de la siguiente manera. La glucógeno sintasa hepática fue fosforilada "in vitro" por la CK-2, inmunoprecipitada y sometida a tratamiento con CNBr. Los fosfopéptidos resultantes, separados por electroforesis, fueron hidrolizados en medio ácido y el producto de la hidrólisis analizado por electroforesis monodimensional en capa fina de celulosa. El análisis de las autorradiografías correspondientes demostró que, al igual que en el enzima procedente de hepatocitos incubados con [³²P]fosfato, la fosforilación de la glucógeno sintasa hepática por CK-2 suponía la incorporación de grupos fosfato en residuos de treonina que se encontraban localizados en el fragmento CB-2 de la molécula.

El conjunto de estos resultados sugiere, por lo tanto, que la fosforilación en treoninas observada en hepatocitos aislados de rata podría ser debida a la actividad de la proteína quinasa independiente de calcio y AMPc denominada caseína quinasa-2.

4. DISCUSSION

La actividad glucógeno sintasa puede ser controlada por diversos efectores, algunos de los cuales parecen tener un indiscutible carácter fisiológico. Por otra parte, el enzima purificado puede ser fosforilado "in vitro" por un amplio grupo de proteína quinasas. Esta fosforilación supone la incorporación de fosfato en diferentes centros de la molécula, lo que, en muchos casos, conduce a la inactivación del enzima.

Estas evidencias se obtuvieron primeramente a partir del estudio de la glucógeno sintasa de músculo esquelético de conejo. Extrapoladas en ocasiones para el caso del enzima de otros tejidos u órganos, han formado la base de una teoría que supone que los efectores capaces de inactivar a la glucógeno sintasa lo hacen provocando la fosforilación del enzima. Esta relación causa-efecto debería transcurrir a través de la activación de una o varias proteína quinasas capaces de fosforilar a la glucógeno sintasa. La teoría supone, a su vez, la existencia de ciertos "mensajeros secundarios" que conectarían la interacción del efector con la célula y la activación de las proteína quinasas.

En los últimos años se han producido numerosos descubrimientos que han consolidado notablemente la teoría expuesta. Por ejemplo, se ha comprobado que el tratamiento con efectores capaces de inactivar a la glucógeno sintasa

provoca la fosforilación del enzima. Esta certidumbre se ha adquirido gracias a estudios en músculo esquelético y cardíaco, principalmente. Asimismo, al ya clásico AMPc han venido a sumarse otros posibles mensajeros secundarios, como el IP₃, relacionado con los flujos de calcio, y el diacilglicerol.

En contraposición a otros sistemas, el conocimiento de los mecanismos de control de la glucógeno sintasa en el hígado ha sido, y lo es aún, escaso. Varias circunstancias han contribuido a ello. Una de ellas ha sido la dificultad que implica la purificación del enzima hepático. De hecho, hasta hace pocos años el enzima no había sido purificado a homogeneidad y, por consiguiente, poco se sabía de sus características. Como consecuencia, las evidencias de que la glucógeno sintasa hepática puede ser fosforilada "in vitro" son relativamente recientes y la profundidad de los estudios realizados en este sentido es muy inferior a la del enzima muscular.

Por otra parte, el papel del hígado como reserva de glucógeno con destino, en forma de glucosa libre, al resto del organismo constituye un modelo diferente (y seguramente más complejo) que el atribuible al tejido muscular.

Por lo tanto, el presente trabajo se proyectó y llevó a cabo con el fin de esclarecer el papel que los procesos de fosforilación podían jugar en el control de la actividad glucógeno sintasa hepática. Es de recalcar que, en el momento

de iniciar nuestro trabajo, no existía evidencia directa alguna de que la glucógeno sintasa se encontrara fosforilada en el hígado ni de que, de estarlo, este hecho estuviera relacionado con el control de la actividad del enzima. En las páginas siguientes se discutirán los resultados expuestos a lo largo de la presente Memoria así como las implicaciones que puedan tener en el esclarecimiento de los procesos de control de la glucógeno sintasa hepática.

4.1 APROXIMACION EXPERIMENTAL AL ESTUDIO DEL CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR FOSFORILACION COVALENTE

El estudio del estado de fosforilación de una proteína ha sido abordado hasta el momento en base a dos enfoques metodológicos diferentes.

Algunos autores han considerado conveniente realizar la purificación del enzima por métodos convencionales y llevar a cabo, sobre la preparación homogénea, un análisis químico del fosfato unido a la proteína. De esta manera se ha podido, en muchos casos, conocer el estado de fosforilación de una proteína y el efecto que el tratamiento con hormonas, fármacos, etc. producía sobre la cantidad de fosfato unido a la proteína.

Esta metodología ha resultado útil en muchos casos. Un ejemplo relacionado con el tema que nos ocupa lo constituye el análisis que Parker y col. (305) realizaron de la glucógeno sintasa de músculo esquelético de conejo. Sin embargo, esta aproximación experimental presenta algunas limitaciones, como es el caso de que la purificación de suficientes cantidades del enzima sea difícil de llevar a cabo. Por otra parte, suele ser difícil asegurar el mantenimiento del estado original de fosforilación del enzima a lo largo del proceso de purificación.

El segundo planteamiento se fundamenta en la perfusión o incubación del tejido en un medio que contenga fosfato radioactivo. Una vez incorporado el isótopo a la proteína es cuestión de aislar la molécula y proceder a su estudio. Es evidente que este aislamiento puede hacerse por técnicas tradicionales de purificación de proteínas. Sin embargo, este procedimiento presenta las desventajas descritas anteriormente. Por otro lado, la vida media del isótopo es corta y, en pocos días, la radioactividad específica de la proteína se reduce considerablemente, con lo que se dificulta su detección y análisis.

Por estas razones la gran mayoría de los investigadores que han optado por esta segunda metodología han recurrido a un sistema de aislamiento que presenta múltiples ventajas: nos referimos al empleo de anticuerpos.

El empleo de anticuerpos específicos en el estudio de las proteínas ha resultado enormemente útil tanto en lo que se refiere al estudio de la velocidad de síntesis y degradación de la molécula como a la investigación de los procesos de fosforilación que sufre en la célula. A título de ejemplos de esta segunda aplicación podemos citar los trabajos de Garrison y col., identificando a la piruvato quinasa (201), fenilalanina hidroxilasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa (306) entre las numerosas fosfoproteínas existentes en el citoplasma de rata. Claus y col. (307) por su parte, utilizaron anticuerpos anti-piruvato quinasa para demostrar la correlación entre el estado de fosforilación del

enzima y su actividad en hepatocitos de rata. De manera análoga, Brand y col. (308) han estudiado las variaciones en el estado de fosforilación de la fosfofructoquinasa producidas por glucagon y glucosa mediante técnicas de inmunoprecipitación.

Esta aproximación experimental se ha aplicado también al estudio de enzimas del metabolismo del glucógeno. Así, en 1979, McCollough y Walsh (208,309) perfundieron corazones de rata con [³²P]fosfato e inmunoprecipitaron la glucógeno sintasa y la fosforilasa quinasa, con el fin de estudiar el estado de fosforilación de ambas enzimas. En 1983, Lawrence y col. (210) aplicaron una metodología similar en el estudio de la glucógeno sintasa de hemidiafragmas de rata.

Cuando, como una continuación lógica de nuestras investigaciones sobre el metabolismo del glucógeno hepático, nos planteamos el estudiar el estado de fosforilación de la glucógeno sintasa, consideramos conveniente el hacerlo mediante inmunoprecipitación del enzima a partir de hepatocitos de rata incubados con [³²P]fosfato.

El empleo de hepatocitos aislados para nuestro estudio y no de hígado perfundido o de cortes de hígado incubados con el isótopo respondió a varias razones. En primer lugar, la dilatada experiencia existente en nuestro laboratorio en la preparación de hepatocitos aislados y las numerosas investigaciones realizadas empleando células aisladas nos proporcionaba una sólida base de conocimientos a este

respecto. Por otro lado, la preparación de hepatocitos aislados proporciona una población homogénea de células de alta viabilidad e integridad metabólica, cuyo marcaje radioactivo presenta menos problemas técnicos que el empleo de hígado perfundido. Además, la gran mayoría de estudios de regulación de la actividad glucógeno sintasa hepática realizados hasta el momento lo han sido sobre células aisladas.

Una vez establecido el material de partida nos planteamos la preparación de los anticuerpos anti-glucógeno sintasa hepática. En un principio consideramos el utilizar anticuerpos desarrollados contra el enzima de músculo esquelético de conejo, ya existentes en nuestro laboratorio. Sin embargo, rápidamente pudimos observar que la capacidad de los mismos para reconocer a la glucógeno sintasa hepática era pobre. Con posterioridad otros autores han confirmado estas evidencias (71). Como consecuencia, se decidió purificar el enzima hepático y emplearlo como inmunógeno.

Las características de la preparaciones de glucógeno sintasa hepática empleadas en la obtención de anticuerpos se han descrito en el capítulo de Resultados y no las repetiremos aquí. Sin embargo, vale la pena resaltar que el protocolo de purificación diseñado ha resultado ser idóneo, al proporcionar un enzima de gran calidad como inmunógeno. A lo largo del presente trabajo se han obtenido anticuerpos en varias ocasiones. En todas ellas se han empleado preparaciones diferentes del enzima, que han sido inoculadas

en diferentes animales. En algunos casos, los conejos fueron reinoculados meses después de la primera dosis. A pesar de ello, en todas las ocasiones se han obtenido antisueros con un alto título y que mostraban una especificidad total por la glucógeno sintasa, como pudo ser demostrado por técnicas de difusión en agar, inmunolectroforesis "rocket" e inmunoprecipitación. Ello demuestra que tanto el protocolo de purificación como el de obtención de anticuerpos empleado es perfectamente reproducible y puede considerarse una excelente herramienta de trabajo.

Por otra parte, la cantidad de enzima requerida para la obtención de anticuerpos fue razonablemente escasa. Normalmente eran suficientes 100 μ g de la proteína, distribuidas en tres dosis, para obtener antisueros de alto título. Esta cantidad de enzima constituía apenas una sexta parte de lo que se podía obtener en una purificación convencional.

El empleo de anticuerpos para el aislamiento de la glucógeno sintasa de hepatocitos resultaba particularmente justificado en nuestro caso. Dado que nuestra intención era el estudiar los cambios que diversos efectores podían producir sobre el estado de fosforilación y la actividad glucógeno sintasa, era necesario diseñar un sistema experimental que garantizara que los cambios provocados por los efectores no fueran alterados durante el proceso de aislamiento del enzima. Por lo tanto, resultaba necesario establecer un protocolo experimental para el aislamiento

rápido de la glucógeno sintasa. En nuestro caso, era posible conseguir el aislamiento del enzima en un tiempo de apenas tres horas desde el momento en que se homogeneizaban las células y en ningún momento se sometía al enzima a temperaturas superiores a los 4° C. Todo ello favorecía el mantenimiento del enzima en el estado en que se encontraba en la célula, así como la minimización de la degradación proteolítica del mismo.

Algunos autores han empleado, al parecer con éxito, anticuerpos desarrollados contra la glucógeno sintasa de tejidos u órganos diferentes al hepático para reconocer al enzima de hígado. Así, se han utilizado anticuerpos contra el enzima de músculo esquelético de conejo (71,75) o de corazón de rata (76). No obstante, en los últimos tiempos se han obtenido evidencias que inducen a pensar que el enzima hepático puede ser antigénicamente diferente al de otros tejidos u órganos, posiblemente como consecuencia de una diferente estructura protéica (77,78). Estas evidencias aconsejan emplear preparaciones de anticuerpos desarrollados contra el enzima hepático para el aislamiento de la glucógeno sintasa de hepatocitos.

4.2 EVIDENCIAS DE LA FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA EN HEPATOCITOS DE RATA

Numerosas evidencias previas indicaban que, en diferentes tejidos, la glucogeno sintasa se encontraba fosforilada en mayor o menor medida. En lo que respecta al hígado, se había determinado el contenido en fosfato del enzima purificado tanto en forma "I" como en forma "D" (24,67). Sin embargo, en el momento de iniciar nuestros experimentos nadie había acometido el estudio del estado de fosforilación de la glucógeno sintasa en las condiciones en las que se encuentra en la célula hepática.

Como hemos comentado, nuestra aproximación experimental se basó en conseguir el marcaje isotópico del enzima mediante la incubación de los hepatocitos con [³²P]fosfato. La incubación con fosfato radioactivo da lugar al marcaje del ATP intracelular y, por lo tanto, de aquellas proteínas que sufren procesos de fosforilación.

En este sentido investigamos la incorporación de [³²P]fosfato en la posición gamma del ATP, puesto que éste es el fosfato que es transferido en las reacciones de fosforilación. Con ello pretendíamos averiguar si, en nuestras condiciones de trabajo, este marcaje isotópico era rápido y efectivo. Así, pudimos comprobar que la actividad específica del [³²γ-P]ATP intracelular se estabilizaba en 40 minutos, alcanzando un valor de alrededor de 25 cpm/pmol.

La actividad específica obtenida concuerda con la determinada por la mayoría de autores para análogas condiciones de trabajo.

El análisis electroforético de los inmunoprecipitados de glucógeno sintasa de hepatocitos de rata incubados con fosfato radioactivo demostró que tan solo era reconocida una fosfoproteína de 88 Kd de peso molecular. El mismo valor de peso molecular, o valores muy aproximados, han sido obtenidos por diversos autores y por nuestro propio laboratorio (22-24,71) para el enzima purificado de hígado de rata.

La incorporación de fosfato en la molécula del enzima es relativamente rápida. Nuestros resultados demuestran que la cantidad de radioactividad asociada a la subunidad del enzima alcanza un máximo entre los 45 y 60 minutos de iniciada la incubación de las células con [³²P]fosfato. Por lo tanto, el marcaje de la sintasa se correlaciona en el tiempo de una forma estrecha con el marcaje del ATP en su posición gamma. Ello es una evidencia de que el recambio de fosfato en la glucógeno sintasa es rápido, indicando que las actividades glucógeno sintasa quinasa y glucógeno sintasa fosfatasa son importantes en la célula viva. Estos datos permiten suponer que los procesos de fosforilación y defosforilación pueden jugar un papel determinante en el control de la actividad glucógeno sintasa.

En algunas ocasiones, el análisis del inmunoprecipitado revelaba, además de la banda radioactiva de 88 Kd, una banda

minoritaria de 80 Kd de peso molecular. Esta banda puede asignarse a un producto de proteólisis de la subunidad nativa de enzima, en base a diferentes criterios. En primer lugar aparece, también en proporción variable, como resultado de la purificación de la glucógeno sintasa por métodos convencionales que, en muchos casos, emplean sistemas de afinidad altamente selectivos. Por otro lado, tanto en el caso de aislamiento con anticuerpos como de purificación tradicional, la presencia de la banda de 80 Kd se incrementa notablemente si no se toman las adecuadas precauciones para evitar la proteólisis (omisión de inhibidores de proteasas, etc.). Por último, la citada banda puede ser producida por tratamiento de la glucógeno sintasa homogénea con tripsina durante unos pocos minutos.

Las preparaciones de glucógeno sintasa empleadas en la obtención de anticuerpos estaban prácticamente exentas del producto de proteólisis. Puesto que éste era reconocido durante el proceso de inmunoprecipitación conjuntamente con la subunidad de 88 Kd, parece evidente que ambas proteínas poseen en común gran parte de sus determinantes antigénicos (si no todos).

Cuando el inmunoprecipitado era tratado con bromuro de cianógeno en las condiciones descritas y el producto de reacción era sometido a electroforesis, se detectaba la presencia de dos fosfopéptidos (CB-2 y CB-1). Este mismo patrón se puede observar cuando se aísla por inmunoprecipitación el enzima de otros tejidos tales como

diafragma de rata (210) o corazón de rata (208). Recientemente se han obtenido análogos resultados en adipocitos de rata (228) e hígado de conejo (75) y rata (71). De manera semejante, la glucógeno sintasa procedente de diversos tejidos y fosforilada "in vitro" por determinadas proteína quinasas da lugar a dos fosfopéptidos tras tratamiento con bromuro de cianógeno.

Nuestros datos indican que ambos fosfopéptidos difieren en tamaño. Uno de ellos, que contiene la mayor parte de la radioactividad, presenta un peso molecular de 28 Kd (CB-2) según el criterio de electroforesis en presencia de SDS. Por su parte CB-1 muestra un peso molecular de 14 Kd bajo el mismo criterio.

Los citados valores de peso molecular coinciden notablemente con los obtenidos en hemidiafragma de rata (210), así como con los datos obtenidos al fosforilar "in vitro" a la glucógenos sintasa purificada de hígado de rata (22,24,71). Sin embargo, los valores obtenidos en el caso del enzima de músculo esquelético de conejo son inferiores: 21 y 12 Kd, respectivamente (84-86). Más sorprendente resulta que el enzima purificado a partir de hígado de conejo y fosforilado "in vitro" produzca dos fragmentos de 17 y 13 Kd, respectivamente (20), análogos a los que se encuentran al aislar el enzima por inmunoprecipitación a partir de hepatocitos de conejo incubados con [³²P]fosfato (75). Estas evidencias sugieren que las glucógeno sintasas de hepatocitos de rata y de conejo presentan algunas diferencias

estructurales. Por el momento se desconoce que implicaciones podría tener este hecho.

En cualquier caso, nuestros resultados conducen a la conclusión de que el enzima hepático se encuentra sometido a procesos activos de fosforilación en la célula. Estos procesos afectan a diferentes zonas de la molécula, indicando que el enzima sufre fosforilación múltiple. La distribución de fosfatos en la molécula de la glucógeno sintasa aislada directamente a partir de su entorno celular coincide, al menos a grandes rasgos, con la que es posible obtener por fosforilación "in vitro" del enzima con diferentes proteína quinasas. Ello es un indicio de que algunas de estas quinasas pueden jugar un papel fisiológico importante en la regulación del estado de fosforilación del enzima.

Por otra parte, si consideramos que una buena proporción del fosfato radioactivo localizado en el enzima se encuentra en el fragmento CB-2, es razonable suponer que alguna de las proteína quinasas capaces de fosforilar "in vitro" a esta región del enzima debe ser particularmente activa en la célula hepática.

4.3 INACTIVACION Y FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTASA DE HEPATOCITOS DE RATA

Investigaciones realizadas en el curso de los últimos años habían establecido una relación entre el estado de activación de la glucógeno sintasa y su grado de fosforilación en varios tejidos. En algunos casos estas evidencias eran indirectas y provenían de estudios cinéticos. Sólo en muy pocas ocasiones se habían obtenido confirmaciones directas. Tal es el caso de la inactivación y fosforilación del enzima por adrenalina en músculo esquelético de conejo (120,121,305) o en músculo de rata (122, 210). En algún caso se habían descrito excepciones a esta regla. Así, Lawrence y James (231) publicaron en 1984 que la incubación de adipocitos de rata con insulina provocaba una activación de la glucógeno sintasa sin afectar aparentemente a su grado de fosforilación.

Por nuestra parte, hemos estudiado estos fenómenos en el caso de la glucógeno sintasa de hepatocitos de rata y para ello hemos empleado un amplio número de efectores. En todos los casos, aquellos efectores capaces de inactivar al enzima han conseguido incrementar su grado de fosforilación en mayor o menor medida. La mayor incorporación de fosfato en el enzima se conseguía con aquellos efectores que se relacionan con mecanismos de acción dependientes de calcio. Así, tanto la vasopresina como la angiotensina o la oxitocina

prácticamente triplicaban la cantidad de fosfato radioactivo ligado a la glucógeno sintasa. El propio ionóforo A23187 era, asimismo, un potente inductor de la fosforilación del enzima. Sin embargo, el glucagon, una hormona típicamente glucogenolítica, provocaba una fosforilación que, aunque importante, era de menor cuantía. El vanadato, del cual se ha descrito muy recientemente su capacidad para inactivar a la glucógeno sintasa, era también capaz de fosforilar al enzima.

Una importante observación a hacer es la siguiente. La capacidad de un efector para inactivar a la glucógeno sintasa no guardaba una relación con su efecto sobre el estado de fosforilación del enzima. Por ejemplo, la inactivación provocada por el glucagon era tanto o más importante que la provocada por la vasopresina y, a pesar de ello, la cantidad de fosfato incorporado en el enzima como consecuencia de la incubación de las células con esta última hormona era notablemente mayor.

A nuestro juicio, ello sugiere que los diferentes centros de fosforilación que pueden existir en el enzima contribuyen de manera distinta a alterar el estado de activación del mismo. Se podría suponer que la fosforilación de determinados centros fuera decisiva para producir la inactivación del enzima, mientras que la fosforilación de otros residuos afectara escasamente, o no lo hiciera en absoluto (por lo menos de manera directa) a la actividad de la glucógeno sintasa. Una sugerencia en este sentido fue realizada por Ramachandran y col. (209) al estudiar la

fosforilación "in vivo" de la glucógeno sintasa de corazón de rata.

El empleo del litio nos ha permitido estudiar el proceso de activación de la glucógeno sintasa. La activación del enzima ha estado acompañada por una defosforilación del mismo. Sin embargo, la disminución del fosfato unido al enzima ha sido pequeña, no excediendo de un 25%, mientras que la activación obtenida era notable en todos los casos. Si bien esta disminución de radioactividad puede parecer escasa, es totalmente comparable a la obtenida al estudiar el efecto de la insulina en corazón de rata (209). Este hecho corroboraría lo sugerido anteriormente, en el sentido de que la defosforilación más o menos importante de un número escaso de centros podría influir decisivamente en el estado de activación del enzima.

La idea de que la fosforilación de determinados centros podría no afectar a la actividad glucógeno sintasa en la célula es concordante con algunas evidencias obtenidas por fosforilación "in vitro" de la glucógeno sintasa. Por ejemplo, Huang y col. (26) han descrito que es posible fosforilar a la glucógeno sintasa hepática con la proteína quinasa dependiente de AMPc o con la caseína quinasa-1 sin observar variaciones en el estado de activación del enzima. Otros autores, en cambio, han presentado resultados contradictorios con los del mencionado grupo (22,24).

La capacidad de determinados esteres de forbol para

inactivar a la glucógeno sintasa de hepatocitos de rata había sido puesta de manifiesto por Roach y Goldman (214). En nuestro caso hemos podido reproducir los resultados de estos autores, incluso sin activar previamente al enzima mediante la incubación de las células con glucosa. La glucógeno sintasa resultaba activada por el TPA y el 4β -PDD, mientras que el forbol y el 4α -PDD no afectaban al estado de activación del enzima. Al estudiar las variaciones en el estado de fosforilación de la glucógeno sintasa producidas por estos efectores pudimos comprobar una correspondencia entre la inactivación del enzima y su fosforilación.

Los esteres de forbol son capaces de activar "in vitro" e "in vivo" a la proteína quinasa C, presumiblemente sustituyendo a la molécula de 1,2-diacilglicerol con la que guardan gran similitud. Ello sugiere que la proteína quinasa C puede ser responsable, al menos parcialmente, de la fosforilación de la glucógeno sintasa producida por los esteres de forbol. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que los esteres de forbol que no son activadores de la proteína quinasa C "in vitro" tampoco tienen efecto alguno sobre la actividad y el estado de fosforilación de la glucógeno sintasa. En este sentido, se ha demostrado que la proteína quinasa C es capaz de fosforilar "in vitro" a la glucógeno sintasa hepática (22,30,71). No se ha podido demostrar, por el momento, que esta fosforilación produzca una inactivación significativa de la glucógeno sintasa de hígado de rata (22), aunque Ahmad y col. (29) han conseguido fosforilar e inactivar al enzima de músculo esquelético e

hígado de conejo empleando preparaciones parcialmente purificadas de proteína quinasa C obtenidas a partir de cerebro de rata.

Las características estructurales más importantes de los esteres de forbol capaces de producir efectos biológicos y de activar a la proteína quinasa C se refieren al tipo de ácidos que esterifican las posiciones 12 y 13 y a la configuración del carbono de la posición 4. Esta última es particularmente interesante, puesto que los compuestos de la familia 4 β son activos, mientras que sus isómeros 4 α no lo son. Esta regla se ha visto confirmada en nuestros experimentos con los isómeros 4 α y 4 β del forbol-12,13-didecanoato.

Por el contrario, la similitud entre los sustituyentes de las posiciones 12 y 13 con los 1,2-diacilgliceroles fisiológicos no parece ser estrictamente necesaria. Así, la mezereína, una molécula relacionada con los esteres de forbol, pero que no guarda relación con la estructura de 1,2-diacilglicerol, es capaz de activar "in vitro" a la proteína quinasa C (162). En relación con ello, hemos conseguido demostrar que la mezereína es capaz de provocar la fosforilación y la inactivación de la glucógeno sintasa a las mismas concentraciones a las que lo hacen los esteres de forbol activos. Ello constituye una evidencia adicional de que la existencia de estructuras semejantes al 1,2-diacilglicerol no es condición imprescindible para que estos compuestos muestren su efecto.

Como se ha comentado anteriormente, los centros de fosforilación de la glucógeno sintasa activos "in vivo" se distribuyen en dos zonas del enzima que pueden ser separadas por tratamiento con bromuro de cianógeno. En general, el incremento en la fosforilación del enzima provocado por los efectores estudiados afectaba, en mayor o menor grado, a ambos fragmentos. Este hecho indica que los citados efectores promovían la fosforilación del enzima en varios centros.

El incremento en la fosforilación del fragmento CB-1 fue, en todos los casos, proporcionalmente más importante que el de CB-2. Este hecho coincide con el señalado por Lawrence y col. (210) al estudiar la fosforilación producida por adrenalina en la glucógeno sintasa de hemidiafragma de rata. Por el contrario, Ciudad y col. (71) han observado un incremento mayor en el fragmento CB-2 tras incubar hepatocitos de rata con glucagon o adrenalina. Estos autores incubaban las células en presencia de glucosa a la concentración de 20 mM. Dado que la glucosa a esta concentración es capaz de activar y, posiblemente, de defosforilar al enzima en adipocitos (231) y hepatocitos de rata (74), resulta difícil comparar ambos resultados.

La cuantía del incremento en la fosforilación de CB-1 variaba según el efector empleado. La adrenalina y las hormonas peptídicas dependientes de calcio empleadas fueron los agentes más eficaces en este sentido. Estos efectores provocaron también un importante incremento en la cantidad de fosfato asociado a CB-2. En cambio, tanto el glucagon como el

vanadato afectaron en menor medida la fosforilación del citado fragmento. A pesar de ello la inactivación alcanzada era importante, sobre todo en el caso del glucagon. La escasa incidencia del glucagon en la fosforilación de CB-2 concuerda con los experimentos de Imazu y col. (22), en los que se ponía de manifiesto que la incubación de la glucógeno sintasa de hígado de rata con la proteína quinasa dependiente de AMPc daba lugar a una rápida fosforilación de CB-1 y solo más tardíamente afectaba a CB-2.

Un caso extremo lo constituyeron los esteres de forbol. A determinadas concentraciones de TPA fue posible inactivar notablemente a la glucógeno sintasa sin que el incremento en el estado de fosforilación de CB-2 fuera significativo. La fosforilación de CB-2 sólo era apreciable a altas concentraciones de TPA ($> 0,1 \mu\text{g/ml}$). En realidad, la inactivación del enzima obtenida a bajas concentraciones de TPA se correlacionaba perfectamente con el incremento en la fosforilación de CB-1. Por lo tanto, puede deducirse que el fragmento CB-1 alberga algún centro de fosforilación que influye de manera determinante en la actividad del enzima.

Los resultados obtenidos en cuanto a la fosforilación específica de CB-1 producida por la incubación de las células con TPA concuerdan con los obtenidos al fosforilar "in vitro" a la glucógeno sintasa con la proteína quinasa C. En efecto, la sintasa de hígado de rata es fosforilada exclusivamente en CB-1 por la citada quinasa (22,71). Así pues, estos resultados refuerzan la idea de que la proteína quinasa C es

la responsable de la fosforilación de la glucógeno sintasa producida por la exposición de los hepatocitos a TPA.

La capacidad del TPA para incrementar el estado de fosforilación de CB-2 cuando este efector es empleado a altas concentraciones (1 $\mu\text{g/ml}$) podría no estar asociada a la actividad proteína quinasa C. En este sentido Ashendel (309) ha hecho recientemente hincapié en la capacidad de los esteroides de forbol para interaccionar de forma no específica con las membranas celulares. Este efecto se produce debido a la naturaleza lipofílica de estos compuestos y ocurre cuando se emplean a altas concentraciones. La naturaleza de los cambios ocurridos en la membrana, así como el mecanismo por el cual podrían afectar a la fosforilación de la glucógeno sintasa, son completamente desconocidos.

El efecto activador del litio sobre la glucógeno sintasa se traducía en una defosforilación del enzima. Esta defosforilación afectaba por igual a ambos fragmentos de bromuro de cianógeno, indicando que el ión promovía la defosforilación del enzima en diferentes centros. Un hecho análogo fue descrito por Lawrence y col. para la defosforilación de la glucógeno sintasa de hemidiafragma por insulina (210) y para el enzima de adipocitos por insulina y glucosa (231). En ambos casos la disminución en la cantidad del fosfato radioactivo unido a ambos fragmentos era del orden de la observada en nuestros experimentos.

El análisis de los productos de degradación triptica de la glucógeno sintasa inmunoprecipitada a partir de hepatocitos incubados con [³²P]fosfato en ausencia de efectores muestra la existencia de 4 fosfopéptidos de marcado carácter ácido. Dos de ellos son mayoritarios (pI 3,9 y 3,4) y contienen aproximadamente el 75% de la radioactividad presente en el gel. Estos resultados difieren de los obtenidos muy recientemente por Akatsuka y col. (73), los cuales solo detectan un fosfopéptido de pI 3,8. La razón de ello, posiblemente, estriba en que estos autores incubaban los hepatocitos con glucosa a la concentración de 40 mM. Esta enorme cantidad de glucosa podría dar lugar a un enzima artificialmente defosforilado, explicando así la diferencia observada.

El patrón triptico obtenido era constante aun prolongando el tratamiento con la proteasa, descartando así la posibilidad de fosfopéptidos procedentes de una degradación incompleta del enzima. Las evidencias presentadas prueban, por lo tanto, que en condiciones basales la glucógeno sintasa se encuentra fosforilada en, por lo menos, cuatro centros.

El análisis triptico de CB-1 indica la presencia de dos fosfopéptidos que muestran unos pI de 3,9 (CB-1a) y 3,4 (CB-1b), respectivamente. La existencia de al menos dos centros fosforilables en CB-1 concuerda con los datos previos obtenidos en nuestro laboratorio al fosforilar "in vitro" la glucógeno sintasa hepática con diferentes proteína quinasas

(24). En nuestra opinión, el péptido CB-la corresponde al fosfopéptido de pI 3,9 que se obtiene por digestión de la subunidad enzimática. CB-lb, por su parte, puede corresponder en parte al fosfopéptido de pI 3,4. En cuanto al fragmento CB-2, las evidencias obtenidas indican que la degradación tríptica de este fragmento podría producir un péptido que enfocaría en una zona muy próxima al péptido de pI 3,4. En el caso de que la degradación de la subunidad generara ambos péptidos probablemente no podrían ser resueltos entre sí.

Las dificultades encontradas a la hora de analizar por isoelectroenfoque los péptidos trípticos derivados de CB-2 han resultado mayores de las previstas. Un hecho interesante es el que las condiciones empleadas eran perfectamente aplicables al análisis del fragmento CB-2 del enzima de músculo esquelético de conejo fosforilado "in vitro" por la caseína quinasa-1. Si consideramos este dato, junto con el distinto tamaño de los fragmentos de bromuro de cianógeno obtenidos en ambos enzimas y las diferencias inmunológicas descritas anteriormente, parece claro que ambas proteínas presentan diferencias en su estructura primaria.

En base a los conocimientos que se poseen en este momento sobre la fosforilación de la glucógeno sintasa de hígado de rata por proteína quinasas hepáticas, es difícil establecer una relación entre los fosfopéptidos trípticos obtenidos tras fosforilación "in vitro" del enzima y los hallados a partir de células incubadas con fosfato radioactivo.

Sin duda el grupo de Huang y col. es el que más ha profundizado en el estudio mediante isoelectroenfoque de los fosfopéptidos trípticos obtenidos a partir de la glucógeno sintasa por fosforilación con diferentes proteína quinasas (21,25,26). Los resultados establecidos por estos autores coinciden razonablemente con los presentados en este trabajo, en el sentido de que la fosforilación del enzima da lugar a diversos fragmentos trípticos de marcado carácter ácido. Así, puede ser obtenido un fosfopéptido de pI 3,8 por fosforilación con fosforilasa quinasa o caseína quinasa 1. Fosfopéptidos con un pI entre 3,5 y 3,3 se pueden obtener por fosforilación con caseína quinasa-1. Según estos autores, la proteína quinasa dependiente de AMPc genera un único fosfopéptido de pI 4,2. Este resultado ha sido puesto en entredicho por Imazu y col. (30), los cuales obtuvieron tres fosfopéptidos separables por HPLC o filtración en gel.

En cualquier caso, toda comparación debe tener en cuenta las siguientes limitaciones. En primer lugar, las preparaciones de glucógeno sintasa empleadas por Huang y col. estaban afectadas de un importante grado de proteólisis. El efecto que esta circunstancia pueda provocar en el patrón tríptico del enzima hepático no está definido por el momento. En segundo lugar, los mismos autores aceptan que la acción de las proteína quinasas puede ser diferente según que la glucógeno sintasa esté purificada a homogeneidad o se encuentre asociada al sedimento de glucógeno, en un grado de purificación escaso (25). Estas diferencias afectan tanto al número de fosfopéptidos generados como a su nivel de

fosforilación. Por último, la gama de proteína quinasas empleadas por estos autores es limitada, careciéndose de datos sobre algunas quinasas dependientes e independientes de calcio.

Los efectores capaces de inactivar y fosforilar a la glucógeno sintasa afectan de manera más o menos específica el patrón de fosfopéptidos trípticos del enzima. Los datos que hemos obtenido no son exhaustivos, puesto que nuestro interés se ha centrado en el estudio de los efectores relacionados con los procesos α -adrenérgicos y de los esteroides de forbol.

La incubación de las células con adrenalina, vasopresina, angiotensina II u oxitocina daba lugar a un incremento de todos los fosfopéptidos presentes en el gel, aunque en diferente medida. Todos los efectores incrementaban notablemente el fosfopéptido de pI 4,1, generalmente de difícil detección en células control, mientras que la radioactividad del péptido de pI 3,9 era aumentada sobre todo por la adrenalina. El péptido que enfocaba a pI 3,4 veía incrementada su radioactividad por todos los efectores, aunque en menor medida en que lo eran los péptidos que enfocaban a pI 3,2 y 3,1. Sin embargo, sin duda el hecho más característico era la aparición de un nuevo fosfopéptido a partir del enzima de células incubadas con vasopresina. El nuevo fosfopéptido enfocaba a pI 2,9. De entre todos los ensayados, el único agente que fue capaz de mimetizar este efecto fue el ionóforo A23187.

El patrón diferencial mostrado por la vasopresina permite suponer que, en algún punto, el mecanismo de acción de esta hormona difiere de sus análogos peptídicos angiotensina y oxitocina. El hecho de que el ionóforo de calcio presente un patrón similar al de la vasopresina refuerza la hipótesis de que el mecanismo de acción de esta hormona sigue una vía que es dependiente del catión.

Por el momento se desconoce qué proteína quinasa o qué combinación de las mismas puede provocar la aparición del péptido de pI 2,9. Las evidencias presentadas parecen indicar que posiblemente esté involucrada una proteína quinasa dependiente de calcio, seguramente distinta de la fosforilasa quinasa. Asimismo, a juzgar por los datos que hemos obtenido en nuestros experimentos con los esteres de forbol, la proteína quinasa C no tendría relación con la fosforilación de este péptido. Por otra parte, el péptido de pI 2,9 parece corresponder al fragmento CB-2 de la glucógeno sintasa. Ello hace difícil el asignar un papel en su fosforilación a la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, puesto que Imazu y col. (22,30) y Ciudad y col. (71) han observado que esta quinasa fosforila exclusivamente el fragmento CB-1. No puede dejarse de lado la posibilidad de que el fosfopéptido en cuestión corresponda a alguno de los péptidos descritos previamente y que su diferente movilidad electroforética sea debida a un diferente estado de fosforilación inducido por vasopresina o el ionóforo.

Dado que los esteres de forbol afectaban fundamentalmente el estado de fosforilación del fragmento CB-1, centramos nuestros esfuerzos en el análisis tríptico de este fosfopéptido. El hecho de que tan sólo uno de los dos péptidos trípticos de CB-1 incrementara su estado de fosforilación (CB-1a, pI 3,9) resultó particularmente sugerente. Por un lado, es una evidencia clara de que la fosforilación del centro o centros existentes en CB-1a es suficiente para provocar la inactivación del enzima. Por otra parte, si consideramos a la proteína quinasa C como la posible responsable de la fosforilación provocada por el TPA, puede llegarse a la conclusión de que esta quinasa afecta de manera casi exclusiva al centro(s) situado en CB-1a. Esta suposición no concuerda con los resultados obtenidos "in vitro" por Imazu y col. (30), quienes indican que la degradación tríptica de la glucógeno sintasa hepática fosforilada por la proteína quinasa C produce dos fosfopéptidos tras análisis por filtración en gel. De ellos, el que contiene un mayor porcentaje de radioactividad se localiza en CB-1. Sin embargo, los datos ofrecidos por estos autores no permiten descartar que el fosfopéptido de menor radioactividad sea producto de una actividad quinasa contaminante diferente de la proteína quinasa C.

El efecto de los esteres de forbol sobre el metabolismo del glucógeno es objeto de controversia. Algunos autores han sugerido que estos compuestos remedan los efectos de la insulina (224,273). Otros, en cambio, han obtenido respuestas

contrarias a la de la hormona (42,214,274,275). Los datos que hemos podido obtener apoyan la idea de que los esteroides de forbol ejercen un efecto contrario al de la insulina en lo que hace referencia a la actividad y el estado de fosforilación de la glucógeno sintasa (si bien nadie ha demostrado hasta el momento que la insulina promueva la defosforilación de la sintasa hepática). Este efecto de los esteroides de forbol está, muy posiblemente, asociado a un incremento de la actividad proteínica quinasa C. Ello implica que la glucógeno sintasa sería un sustrato fisiológico para la quinasa que, de esta manera, podría desempeñar un papel importante en el control de la glucógeno sintasa hepática.

4.4 LA FOSFORILACION EN TREONINAS DE LA GLUCOGENO SINTASA HEPATICA.

Hasta hace muy poco tiempo todas las evidencias obtenidas indicaban que la glucógeno sintasa era fosforilada únicamente en residuos de serina. Sin embargo, a finales de 1984, Hiken y Lawrence demostraron que el enzima inmunoprecipitado a partir de adipocitos o músculo esquelético de rata incubados con [³²P]fosfato contenía cantidades significativas de fosfotreonina (83).

Nuestros experimentos demuestran que este fenómeno ocurre también en el enzima hepático. Así, la incubación de

hepatocitos con [P]fosfato durante 45 minutos es suficiente para incorporar fosfato radioactivo de manera apreciable en residuos de treonina, indicando que el recambio de este fosfoaminoácido es razonablemente rápido. Esta característica sugiere la existencia de un centro de fosforilación metabólicamente activo.

El porcentaje de radioactividad asociada a fosfotreonina es del orden del descrito en adipocitos y menor que el hallado en músculo esquelético de rata. Al igual que en estos dos tejidos, en hepatocitos de rata el residuo(s) de fosfotreonina se localiza siempre en el fragmento CB-2, mientras que CB-1 no contiene residuos de este tipo, probando que no se trata de una fosforilación al azar. Los residuos de fosfotreonina encontrados provienen, sin lugar a dudas, de la molécula de glucógeno sintasa. La posibilidad de que procedan de algún péptido de bajo peso molecular que, hipotéticamente, pudiera encontrarse en los inmunoprecipitados debe ser descartada, puesto que las hidrólisis se realizaban a partir de la subunidad del enzima aislada por electroforesis desnaturizante.

Nuestros resultados indican que, al igual que en adipocitos y músculo de rata, la glucógeno sintasa de hepatocitos no contiene residuos de fosfotirosina en cantidades detectables. Este hecho fue comprobado no sólo tras hidrólisis ácida de la proteína, tratamiento que destruye los residuos de fosfotirosina en buena proporción, sino también por hidrólisis alcalina, método que mantiene

inalterado un alto porcentaje de estos residuos.

En el momento de obtener los resultados citados no había sido descrita ninguna actividad quinasa capaz de fosforilar a la glucógeno sintasa hepática en treoninas. En idéntica situación se encontraban los enzimas de músculo esquelético de conejo y rata. El análisis de fosfoaminoácidos del enzima fosforilado por las cuatro proteína quinasas capaces de introducir fosfatos en CB-2 demostró que la caseína quinasa-2 era la única capaz de fosforilar a la glucógeno sintasa en residuos de treonina, a la vez que catalizaba la fosforilación en serinas.

El descubrimiento de fosfotreoninas en el enzima hepático es particularmente interesante por cuanto no había sido descrito previamente en el enzima de músculo esquelético de conejo, mucho mejor conocido. Tan sólo muy recientemente se han conseguido evidencias de la fosforilación en treoninas de la sintasa de músculo de conejo, en reacción catalizada por la caseína quinasa-1 y, en menor medida, por la caseína quinasa -2. La radioactividad asociada a treonina se localizaba en ambos casos en el fosfopéptido CB-2 (173).

Nuestros resultados constituyen la primera evidencia de la existencia de una proteína quinasa capaz de fosforilar residuos de treonina en la glucógeno sintasa hepática y permiten proponer la hipótesis de que la caseína quinasa-2 puede ser responsable de la fosforilación en treonina observada en hepatocitos de rata. Esta hipótesis viene

reforzada por el hecho de que los residuos de fosfotreonina producidos por la incubación de la glucógeno sintasa con caseína quinasa-2 se localizan también en el fragmento CB-2. De hecho, la capacidad de la caseína quinasa-2 para fosforilar en treoninas era conocida para otros sustratos, como la caseína o la fosvitina (311).

De ser correcta esta suposición, no cabe duda de que la caseína quinasa-2 podría tener un papel importante en el control del estado de fosforilación de la sintasa en hepatocitos y, quizá, en la modulación de su actividad. Una posible manera de atacar el problema podría ser el estudiar si la exposición de los hepatocitos a determinados efectores alteran la proporción de fosfotreonina presente en la molécula. En este sentido, algunas poliaminas, que como se sabe son capaces de activar a la caseína quinasa-2, podrían ser herramientas muy útiles.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Se ha diseñado un método para el aislamiento rápido de la glucógeno sintasa a partir de hepatocitos de rata en ayunas, empleando técnicas de inmunoprecipitación.
- 2.- Los anticuerpos han sido preparados por inyección en conejos de preparaciones homogéneas de glucógeno sintasa obtenida a partir de hígado de rata, de alta actividad específica y exenta de proteólisis.
- 3.- Las preparaciones de anticuerpos han demostrado su capacidad para reconocer a la glucógeno sintasa homogénea o al enzima presente en extractos de hepatocitos de rata en pruebas de doble difusión, inmunolectroforesis "rocket" o inmunoprecipitación. La especificidad de la reacción de inmunoprecipitación era absoluta, a juzgar por el análisis electroforético de los inmunoprecipitados.
- 4.- La glucógeno sintasa de hepatocitos de rata incorpora en su molécula fosfato radioactivo cuando las células son incubadas con [³²P]fosfato. La incorporación de fosfato es rápida, alcanzando un máximo entre los 45 y 60 minutos del inicio de la incubación y se correlaciona con la incorporación de fosfato en la posición gamma del ATP intracelular.
- 5.- El peso molecular estimado para la subunidad de la glucógeno sintasa aislada por inmunoprecipitación es de 88 Kd. Este valor coincide con el obtenido para

preparaciones de glucógeno sintasa homogénea. La omisión de inhibidores de proteasas durante el proceso de aislamiento da lugar a la aparición de una fosfoproteína de 80 Kd de peso molecular que es reconocida por los anticuerpos. Diversas evidencias indican que esta fosfoproteína es un producto de proteólisis de la subunidad de la glucógeno sintasa.

- 6.- El tratamiento de la glucógeno sintasa inmunoprecipitada con bromuro de cianógeno genera dos fosfopéptidos que pueden ser resueltos mediante electroforesis en presencia de SDS. El de menor movilidad (CB-2) muestra un peso molecular de 28 Kd y el de migración más rápida (CB-1) presenta un peso molecular de 14 Kd. Estos fosfopéptidos comigran con los obtenidos a partir de glucógeno sintasa hepática fosforilada "in vitro" por diversas proteína quinasas.
- 7.- La cantidad de fosfato radioactivo incorporado en el fosfopéptido de mayor peso molecular (CB-2) es, aproximadamente, tres veces mayor que la incorporada en el fosfopéptido CB-1.
- 8.- La fragmentación con bromuro de cianógeno de inmunoprecipitados en los que la glucógeno sintasa se encuentra significativamente proteolizada da lugar a un tercer fosfopéptido (CB-2') con un peso molecular de 20 Kd. Todas las evidencias indican que se trata de un fragmento del fosfopéptido CB-2.

- 9.- Cuando los productos de degradación triptica de la subunidad de la glucógeno sintasa aislada de hepatocitos incubados con [³²P]fosfato en ausencia de efectores son separados por isoelectroenfoque se detectan al menos 4 fosfopéptidos. Estos péptidos son marcadamente ácidos y enfocan a pH 3,9; 3,4; 3,2 y 3,1. El fosfopéptido de pI aparente 3,4 es el que contiene mayor cantidad de radioactividad.
- 10.- El tratamiento con tripsina del fosfopéptido CB-1 da lugar a la aparición de dos fosfopéptidos (CB-1a, pI 3,9 y CB-1b, pI 3,4) que pueden ser resueltos tanto por isoelectroenfoque como por electroforesis en presencia de SDS.
- 11.- Todos los efectores capaces de inactivar a la glucógeno sintasa de hepatocitos de rata provocan, en mayor o menor medida, un incremento en el estado de fosforilación del enzima.
- 12.- Las hormonas peptídicas vasopresina, angiotensina II y oxitocina fueron los agentes que estimularon más intensamente la incorporación de fosfato en la glucógeno sintasa. La adrenalina y el ionóforo A23187 incrementaron notablemente el contenido en fosfato del enzima, mientras que el glucagon lo hizo en menor medida. El vanadato produjo un incremento en la fosforilación semejante al del glucagon.

- 13.- El catión litio produjo una importante activación de la glucógeno sintasa, fenómeno que se vió acompañado por una defosforilación del enzima.
- 14.- Los esterés de forbol activos fisiológicamente y capaces de activar a la proteína quinasa C (TPA y 4β -PDD) inactivaron a la glucógeno sintasa y provocaron su fosforilación. El forbol y el 4α -PDD no afectaron ni a la fosforilación ni a la actividad del enzima. La mezereína resultó ser tan activa como el TPA respecto a los parámetros citados, a pesar de no poseer estructura de 1,2-diacilglicerol.
- 15.- Considerando el conjunto de efectores ensayados no se ha apreciado una relación directa entre el grado de fosforilación del enzima y su inactivación, lo que sugiere que no todos los centros, al ser fosforilados, afectan de igual manera a la actividad del enzima.
- 16.- La fosforilación inducida por efectores capaces de inactivar a la glucógeno sintasa afectaba a ambos fosfopéptidos de bromuro de cianógeno, indicando fenómenos de fosforilación múltiple. Si bien, en general, la cantidad de fosfato introducida en CB-2 era superior a la introducida en CB-1, en todos los casos el fragmento CB-1 incrementaba proporcionalmente su grado de fosforilación en mayor medida.

- 17.- El TPA a bajas concentraciones era capaz de provocar una notable inactivación de la glucógeno sintasa sin apenas dar lugar a un incremento en la fosforilación de CB-2. Por el contrario, la inactivación del enzima se correlacionaba perfectamente con el incremento en la fosforilación de CB-1.
- 18.- La incubación con litio producía una defosforilación de la glucógeno sintasa que afectaba en igual medida a CB-2 y a CB-1, indicando un proceso de defosforilación que afectaba a varios centros.
- 19.- Los patrones de degradación triptica de la glucógeno sintasa obtenida a partir de células tratadas con vasopresina, angiotensina u oxitocina presentaban entre ellos algunas diferencias. La más significativa consistía en la aparición de un nuevo fosfopéptido de pI 2,9, exclusivo del enzima procedente de células incubadas con vasopresina.
- 20.- El fosfopéptido triptico de pI 2,9 podía también detectarse tras incubación de los hepatocitos con el ionóforo A23187, sugiriendo una similitud entre el mecanismo de acción de este compuesto y el de la vasopresina.
- 21.- La incubación de las células con TPA a concentraciones submáximas daba lugar a la incorporación de fosfato únicamente en uno de los fosfopéptidos tripticos de

CB-1 (CB-1a). Ello es indicativo de que este fragmento contiene un centro(s) de fosforilación que modifican de forma importante el estado de activación de la glucógeno sintasa.

22.- La glucógeno sintasa se encuentra en los hepatocitos fosforilada en residuos de treonina, además de en residuos de serina, los cuales son mayoritarios. El enzima no contiene cantidades detectables de fosfotirosina. El residuo(s) de fosfotreonina se localiza exclusivamente en el fragmento CB-2.

23.- La CK-2, pero no la CK-1, la GSK-3 o la proteína quinasa dependiente de AMPc, es capaz de fosforilar a la glucógeno sintasa hepática en residuos de treonina, además de en residuos de serina. Los residuos de fosfotirosina se encuentran situados en el fragmento CB-2 del enzima pero no en el CB-1. Ello permite postular que la Ck-2 juega un papel importante en el control del estado de fosforilación de la glucógeno sintasa en el hepatocito y sugiere que esta proteína quinasa desempeña un papel fisiológico en la célula.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- COHEN, P. (1982) *Nature* (London) 296, 613-620.
- 2.- STEINBERG, D. (1976) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 7, 157-198.
- 3.- NIMMO, H.G. (1980) en "Molecular Aspects of Cellular Regulation" (Cohen, P. ed.) vol. 1, 135-152. Elsevier, Amsterdam.
- 4.- ENGSTROM, L. (1980) en "Molecular Aspects of Cellular Regulation" (Cohen, P. ed.) vol. 1, 11-31. Elsevier, Amsterdam.
- 5.- ADELSTEIN, R.S. y EISEMBERG, F.A. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 921-956.
- 6.- KASUGA, M.; KARLSSON, F.A. y KAHN, C.R. (1982) *Science* 215, 185.
- 7.- KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D.L.; KARLSSON, F.A.; HÄRING, H.V. y KAHN, C.R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9891.
- 8.- KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D.L.; CRETZAZ, M. y KAHN, C.R. (1982) *Nature* (London) 298, 667.
- 9.- USHIRO, H. y COHEN, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8363-8365.
- 10.- REYNOLDS jr., F.H.; TODARO, G.J.; FRYLING, C. y STEPHENSON, J.R. (1981) *Nature* (London) 292, 259-262.
- 11.- IWASHITA, S. y FOX, C.F. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2559-2567.
- 12.- DAVIS, R.J. y CZECH, M.P. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1974-1978.
- 13.- NEWSHOLME, E.A. (1980) *FEBS Letters* 117, K121-134.
- 14.- KREBS, H.A. (1972) *Adv. Enzyme Regul.* 10, 397-420.
- 15.- CORI, C.F.; COLOWICK, S.P. y CORI, G.T. (1937) *J. Biol. Chem.* 121, 465-469.
- 16.- CORI, C.F.; SCHMIDT, G. y CORI, G.T. (1939) *Science* 89, 464-468.
- 17.- LELOIR, L.F. y CARDINI, C. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6340-6341.
- 18.- BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1981) *Biochem. J.* 198, 379-383.
- 19.- CHRISMAN, T.D.; VANDENHEEDE, J.R. KHANDELWAL, R.L.; GELLA, F.J.; UPTON, J.D. y KREBS, E.G. (1980) *Adv. Enzyme Regul.* 18, 145-159.

- 20.- CAMICI, M.; AHMAD, Z.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2466-2473.
- 21.- AKATSUKA, A.; SINGH, T.J. y HUANG, K-P. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7878-7883.
- 22.- IMAZU, M.; STRICKLAND, W.G.; CHRISMAN, T.D. y EXTON, J.H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1813-1821.
- 23.- JETT, M.F. y SODERLING, T.R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6739-6745.
- 24.- MOR, A. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona (1984)
- 25.- AKATSUKA, A.; SINGH, T.J. y HUANG, K-P. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 186-195.
- 26.- HUANG, K-P.; AKATSUKA, A.; SINGH, T.J. y BLAKE, K.R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7094-7101.
- 27.- CAMICI, M.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3429-3434.
- 28.- AHMAD, Z.; CAMICI, M.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3420-3428.
- 29.- AHMAD, Z.; LEE, F.T.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8743-8747.
- 30.- IMAZU, M.; STRICKLAND, W.G. y EXTON, J.H. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 789, 285-293.
- 31.- STADTMAN, E.R.; CHOCK, P.B. y ADLER, S.P. (1976) en "Metabolic Interconversion of Enzymes" (Shaltiel, S. ed.) 221-233, Heidelberg.
- 32.- ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.; BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2662-2669.
- 33.- EXTON, J.H.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.; BLACKMORE, P.F.; CHERRINGTON, A.D. y CHAN, T.M. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 441-452.
- 34.- BLACKMORE, P.F.; BRUMLEY, F.T.; MARKS, J.L. y EXTON, J.H. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4851-4858.
- 35.- HEMS, D.A.; RODRIGUES, L.M. y WHITTON, P.D. (1978) *Biochem. J.* 172, 311-317.
- 36.- BERRIDGE, M.J. (1984) *Biochem. J.* 220, 345-360.
- 37.- SURESH, K.J.; ANDREW, P.T.; WILLIAMS, R.J.; IRVINE, R.F. y WILLIAMSON, J.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3077-3081.
- 38.- TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; KIKKAWA, U.; MORI, T. y NISHIZUKA, Y. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1218-1224.

- 39.- NISHIZUKA, Y. (1984) *Nature* (London) 308, 693-698.
- 40.- GARRISON, J.C.; JHONSEN, D.E. y CAMPANILE, C.D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3283-3292.
- 41.- FAIN, J.N.; LI, S-Y; LITOSCH, I. y WALLACE, M. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 88-94.
- 42.- KIMURA, S.; NAGASAKI, K.; ADACHI, I.; YAMAGUCHI, K.; FUJIKI, H. y ABE, K. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1057-1064.
- 43.- CIUDAD, C.J.; BOSCH, F. y GUINOVRT, J.J. (1981) *FEBS Letters* 129, 123-126.
- 44.- MOR, A.; VILA, J.; CIUDAD, C.J. y GUINOVRT, J.J. (1981) *FEBS Letters* 136, 131-134.
- 45.- MASSAGUE, J. y GUINOVRT, J.J. (1977) *FEBS Letters* 82, 317-320.
- 46.- MASSAGUE, J. y GUINOVRT, J.J. (1978) *Biochem. Biophys. Acta.* 543, 269-272.
- 47.- McVERRY, P.H. y KIM, K.H. (1974) *Biochemistry* 13, 3505-3511.
- 48.- SALSAS, E. y LARNER, J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1833-1837.
- 49.- ROSELL PEREZ, M.; VILLAR PALASI, C. y LARNER, J. (1962) *Biochemistry* 1, 763-768.
- 50.- VILLAR PALASI, C. y LARNER, J. (1960) *Biochem. Biophys. Acta.* 390, 171-173.
- 51.- WALSH, D.A.; PERKINS, J.P. y KREBS, E.G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3763-3765.
- 52.- PIRAS, R.; ROTHMAN, L.B. y CABIB, E. (1968) *Biochemistry* 7, 56-66.
- 53.- ROACH, P.J. y LARNER, J. (1976) *Trends in Biochem. Sci.* 1, 110-112.
- 54.- TAN, A.W.H. (1981) *Biochem. J.* 200, 169-172.
- 55.- TAN, A.W.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5004-5007.
- 56.- ROACH, P.J.; TAKEDA, Y. y LARNER, J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1913-1919.
- 57.- ROACH, P.J. y LARNER, J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1920-1925.
- 58.- MERSMANN, H.J. y SEGAL, H.L. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1688-1695.

- 59.- DE WULF, H.; STALMANS, W. y HERS, H.G. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 545-551.
- 60.- HAVERSTICK, D.M. y GOLD, A.H. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126, 170-177.
- 61.- ROACH, P.J. (1981) *Curr. Top. Cell. Regul.* 20, 45-105.
- 62.- HUANG, K-P. y CABIB, E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3851-3857.
- 63.- HUANG, K-P. y CABIB, E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3858-3861.
- 64.- STEINER, D.F.; YOUNGER, L. y KING, J. (1965) *Biochemistry* 4, 740-751.
- 65.- KILLILEA, S.D. y WHELAN, W.J. (1976) *Biochemistry* 15, 1349-1356.
- 66.- LIN, D.C. y SEGAL, H.L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7007-7011.
- 67.- TAN, A.W.H. y NUTTALL, F.Q. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 9624-9630.
- 68.- CAMICI, M.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9898-9901.
- 69.- BAHNAK, B.R. y GOLD, A.H. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 492-503.
- 70.- BAHNAK, B.R. y GOLD, A.H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 332-339.
- 71.- CIUDAD, C.J.; CAMICI, M.; AHMAD, Z.; WANG, Y.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1984) *Eur. J. Biochem.* 142, 511-520.
- 72.- ARIÑO, J.; MOR, A.; BOSCH, F.; BAANANTE, I.V. y GUINOVRT, J.J. (1984) *FEBS Letters* 170, 310-314.
- 73.- AKATSUKA, A.; SINGH, T.J.; NAKABAYASHI, H.; LIN, M.C. y HUANG, K-P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3239-3242.
- 74.- TAN, A.W.H. y NUTTALL, F.Q. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4751-4757.
- 75.- CIUDAD, C.J.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 804, 261-263.
- 76.- RULFS, J.; WOLLEBEN, C.B.; MILLER, T.B. y JOHNSON, G.L. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 1203-1207.
- 77.- KASLOW, H.R. y LESIKAR, D.D. (1984) *FEBS Letters* 172, 294-298.

- 78.- KASLOW, H.R.; LESIKAR, D.D; ANTWI, D. y TAN, A.W.H. (1985) J. Biol. Chem. 260, 9953-9956.
- 79.- WITITSUWANNAKUL, D. y KIM, K.H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3562-3569.
- 80.- BAHNAK, B.R. y GOLD, A.H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8775-8780.
- 81.- KHANDELWAL, R.L.; ENNO, T.L. y NARAYANAN, N. (1984) Mechanisms of Ageing and Development 28, 13-22.
- 82.- MARGOLIS, R.N. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 1215-1221.
- 83.- HIKEN, J.F. y LAWRENCE jr., J.L. (1984) FEBS Letters 175, 55-58.
- 84.- HUANG, K-P.; HUANG, F.L.; GLINSMANN, W.H. y ROBINSON, J.C. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 173, 162-170.
- 85.- ROACH, P.J.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y LARNER, J. (1978) J. Cyclic Nucleotide Res. 4, 245-257.
- 86.- DE PAOLI-ROACH, A.A.; ROACH, P.J. y LARNER, J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 12062-12068.
- 87.- CORI, G.T. y GREEN, A.A. (1943) J. Biol. Chem. 151, 31-38.
- 88.- WOSILAIT, W.D. y SUTHERLAND, E.W. (1955) J. Biol. Chem. 218, 469-481.
- 89.- SUTHERLAND, E.W. y WOSILAIT, W.D. (1955) Nature (London) 175, 169-170.
- 90.- FRIEDMANN, D.L. y LARNER, J. (1963) Biochemistry 2, 669-675.
- 91.- INGEBRITSEN, T.S. y COHEN, P. (1983) Science 221, 331-338.
- 92.- COHEN, P. (1978) Curr. Top. Cell. Regul. 14, 117-196.
- 93.- INGEBRITSEN, T.S. y COHEN, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 255-262.
- 94.- INGEBRITSEN, T.S.; FOULKES, J.G. y COHEN, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 263-274.
- 95.- PATO, M.F.; ADELSTEIN, R.S.; CROUCH, D.B.; SAFER, T.S.; INGEBRITSEN, T.S. y COHEN, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 283-288.
- 96.- STEWART, A.A.; INGEBRITSEN, T.S. y COHEN, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 289-296.

- 97.- YANG, S.D.; VANDENHEEDE, J.R.; GORIS, J. y MERLEVEDE, W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11759-11767.
- 98.- VANDENHEEDE, J.R.; YANG, S.D.; GORIS, J. y MERLEVEDE, W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11768-11774.
- 99.- HEMMINGS, B.A.; RESINK, T.J. y COHEN, P. (1982) *FEBS Letters* 150, 319-324.
- 100.- STRALFORS, P.; HIRAGA, A. y COHEN, P. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 295-303.
- 101.- DE PAOLI-ROACH, A.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 12144-12152.
- 102.- DE PAOLI-ROACH, A.A. y LEE, F-T (1985) *FEBS Letters* 183, 423-429.
- 103.- AITKEN, A.; BILHAM, T. y COHEN, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 126, 235-246.
- 104.- TUNG, H.Y.L.; ALEMANY, S. y COHEN, P. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148, 253-263.
- 105.- STEWART, A.A.; INGEBRITSEN, T.S.; MANALAN, A.; KLEE, C.B. y COHEN, P. (1982) *FEBS Letters* 137, 80-84.
- 106.- TUNG, H.Y.L.; RESINK, T.J.; HEMMINGS, B.A.; SHENOLIKAR, S. y COHEN, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 138, 635-641.
- 107.- TUNG, H.Y.L.; PELECH, S.; FISHER, M.J.; POGSON, C.I. y COHEN, P. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 305-313.
- 108.- KLEE, C.B.; CROUCH, T.H. y KRINKS, M.A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6260-6273.
- 109.- WALLACE, R.W.; TALLANT, E.A. y CHEUNG, W.Y. (1980) *Biochemistry* 19, 1831-1837.
- 110.- TONKS, N.K. y COHEN, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 65-70.
- 111.- MIESKES, G. y SÖLING, H.D. (1985) *FEBS Letters*, 181, 7-11.
- 112.- PRATT, M.L.; MAHER, J.F. y ROCHE, T.E. (1982) *Eur. J. Biochem.* 125, 349-355.
- 113.- HUNTER, T. (1982) *Trends in Biochem. Sci.* 7, 246-249.
- 114.- FOULKES, J.G.; ERICKSON, E. y ERICKSON, R.L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 431-438.
- 115.- INGEBRITSEN, T.S.; STEWART, A.A. y COHEN, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 297-307.

- 116.- SIMO, A. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1985.
- 117.- TAN, A.W.H. y NUTTALL, F.Q. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 139-150.
- 118.- LALOUX, M.; STALMANS, W. y HERS, H.G. (1978) *Eur. J. Biochem.* 92, 15-24.
- 119.- LIN, D.C.; SEGAL, H.L. y MASSARO, E.J. (1972) *Biochemistry* 11, 4466-4471.
- 120.- SHEORAIN, S.V.; KHATRA, B.S. y SODERLING, T.R. (1981) *FEBS Letters* 127, 94-96.
- 121.- SHEORAIN, S.V.; KHATRA, B.S. y SODERLING, T.R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3462-3467.
- 122.- CHIASSON, J.L.; AYLWARD, J.H.; SHIKAMA, H. y EXTON, J.H. (1981) *FEBS Letters* 127, 97-100.
- 123.- WHING, R.J.; SHIKAMA, H. y EXTON, J.H. (1981) *FEBS Letters* 134, 185-188.
- 124.- KASLON, H.R.; EICHNER, R.D. y MAYER, S.E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4674-4677.
- 125.- TITANI, K.; KOIDE, K.; HERMANN, J.; ERICSSON, L.H.; KUMAR, S.; WADE, R.D.; WALSH, K.A.; NEURATH, H. y FISCHER, E.H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4762-4766.
- 126.- GRAVES, B.J. y WANG, J.H. (1972) *The Enzymes* 7, 435-482.
- 127.- ULLMANN, A.; VAGELOS, P.R. y MONOD, J. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 86-91.
- 128.- STALMANS, W. y HERS, H.G. (1975) *Eur. J. Biochem.* 54, 341-350.
- 129.- HENION, W.F. y SUTHERLAND, E.W. (1957) *J. Biol. Chem.* 224, 477-488.
- 130.- SCHLISELFELD, L.H.; DAVIS, C.H. y KREBS, E.G. (1970) *Biochemistry* 9, 4959-4965.
- 131.- STALMANS, W.; DE WULF, H. y HERS, H.G. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 582-587.
- 132.- MADDAIAH, V.T. y MADSEN, N.B. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3873-3881.
- 133.- FISCHER, E.H.; HEILMEYER, L.M.G. y HASCHKE, R.H. (1971) *Curr. Top. Cell. Regul.* 4, 211-251.
- 134.- TAN, A.W.H. y NUTTALL, F.Q. (1975) *Biochim. Biophys Acta* 410, 45-60.

- 135.- KOBAYASHI, M. y GRAVES, D.J. (1982) *Anal. Biochem.* 122, 94-99.
- 136.- SCHLENDER, K.K.; WEI, S. y VILLAR PALASI, C. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 272-278.
- 137.- WALSH, D.A.; ASHBY, C.D.; GONZALEZ, C.; CALKINS, D.; FISCHER, E.H. y KREBS, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1977-1981.
- 138.- CARMICHAEL, D.F.; GEAHLEN, R.L.; ALLEN, S.M. y KREBS E.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10440-10445.
- 139.- HEMMINGS, B.A.; AITKEN, A.; COHEN, P; RYMOND, M. y HOFMANN, F. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 473-478.
- 140.- COHEN, P. (1980) en "Molecular Aspects of Cellular Regulation" (Cohen, P. ed.) vol. 1, 255-268, Elsevier, Amsterdam.
- 141.- DE LANGE, R.J.; KEMP, R.G.; RILEY, W.D.; COOPER, R.A. y KREBS, E.G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2200-2208.
- 142.- HUANG, T.S.; BYLUND, D.B.; STULL, J.T. y KREBS, E.G. (1974) *FEBS Letters* 42, 249-252.
- 143.- CHRISMAN, T.D.; JORDAN, J.E. y EXTON, J.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10798-10801.
- 144.- DICKNEITE, G.; JENNISEN, H.P. y HEILMEYER, L.M.G. (1978) *FEBS Letters* 87, 297-302.
- 145.- SINGH, T.J.; AKATSUKA, A.; HUANG, K-P; SHARMA, R.K.; TAM, S.W. y WANG, J.H. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 676-683.
- 146.- WANG, S.H.; STULL, J.T.; HUANG, T.S. y KREBS, E.G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4521-4527.
- 147.- AHMAD, Z.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8348-8355.
- 148.- WOODGETT, J.R.; TONKS, N.K. y COHEN, P. (1982) *FEBS Letters* 148, 5-11.
- 149.- PAYNE, M.E. y SODERLING, T.R. (1984) *Methods in Enzymol.* 99, 299-310.
- 150.- TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; IWASA, Y.; KAWAHARA, Y.; MORI, T. y NISHIZUKA, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3692-3695.
- 151.- KUO, J.F.; ANDERSON, W.B.; WISE, B.C.; MACKERLOVA, L.; SALOMONSSON, I.; BRACKE, N.L.; KATOH, N.; SHOTI, N. y WRENN, R.W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7039-7043.

- 152.- MINAKUCHI, R.; TAKAI, Y.; YU, B. y NISHIZUKA, Y. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)* 89, 1651-1654.
- 153.- KIKKAWA, U.; TAKAI, Y.; MINAKUCHI, R.; INOHARA, S. y NISHIZUKA, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13341-13348.
- 154.- WISE, B.C.; RAYNOR, R.L. y KUO, J.F. (1982) *J. Biol. Chem* 257, 8481-8488.
- 155.- WISE, B.C.; GLASS, D.B.; CHOU, C-H.J.; RAYNOR, R.L.; KATOH, N.; SCHATZMAN, R.C.; TURNER, R.S.; KIBLER, R.F. y KUO, J.F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8489-8495.
- 156.- TAKAI, Y.; YAMAMOTO, M.; INOVE, M.; KISHIMOTO, A. y NISHIZUKA, Y. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 542-550.
- 157.- TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A; INOVE, M.; YAMAMOTO, M. y NISHIZUKA, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7603-7609.
- 158.- CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; SANO, K.; KIKKAWA, U. y NISHIZUKA, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
- 159.- NIEDEL, J.E.; KUHN, L. y VANDERBANK, G.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 36-40.
- 160.- SLABA, T.J.; FISCHER, S.M.; NELSON, F.K. y GLEASON, G.L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3659-3663.
- 161.- FURSTENBERGER, G.; BERRY, D.L.; SORG, B. y MARKS, F. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7722-7726.
- 162.- MIYAKE, R.; TANAKA, Y.; TSUDA, T.; KAIBUCHI, K.; KIKKAWA, U. y NISHIZUKA, Y. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 649-656.
- 163.- KATOH, N.; WISE, B.C. y KUO, J.F. (1983) *Biochem. J.* 209, 189-195.
- 164.- VULLIET, P.R.; WOODGETT, J.R.; FERRARI, S. y HARDIE, D.G. (1985) *FEBS Letters* 182, 335-339.
- 165.- HOFFER, A.W.; SCHLATTER, S. y GRAEFE, M. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 892-897.
- 166.- ZWILLER, J.; REVEL, M-O. y MALVIYA, A.N. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 1350-1353.
- 167.- WITTERS, L.A.; VATER, C.A. y LIENHARD, G.E. (1985) *Nature (London)* 315, 777-778.
- 168.- DAVIS, R.J.; JOHNSON, G.L.; KELLEHER, D.J.; ANDERSON, J.K.; MOLE, J.E. y CZECH, M.P. (1985) *J. Biol. Chem. En prensa.*

- 169.- KUO, J.F.; SCHATZMAN, R.C.; TURNER, R.S. y MAZZEI, G.J. (1984) *Mol. & Cell. Endoc.* 35, 65-73.a
- 170.- HATHAWAY, G.M. y TRAUGH, J.A. (1982) *Curr. Top. Cell. Regul.* 21, 101-127.
- 171.- ITARTE, E. y HUANG, K-P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4052-4057.
- 172.- HATHAWAY, G.M.; TUAZON, P.T. y TRAUGH, J.A. (1984) *Methods in Enzymol.* 99, 308-316.
- 173.- ITARTE, E.; GUASCH, M.D.; VILA, J. y PLANA, M. Comunicación FR-353 al 13th International Congress of Biochemistry (Amsterdam, 1985).
- 174.- HATHAWAY, G.M. y TRAUGH, J.A. (1984) *Methods in Enzymol.* 99, 317-321.
- 175.- DE PAOLI-ROACH, A.A.; AHMAD, Z. y ROACH, P.J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8955-8962.
- 176.- EMBI, N.; RYLATT, D.B. y COHEN, P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 519-527.
- 177.- HEMMINGS, B.A. y COHEN, P. (1984) *Methods in Enzymol.* 99, 337-345.
- 178.- COHEN, P.; YELLOWLESS, D.; AITKEN, A.; DORELLA-DEANA, A.; HEMMINGS, B.A. y PARKER, P.J. (1982) *Eur. J. Biochem.* 124, 21-35.
- 179.- AHMAD, Z.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1985) *FEBS Letters* 179, 96-100.
- 180.- ROBINSON, G.A.; BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W. (1971) en "Cyclic AMP" (Academic Press, NY).
- 181.- RALL, T.W.; SUTHERLAND, E.W. y BERTHED, J. (1957) *J. Biol. Chem.* 228, 463-475.
- 182.- RALL, T.W. y SUTHERLAND, E.W. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 1065-1076.
- 183.- PHOL, S.L.; BIRNBAUMER, L. y RODBELL, M. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1849-1856.
- 184.- HUTSON, N.J.; BRUMLEY, F.T.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.; HARPER, S.C. y EXTON, J.H. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5200-5208.
- 185.- CARDENAS-TANUS, R.J.; HUERTA-BAENA, J. y GARCIA-SAINZ, J.A. (1982) *FEBS Letters* 143, 1-4.
- 186.- MORGAN, N.G.; EXTON, J.H. y BLACKMORE, P.F. (1983) *FEBS Letters* 153, 77-80.

- 187.- MORGAN, N.G.; SHIPP, C.C. y EXTON, J.H. (1983) FEBS Letters 163, 277-281.
- 188.- BOSCH, F. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1985.
- 189.- HEYWORTH, C.M.; WETTON, A.D.; KINSELLA, A.R. y HOUSLAY, M.D. (1984) FEBS Letters 170, 38-42.
- 190.- BIRNBAUM, M.J. y FAIN, J.N. (1977) J. Biol. Chem. 252, 528-535.
- 191.- STUDER, R. y BORLE, B.A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7987-7993.
- 192.- KAWAI, Y. y ARINZE, I.J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4364-4371.
- 193.- ARINZE, I.J. y KAWAI, Y. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 225, 196-202.
- 194.- EXTON, J.H. (1980) Am. J. Physiol. 238, E3-E12.
- 195.- EL-RAFAY, M.F.; BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4375-4386.
- 196.- REINHART, P.H.; TAYLOR, W.M. y BYGRAVE, F.L. (1982) Biochem. J. 208, 619-630.
- 197.- BERRIDGE, M.J. (1981) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14, 289-299.
- 198.- BERRIDGE, M.J.; DAWSON, R.M.C.; DOWNES, C.P.; HESLOP, J.P. e IRVINE, R.F. (1983) Biochem. J. 212, 473-482.
- 199.- BERRIDGE, M.J. (1983) Biochem. J. 212, 849-858.
- 200.- CHAREST, R.; PRPIC, V.; EXTON, J.H. y BLACKMORE, P.F. (1985) Biochem. J. 227, 79-90.
- 201.- GARRISON, J.C.; BORLAND, M.K.; FLORIO, V.A. y TWIBLE, D.A. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7147-7156.
- 202.- KEPPENS, S.; VANDENHEEDE, J.R. y DE WULF, H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 448-457.
- 203.- VAN DE VERVE, G.; HUE, L. y HERS, H.G. (1977) Biochem. J. 162, 135-142.
- 204.- BOCKKINO, S.B.; BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1985) J. Biol. Chem. En prensa.
- 205.- LY, S. y KIM, K-H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11585-11590.
- 206.- MORGAN, N.G.; BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1983) J. Biol. Chem. 258, 5103-5109.

- 207.- STRICKLAND, W.G.; BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1980) *Diabetes* 29, 617-622.
- 208.- McCULLOUGH, T.E. y WALSH, D.A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7336-7344.
- 209.- RAMACHANDRAN, C.; ANGELOS, F.L. y WALSH, D.A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13377-13383.
- 210.- LAWRENCE jr., J.C.; HIKEN, J.F.; DE PAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 10710-10719.
- 211.- HERS, H.G. (1981) en "Short-term regulation of liver metabolism", pp. 105-108. (Hue, L. y Van der Werve, G. ed.) Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 212.- STRICKLAND, W.G.; IMAZU, M.; CHRISMAN, T.D. y EXTON, J.H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5490-5497.
- 213.- CIUDAD, C.J.; BOSCH, F. y GUINOVART, J.J. (1983) en "Isolation, Characterization and Use of Hepatocytes", pp.603-608. (Harris, R.A. y Cornell, N.W. ed.) Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- 214.- ROACH, P.J. y GOLDMAN, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7170-7172.
- 215.- WHITTON, P.D.; RODRIGUES, L.M. y HEMS, D.A. (1978) *Biochem. J.* 176, 893-898.
- 216.- MA, G.Y.; GOVE, C.D. y HEMS, D.A. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5, 986-989.
- 217.- HEMS, D.A. (1977) *FEBS Letters* 80, 237-245.
- 218.- KEPPENS, S. y DE WULF, H. (1976) *FEBS Letters* 68, 279-282.
- 219.- RICHTER, D. (1983) *Trends in Biochem. Sci.* 8, 278-281.
- 220.- KEPPENS, S. y DE WULF, H. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 588, 63-69.
- 221.- KIRK, C.J. y HEMS, D.A. (1974) *FEBS Letters* 47, 128-131.
- 222.- HEMS, D.A.; DAVIES, C.J. y SIDDLE, K. (1978) *FEBS Letters* 87, 196-198.
- 223.- COOPER, R.H.; COLL, K.E. y WILLIAMSON, J.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3281-3288.
- 224.- LYNCH, C.J.; CHAREST, R.; BOCCKINO, S.B.; EXTON, J.H. y BLACKMORE, P.F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2844-2851.
- 225.- MUCHMORE, D.B.; LITTLE, S.A. y HAEN, C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 365-372.

- 226.- STEPHENSON, F.A. y ROGOL, A.D. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 234, 230-234.
- 227.- CZECH, M.P.; MASSAGUE, J. y PILCH, P.F. (1981) Trends in Biochem. Sci. 8, 222-225.
- 228.- SMITH, R.L. y LAWRENCE, J.C. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2201-2207.
- 229.- SHEORAIN, S.V.; JUHL, H.; BASS, M. y SODERLING, T.R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7024-7030.
- 230.- PARKER, P.J.; CAUDWELL, B. y COHEN, P. (1983) Eur. J. Biochem. 130, 227-234.
- 231.- LAWRENCE jr., J.C. y JAMES, C. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7975-7982.
- 232.- NYFELER, F.; FASEL, P. y WALTER, P. (1981) Biochim. Biophys. Acta 675, 17-23.
- 233.- BLACKMORE, P.F.; ASSIMACOPOULUS-JEANNET, F.; CHAN, T.M. y EXTON, J.H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2828-2834.
- 234- WALKENBACH, R.J.; HAZEN, R. y LARNER, J. (1977) Mol. Cell. Biochem. 19, 31-41.
- 235.- WALKENBACH, R.J.; HAZEN, R. y LARNER, J. (1980) Biochim. Biophys. Acta. 629, 421-30.
- 236.- GABBAY, R.A. y LARDY, H.A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 6052-6055.
- 237.- BHATTACHAYA, G. (1961) Biochem. J. 79, 369-373.
- 238.- CLAUSEN, T. (1968) Biochim. Biophys. Acta 150, 66-70.
- 239.- HAUGAARD, E.S.; SERLICK, E. y HAUGAARD, N. (1973) Biochem. Pharmacol. 22, 1023-1027.
- 240.- HAUGAARD, E.S.; MICKEL, R.A. y HAUGAARD, N. (1974) Biochem. Pharmacol. 23, 1675-1685.
- 241.- VILLAR PALASI, C. y LARNER, J. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 94, 436-442.
- 242.- SHEN, L.C.; VILLAR PALASI, c. y LARNER, J. (1970) Physiol. Chem. Physics 2, 536-541.
- 243.- HORN, R.S.; WALAAS, O. y WALAAS, E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 313, 296-301.
- 244.- CHENG, K.; CREALY, S. y LARNER, J. (1983) Mol. Cell. Biochem. 56, 177-182.
- 245.- NYFELER, F. y WALTER, P. (1979) FEBS Letters 108, 197-199.

- 246.- ALLISON, J.H. y STEWART, M.A. (1971) *Nature* (London) 233, 267-268.
- 247.- ALLISON, J.H.; BLISNER, M.E.; HOLLAND, W.H.; HIPPS, P.P. y SHERMAN, W.R. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 664-670.
- 248.- HALLCHER, L.M. y SHERMAN, W.R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10895-10901.
- 249.- BERRIDGE, M.J.; DONNES, C.P. y HANLEY, M.R. (1982) *Biochem. J.* 206, 587-595.
- 250.- BURGESS, G.M.; GODFREY, P.P.; MCKINNEY, J.S.; BERRIDGE, M.J.; IRVINE, R.F. y PUTNEY, J.W. (1984) *Nature* (London) 309, 63-66.
- 251.- RAMASARMA, T. y CRANE, F.L. (1981) *Curr. Top. Cell. Regul.* 20, 347-401.
- 252.- TOLMAN, E.L.; BARRIS, E.; BURNS, M.; PANSINI, A. y PARTRIDGE, R. (1979) *Life Sci.* 25, 1159-1164.
- 253.- TAMURA, S.; BROWN, T.A.; DUBLER, R.E. y LARNER, J. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 80-86.
- 254.- TAMURA, S.; BROWN, T.A.; WHIPPLE, J.H.; FUJITA-YAMAGUCHI, Y.; DUBLER, R.E.; CHENG, K. y LARNER, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6650-6658.
- 255.- KRAWEITZ, W.; WERDEN, K. y ERDMANN, G. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 2517-2522.
- 256.- DUBYAK, G.R. y KLEIN ZELLER, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5306-5312.
- 257.- MACHICAO, F.; URUMOW, T. y WIELAND, O.H. (1983) *FEBS Letters* 163, 76-80.
- 258.- KOWALSKI, A.; GAZZANO, H.; FEHLMANN, M. y VAN OBBERGHEN, E. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 885-893.
- 259.- CATALAN, R.E.; MARTINEZ, A.M. y ARAGONES, M.D. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 672-677.
- 260.- SCHWABE, U.; PUCHTEIN, C.; HANNEMANN, H. y SOCHTIG, E. (1979) *Nature* (London) 277, 143-145.
- 261.- GRUPP, G.; GRUPP, I.; JOHNSON, C.L.; WALLICK, E.T. y SCHWARTZ, A. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 440-447.
- 262.- DIAMOND, L.; O'BRIEN, T.G. y BAIRD, W.M. (1980) *Adv. Cancer. Res.* 32, 1-8.

- 263.- LEE, L.E. y WEINSTEIN, I.B. (1979) *J. Cell. Physiol.* 99, 451-460.
- 264.- OUCHI, K. y LEVINE, L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4783-4790.
- 265.- HUBERMAN, E.; WEEKS, L.; HERMAN, A.; CALLAHAN, M. y SLAGA, T. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1062-1066.
- 266.- LEE, L.S. y WEINSTEIN, I.B. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5168-5172.
- 267.- BROWN, D.; DICKER, P. y ROZENGURT, E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 1037-1043.
- 268.- SHOYAB, M.; DELARCO, J.E. y TODARO, G.F. (1979) *Nature (London)* 279, 387-391.
- 269.- FRIEDMAN, B.; FRACKELTON jr., A.R.; ROSS, A.H.; CONNORS, J.M.; FIJIKI, H.; SIGIMURA, T. y ROSNER, M.R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3034-3038.
- 270.- COCHET, C.; GILL, G.N.; MEISENHOLDER, J.; COOPER, J.A. y HUNTER, T. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2553-2558.
- 271.- McCAFFREY, P.G.; FRIEDMAN, B. y ROSNER, M.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 12502-12507.
- 272.- SKOGLUND, G.; HANNSON, A. e INGELMAN-SUNDBERG, M. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148, 407-412.
- 273.- VAARTJES, W.J. y DE HAAS, C.G.M. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 721-726.
- 274.- CORVERA, S. y GARCIA-SAINZ, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128-1133.
- 275.- FAIN, J.N.; LI, S-Y.; LITOSCH, I. y WALLACE, M. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 88-94.
- 276.- VAN DER WERVE, G.; PROIETTO, J. y JEANRENAUD, B. (1985) *Biochem. J.* En prensa.
- 277.- NYBORG, J. y LACOUR, T. (1975) *Nature (London)* 257, 224-225.
- 278.- SHOYAB, M. y TODARO, G.J. (1980) *Nature (London)* 288, 451-455.
- 279.- BERNFELD, P. (1950) *Methods in Enzymol.* 1, 149-158.
- 280.- BEAVO, J.A.; BECHTEL, P.J. y KREBS, E.G. (1974) *Methods in Enzymol.* 38, 299-308.
- 281.- ITARTE, E.; MOR, A.; SALAVERT, A.; PENA, J.M.; BERTOMEU, J.F. y GUINOVART, J.J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 658, 334-347.

- 282.- HOWARD, R.B.; CHRISTENSEN, A.K.; GIBBS, F.A. y PESCH, L.A. (1967) J. Cell. Biol. 35, 675.
- 283.- BERRY, M.N. y FRIEND, D.S. (1969) J. Cell. Biol. 43, 506-520.
- 284.- INGEBRETSEN jr., W.R. y WAGLE, S.R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 403-410.
- 285.- CHRISTOFFERSEN, T. y BERG, T. (1974) Biochim. Biophys. Acta 338, 408-417.
- 286.- HANKS, J.H. y WALLACE, R.E. (1949) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196.
- 287.- PATTERSON, M.K. (1979) Methods in Enzymol. 58, 141-152.
- 288.- "Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies" (Taber, J.M.; Söling, H.D. y Williamson, J.R. ed.) North Holland Pub. Co. Amsterdam, 1976.
- 289.- THOMAS, J.A.; SCHLENDER, K.K. y LARNER, J. (1968) Anal. Biochem. 25, 486-499.
- 290.- GUINOVRT, J.J.; SALAVERT, A.; MASSAGUE, J.; CIUDAD, C.J.; SALSAS, E. E ITARTE, E. (1979) FEBS Letters 106, 284-288.
- 291.- GILBOE, D.P.; LARSON, K.L. y NUTTALL, F.Q. (1972) Anal. Biochem. 47, 20-27.
- 292.- "Methods in Enzymatic Analysis", vol.4, pp. 2101-2109. (Bergmeyer, H.V. ed.) Academic Press, NY, 1974.
- 293.- ENGLAND, P.J. y WALSH, D.A. (1976) Anal. Biochem 75, 429-432.
- 294.- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.S. y DAVID, H.M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751.
- 295.- LAYNE, E. (1957) Methods in Enzymol. 3, 450.
- 296.- LAEMMLI, U.K. (1970) Nature (London) 227, 680.
- 297.- GROSS, E. (1967) Methods in Enzymol. 9, 238-255.
- 298.- COOPER, J.A.; BARTHOLOMEW, M.S. y HUNTER, T. (1983) Methods in Enzymol. 99, 387-402.
- 299.- CUATRECASAS, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3059-3065.
- 300.- CUATRECASAS, P. y PARIKH, I. (1972) Biochemistry 11, 2291-2299.
- 301.- SHALTIEL, S. y ER-EL, Z. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 778-781.

- 302.- WALSETH, J.D. y JOHNSON, R.A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 526, 11-31.
- 303.- PALMER, J.L. y AVRUCH, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 372-373.
- 304.- TAN, A.W.H. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 582, 543-547.
- 305.- PARKER, P.J.; EMBI, N.; CAUDWELL, F.B. y COHEN, p. (1982) *Eur. J. Biochem.* 124, 47-55.
- 306.- GARRISON, J.C. y WAGNER, J.D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13135-13143.
- 307.- CLAUS, T.H.; SCHLUMPF, J.R.; EL-MAGRABI, M.R.; PILKIS, J. y PILKIS, S.J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6501-6505.
- 308.- BRAND, A.; GOTTFRIED, M. y SÖLING, H-D. (1983) *FEBS Letters* 154, 65-69.
- 309.- McCULLOUGH, T.E. y WALSH, D.A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7345-7352.
- 310.- ASHENDEL, C.L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 822, 219-242.
- 311.- ROACH, P.J. (1984) *Methods in Enzymol.* 107, 81-101.