



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en el teixit muscular de mamífer

Anna Maria Bassols Teixidó



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

N² Reg: 740.298

GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT I GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT
FOSFATASA EN EL TEIXIT MUSCULAR DE MAMÍFER

ANNA M. BASSOLS TEIXIDÓ

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082935

FIGURA 7. EFECTE DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT
SOBRE LA INHIBICIÓ PER FRUCTOSA 1,6-BISFOSFAT
DE LA FOSFOGLUCOMUTASA

L'activitat fosfoglucomutasa es va determinar en presència de glucosa 1-fosfat 50 μM i diverses concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat.

La concentració de fructosa 1,6-bisfosfat era:
(●) 0 μM , (▲) 50 μM , (Δ) 100 μM , (○) 250 μM , (▼) 500 μM , (∇) 750 μM i (□) 1 mM.

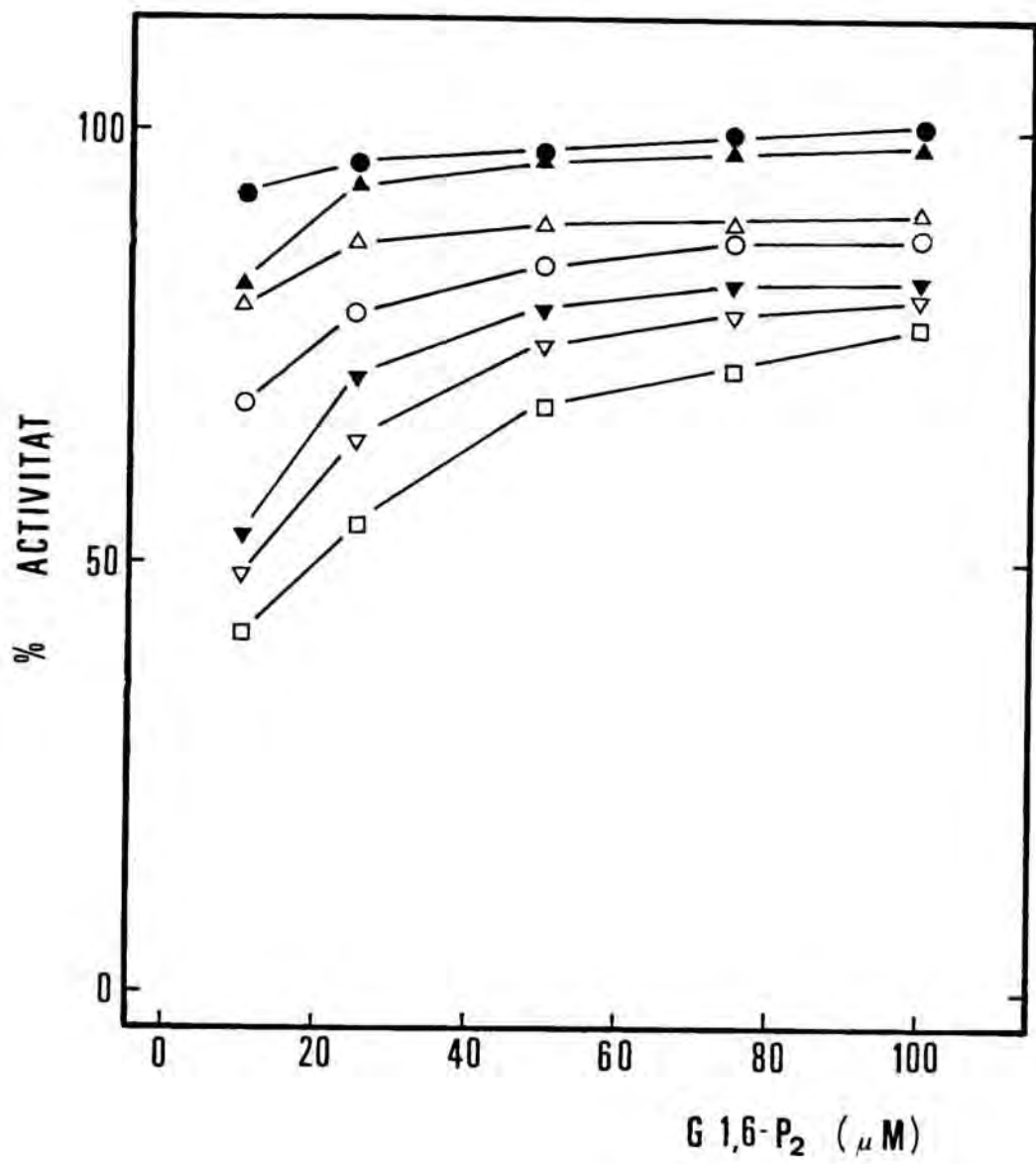
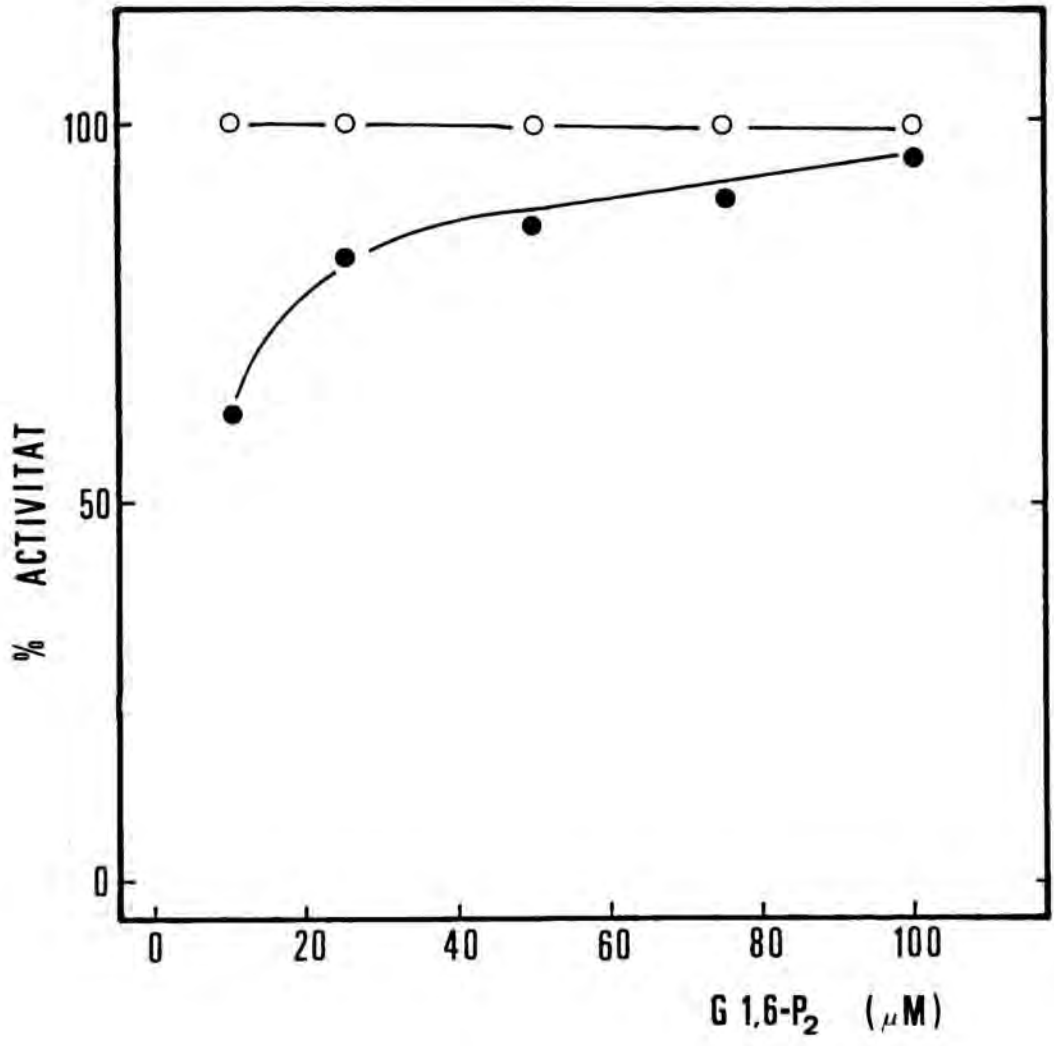


FIGURA 8. EFECTE DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT
SOBRE LA INHIBICIÓ DE LA FOSFOGLUCOMUTASA PER
DIVERSOS METABÒLITS

L'activitat fosfoglucomutasa es va determinar en presència de glucosa 1-fosfat 50 μ M i diverses concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat. Es trobaven presents a l'assaig els següents inhibidors: fructosa 1,6-bisfosfat 1 mM, ATP 5 mM, 3-fosfoglicerat 0,5 mM i fosfoenolpiruvat 50 μ M.

(○) Control. (●) Amb inhibidors.



3.1.4. DETERMINACIÓ DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT, FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT I ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES RELACIONADES EN DIVERSOS TIPUS DE MÚSCULS

Com ja s'ha comentat en la Introducció, els diferents músculs es diferencien marcadament segons la seva composició de fibres i les seves característiques metabòliques.

Es van determinar per aquesta raó els continguts de glucosa 1,6-bisfosfat i fructosa 2,6-bisfosfat, ambdós reguladors del metabolisme de carbohidrats, en diferents tipus de músculs, així com les activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i fosfofructoquinasa-2. També es va determinar el contingut de glicogen i de tres activitats enzimàtiques responsables del metabolisme de la glucosa (sanguínia o procedent del glicogen): fosfofructoquinasa, fosfoglucomutasa i glicògeno-fosforilasa.

Els tipus musculars escollits van ésser, tal com s'especifica a l'apartat 2.8.: soleus (85% fibres I), extensor digitorum longus o E.D.L. (90% fibres tipus IIb), gastrocnemius (fibres IIa i IIb) i diafragma (20% fibres I, 60% fibres IIa i 20% fibres IIb). La dissecció i obtenció dels diferents músculs es va fer segons s'explica a l'apartat 2.8.2. i els teixits, immediatament congelats amb nitrògen líquid, es van conservar a -80°C fins el moment de les extraccions.

Les extraccions dels teixits es van fer segons es

descriu a l'apartat 2.6.2. Es van fer quatre tipus d'extracte a partir de cada múscul, destinats a la determinació dels diferents metabòlits i enzims: un extracte àcid per a la determinació de glucosa 1,6-bisfosfat, un extracte alcalí per a la determinació de fructosa 2,6-bisfosfat, una digestió amb KOH concentrada per a la determinació del glicogen i un extracte neutre per a la determinació d'activitats enzimàtiques i de proteïna.

La determinació de les activitats enzimàtiques es va fer immediatament després d'una diàlisi ràpida contra una solució de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic, excepte la fosfofructoquinasa, que es va protegir adequadament a causa de la seva gran inestabilitat (apartat 2.6.2.). L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es va determinar mitjançant el mètode radioactiu descrit a l'apartat 2.3.1.3.. La concentració de proteïnes es va determinar segons el mètode del Biuret.

La figura 9 i la taula 5 mostren els resultats obtinguts en quant a la determinació de metabòlits (glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat i glicogen). Com es pot veure, hi ha una diferència significativa entre els continguts del soleus (el múscul amb característiques més oxidatives) i l'extensor llarg dels dits (el més glicolític). En els tres casos es pot veure com l'E.D.L. té un contingut més alt d'ambdós metabòlits bisfosforilats i de glicogen, d'acord amb el seu metabolisme basat especialment en la glicòlisi anaeròbia. El soleus, en canvi, té el contingut més

baix dels tres compostos i els músculs de composició mixta tenen un nivell de glucosa 1,6-bisfosfat i de glicogen intermig, mentre que la fructosa 2,6-bisfosfat no segueix un patró tan exacte.

Els resultats obtinguts en la determinació d'activitats enzimàtiques es mostren a la taula 6. S'han de destacar els nivells molt baixos d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i de fosfofructoquinasa-2, sense que hi hagin diferències significatives entre els diferents tipus musculars excepte el contingut en fosfofructoquinasa-2 del soleus, que és més petit que en els altres músculs.

La fosfoglucomutasa no mostra grans diferències, encara que és també el soleus el que conté activitats més baixes. El mateix passa amb la glicògeno fosforilasa, ja que les activitats en el soleus són 10 cops més baixes que en l'E.D.L.. En quant a la fosfofructoquinasa, el soleus torna a ésser el múscul que conté una activitat més baixa, mentre que l'E.D.L. i el gastrocnemius són els que mostren les activitats més elevades.

FIGURA 9. NIVELLS DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT,
FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT I GLICOGEN EN DIFERENTS
TIPUS DE MÚSCULS

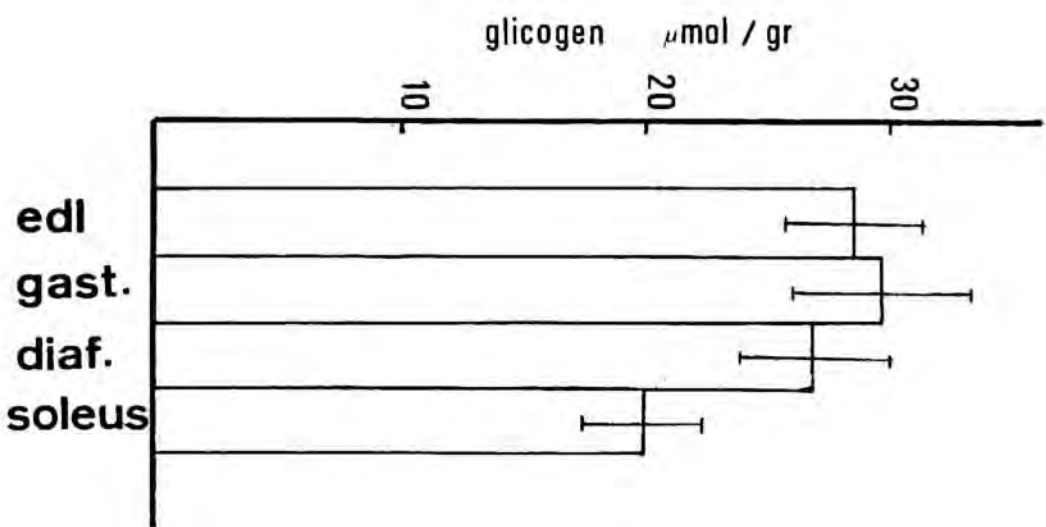
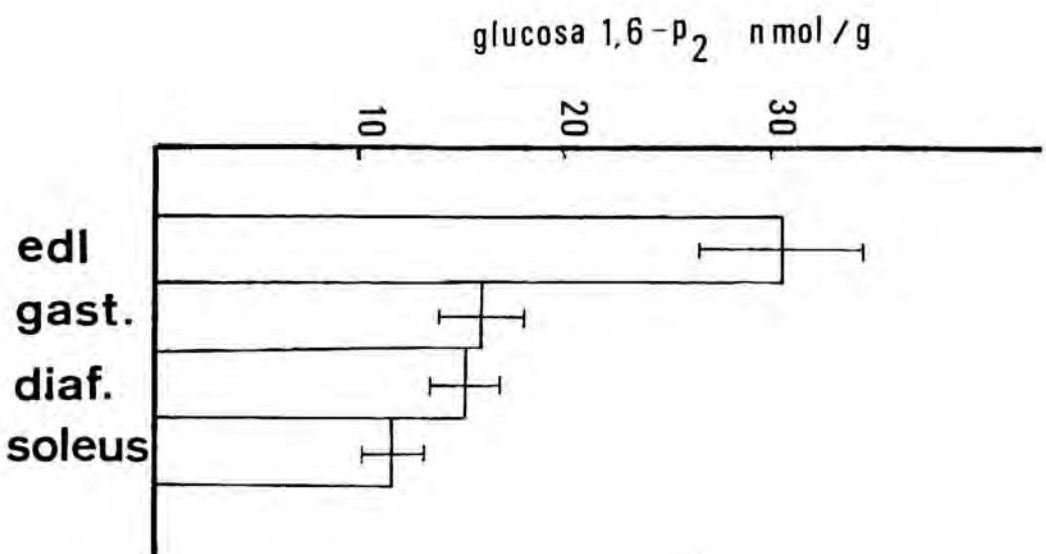
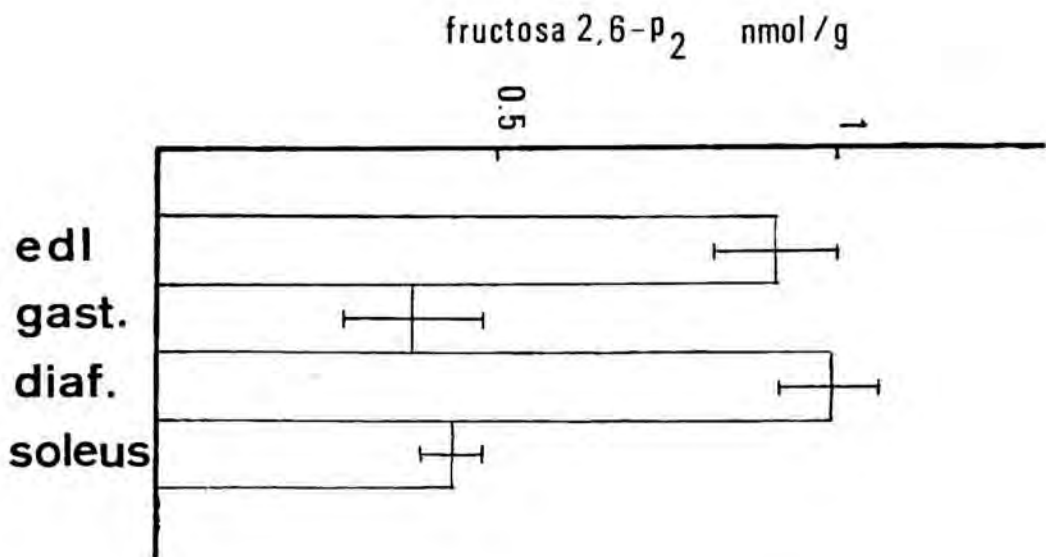
Els músculs escollits van ésser:

E.D.L.: extensor llarg dels dits.

Gast.: gastrocnemius.

Diaf.: diafragma.

Soleus.



TAULA 5. NIVELLS DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT,
FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT I GLICOGEN EN DIFERENTS
TIPUS DE MÚSCULS

Els resultats es donen en nmols/g de teixit,
excepte el glicogen (μ mols glucosa/g). Es
mostren les mitges \pm s.e.m.

	FRUCTOSA 2,6-P ₂	GLUCOSA 1,6-P ₂	GLICOGEN
EXTENSOR LLARG DELS DITS	0,907 ± 0,093 (n = 11)	31,96 ± 4,23 (n = 12)	28,55 ± 2,94 (n = 16)
GASTROCNEMIUS	0,374 ± 0,106 (n = 4)	14,32 ± 1,94 (n = 15)	29,78 ± 3,72 (n = 9)
DIAFRAGMA	0,988 ± 0,076 (n = 12)	15,25 ± 1,60 (n = 12)	27,00 ± 3,16 (n = 8)
SOLEUS	0,434 ± 0,045 (n = 11)	11,80 ± 1,49 (n = 12)	20,00 ± 2,55 (n = 14)

TAULA 6. NIVELLS D'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-
BISFOSFAT FOSFATASA, FOSFOFRUCTOQUINASA-2,
FOSFOFRUCTOQUINASA-1, FOSFOGLUCOMUTASA I
GLICOGENO - FOSFORILASA EN DIFERENTS TIPUS DE
MÚSCULS

Es mostren les mitges \pm s.e.m.

	G 1,5-P ₂ fosfatasa (mU/mg)	GLICÓGENO FOSFORILASA (U/g)	FOSFOGLUCOMUTASA (U/g)	PFK-1 (U/g)	PFK-2 (U/g)
SOLEUS	8,59 ± 1,10	4,84 ± 0,62	21,68 ± 1,52	14,32 ± 0,90	13,85 ± 2,10
DIAPHRAGMA	10,38 ± 1,18	15,12 ± 1,01	26,68 ± 1,02	37,07 ± 4,46	26,42 ± 2,09
GASTROCNEMIUS	8,91 ± 0,68	46,73 ± 3,76	30,01 ± 0,73	82,30 ± 5,71	23,00 ± 1,31
E. D. L.	6,23 ± 0,76	36,86 ± 4,79	29,52 ± 1,73	76,37 ± 5,18	25,29 ± 2,51

3.2. DISSENY I POSADA A PUNT D'UN MÈTODE RADIOACTIU PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA

La determinació d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa per el mètode basat en la determinació del fosfat alliberat presentava problemes a causa de la seva manca de sensibilitat. De manera anàloga, el mètode espectrefotomètric que determinava la desaparició del substrat, la glucosa 1,6-bisfosfat, també era problemàtic degut a la variabilitat de les mesures. Per aquestes raons, ens vem proposar posar a punt una tècnica radioactiva de mesura de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, que ens permetés la determinació correcta de l'activitat tant durant el procés de la purificació com en experiments "in vivo".

Es va dissenyar un mètode que utilitzava com a isòtop el carboni 14. La mesura de l'activitat fosfatasa es fonamentava en la quantificació del producte de la reacció o bé de la desaparició del substrat.

Es requeria la posada a punt de les següents fases:

- 1- Síntesi de la $[U^{14}C]$ -glucosa 1,6-bisfosfat.
- 2- Purificació de la $[U^{14}C]$ -glucosa 1,6-bisfosfat sintetitzada.
- 3- Separació i quantificació de la glucosa 1,6-bisfosfat i de les glucoses monofosfat productes de la reacció.

3.2.1. SÍNTESI DE LA [U¹⁴C]-GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT

La síntesi es fonamenta en la capacitat que té la fosfofructoquinasa per a sintetitzar glucosa 1,6-bisfosfat quan utilitza glucosa 1-fosfat com a substrat i ATP com a donador de fosfats (2,144,145).

L'ATP és un conegut inhibidor al·lostèric de l'enzim i per tant s'ha de mantenir a concentracions baixes a fi d'obtenir un rendiment òptim. Hi han dues possibilitats: adicionar quantitats petites d'ATP a temps discrets per impedir la inhibició o bé incloure en el sistema una font de regeneració d'ATP.

Les primeres proves, encaminades a veure si el mètode tenia possibilitats, es van fer adicionant ATP a temps discrets. La mescla d'incubació contenia: trietanolamina 50 mM, EDTA 5 mM, acetat magnèsic 8 mM, glucosa 1-fosfat 50 mM i fosfofructoquinasa 0,1 mg/ml. La incubació es realitzava a 30°C i s'adicionaven 10 µl d'ATP 100 mM per cada ml de mescla d'incubació cada 15 minuts. A la figura 10 es representa la síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat en funció del temps d'incubació.

En vista de que els resultats demostraven la utilitat del sistema com a mètode de síntesi "in vitro" de glucosa 1,6-bisfosfat, es va incorporar un sistema de regeneració d'ATP, que permetés optimitzar al màxim el rendiment de la reacció.

FIGURA 10. SÍNTESI DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT
PER ACCIÓ DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA

La mescla d'incubació contenia: trietanolamina
50 mM, EDTA 5 mM, acetat magnèsic 8 mM,
glucosa 1-fosfat 50 mM i fosfofructoquinasa
0,1 mg/ml. Cada 15 minuts s'hi adicionaven 10
 μ l d'ATP 100 mM.

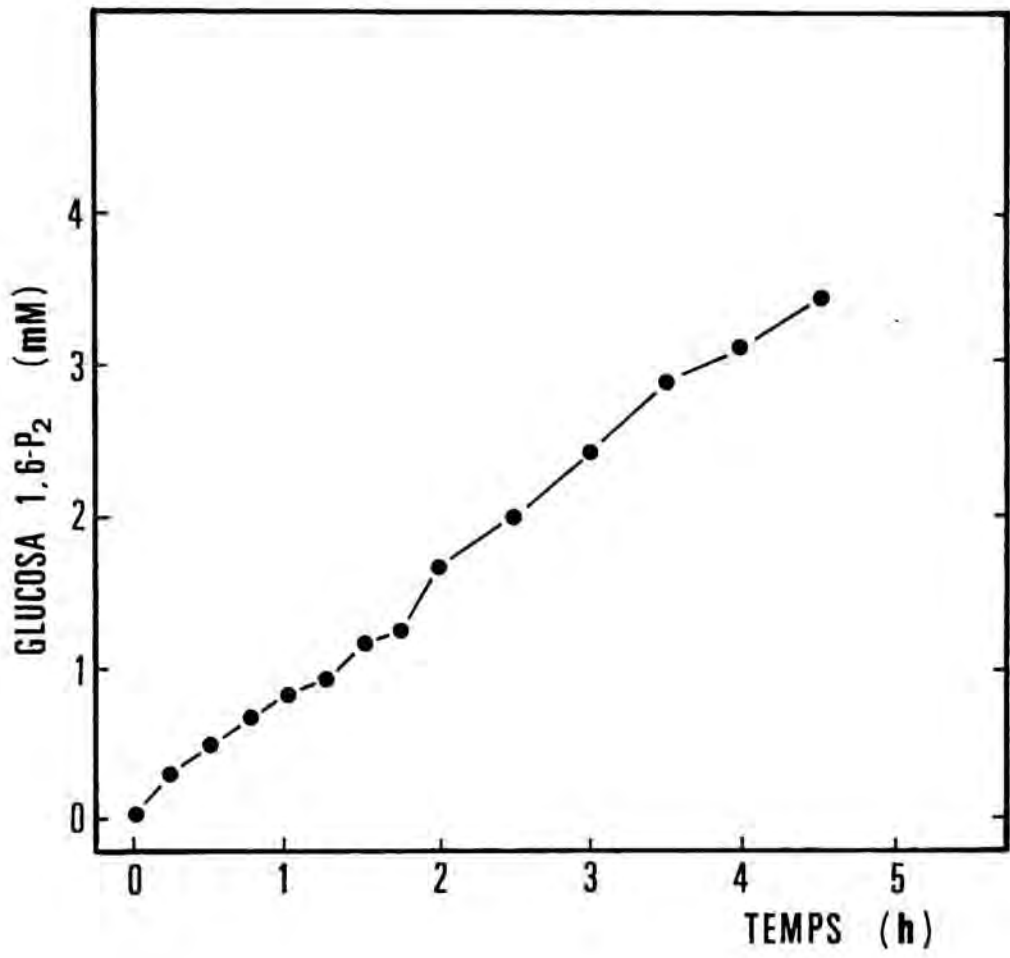
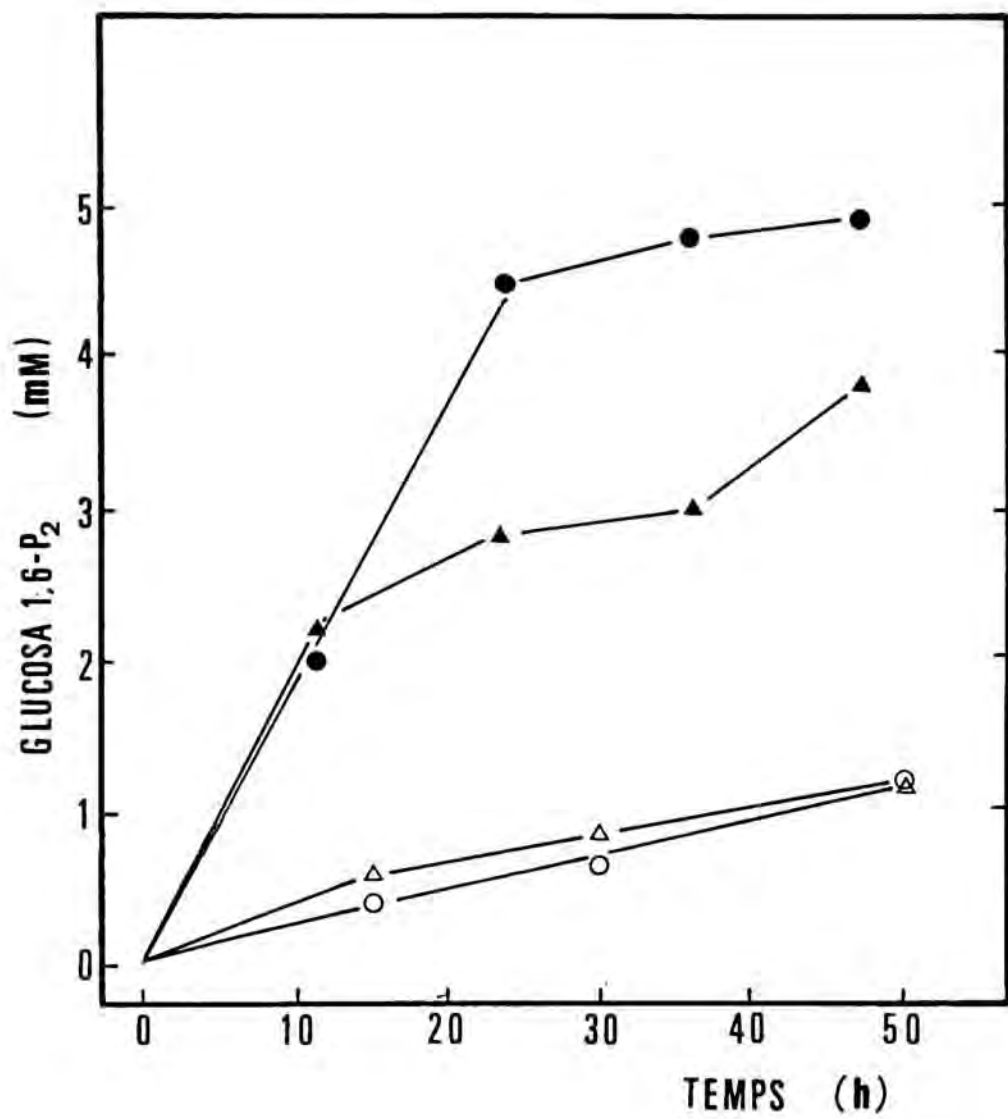


FIGURA 11. SÍNTESI DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT PER ACCIÓ DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA AMB UN SISTEMA DE REGENERACIÓ D'ATP. EFECTE DE LA TEMPERATURA D'INCUBACIÓ

La mescla d'incubació contenia els mateixos components que a l'anterior figura. En el cas del sistema basat en la reacció de la piruvat quinasa (Δ , \blacktriangle) s'hi afegien ATP 0,2 mM, fosfoenolpiruvat 5 mM i piruvat quinasa 0,5 mg/ml. En el cas del sistema de la mioquinasa (\circ , \bullet) s'hi afegien ATP 1 mM, ADP 20 mM i mioquinasa 0,4 mg/ml. La temperatura d'incubació va ésser: (\circ , Δ) 20°C, (\bullet , \blacktriangle) 37°C.



El primer mètode utilitzat va ésser el sistema basat en la reacció de la piruvat quinasa. La mescla d'incubació constava dels mateixos components de l'apartat anterior i d'ATP 0,2 mM, fosfoenolpiruvat 5 mM i piruvat quinasa 0,5 mg/ml. Els primers resultats van ésser satisfactoris, doncs el rendiment de la síntesi respecte a la concentració d'ATP + PEP va ésser quasi del 90%. Malgrat aquest fet, posteriorment es va presentar un problema degut a la dificultat de separar de manera adequada el fosfoenolpiruvat de la glucosa 1,6-bisfosfat sintetitzada mitjançant la cromatografia de bescanvi iònic utilitzada.

Es va provar aleshores un altre sistema de regeneració de l'ATP que no presentava aquest problema. Es va incorporar el sistema de la mioquinasa, l'enzim que interconverteix els nucleòtids d'adenina. La separació dels nucleòtids i dels sucres fosforilats es pot fer de manera senzilla mitjançant el tractament de la mescla d'incubació amb charcoal, al qual s'hi enganxen els nucleòtids per la seva base púrica.

En principi, la reacció presentava l'avantatge de que l'AMP és un activador de la fosfofructoquinasa. En canvi, tenia el desavantatge de la fàcil reversibilitat de la reacció catalitzada per la mioquinasa. Per aquesta raó es va fer un estudi de les concentracions d'ATP i ADP i del temps i temperatura d'incubació idonis per a aconseguir els millors resultats. Part d'aquests es mostren a la figura 11.

Com a conclusió es van adoptar les següents condicions: ATP 1 mM, ADP 20 mM, temperatura d'incubació 37°C i 48 hores d'incubació. Cal assenyalar la influència de la temperatura d'incubació, de manera que a 37°C es millora notablement el rendiment de la reacció respecte a l'obtingut a temperatura ambient.

Segons l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la mostra a assajar es va utilitzar una $[U^{14}C]$ -glucosa 1,6-bisfosfat de diferent radioactivitat específica. Aquest fet va obligar a disminuir la concentració de glucosa 1-fosfat de la incubació, a fi d'augmentar la radioactivitat específica assolida.

També es va provar de millorar el rendiment de la reacció incloent a la incubació fructosa 2,6-bisfosfat, conegut activador de la fosfofructoquinasa. La concentració final de fructosa 2,6-bisfosfat va ésser de 10 μ M. No es va modificar, però, el rendiment de la reacció probablement perquè la fructosa 2,6-bisfosfat actua en el mateix lloc allostèric que la glucosa 1,6-bisfosfat, la qual es sintetitza en el curs de la reacció i arriba a concentracions molt més elevades que la fructosa 2,6-bisfosfat.

3.2.2. PURIFICACIÓ DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT SINTETITZADA MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA DE BSCANVI IÒNIC

Es va utilitzar una cromatografia de bescanvi iònic en Dowex AG-1-X8 (forma Cl⁻). Es van comparar diversos mètodes d'elució:

A) Elució amb HCl 0,1 M: Es el mètode usual per a la separació de la glucosa 1,6-bisfosfat i la glucosa 1-fosfat (apartat 2.11.3.), però quan la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat és elevada, la separació d'ambdós sucres no és completa.

B) Gradient discontinu de clorur amònic (357): La columna va ésser equilibrada amb NH₄Cl 50 mM i l'elució es va realitzar amb la mateixa sal a una concentració de 50 mM (que eluia la glucosa 1-fosfat) i a 250 mM (que eluia la glucosa 1,6-bisfosfat). La sortida dels dos compostos es seguia comptant la radioactivitat continguda en 10 µl de cada fracció, dipositats en un paper (2 x 2 cm) Whatman ET31 i comptades en toluè-PP0 0,5% com a líquid d'escintil·lació. Amb aquesta tècnica s'aconseguia separar completament els dos compostos.

C) Gradient discontinu de bicarbonat amònic: el resultat del mètode anterior va ésser molt bó, però la preparació final de glucosa 1,6-bisfosfat contenia concentracions elevades de clorur amònic, que podien afectar les determinacions enzimàtiques subsegüents. Per tant, es va

escollir com a eluent el bicarbonat amònic, que es pot eliminar més fàcilment. La columna s'equilibrava amb la mencionada sal a una concentració de 50 mM i l'elució es realitzava amb dos passos a una concentració de 100 mM (on eluia la glucosa 1-fosfat) i 300 mM (on eluia la glucosa 1,6-bisfosfat). El perfil cromatogràfic obtingut es mostra a la figura 12. Com es pot observar, la separació d'ambdós sucres és molt bona i també ho eren els rendiments, que oscil.laven entre el 85 i el 100%.

Les fraccions que contenen la glucosa 1,6-bisfosfat es reunien i es control.lava la seva puresa mitjançant una cromatografia en paper de bescanvi iònic tal com s'explica a l'apartat següent. Després de determinar la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat de la preparació obtinguda espectrefotomètricament, es repartia en alíquotes i es concentrava mitjançant un evaporador centrífug (Speed-Vac). Un cop evaporades, el precipitat es resuspensia en aigua i es tornava a evaporar. Aquest tractament eliminava els restes de bicarbonat amònic existents.

3.2.3. SEPARACIÓ DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT DE LES HEXOSES MONOFOSFAT MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA EN PAPER

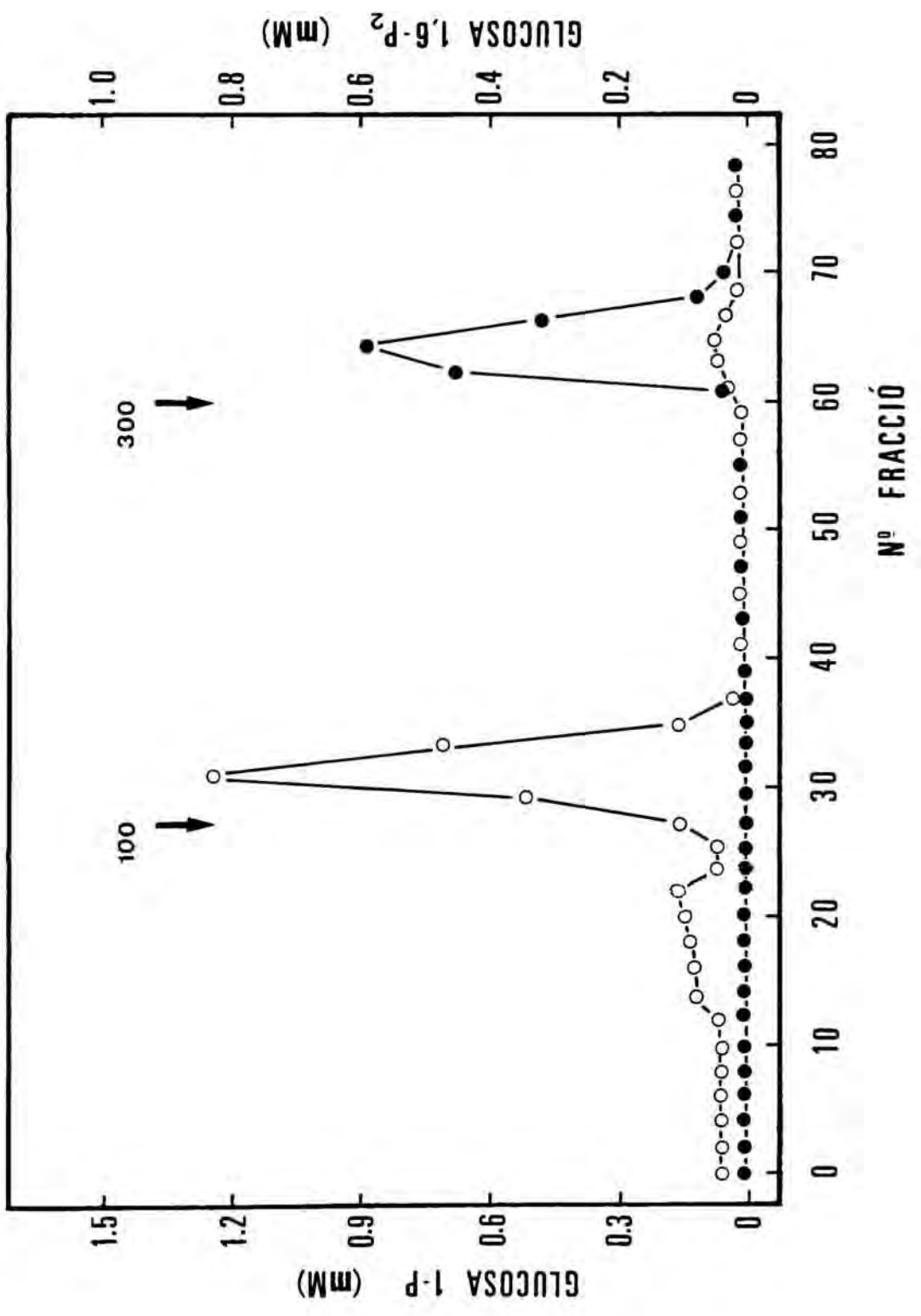
La glucosa 1,6-bisfosfat sintetitzada es va utilitzar com a substrat de la reacció catalitzada per la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Com a mètode de separació de substrat i producte es va utilitzar una cromatografia ascendent en paper de bescanvi iònic, tècnica que es caracteritza per la seva

FIGURA 12. SEPARACIÓ DE GLUCOSA 1-FOSFAT I
GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA
DE BESCANVI IÒNIC EN DOWEX AG-1-X8

La columna (0,5 x 7 cm) va ésser equilibrada amb bicarbonat amònic 50 mM a una velocitat de 20 ml/h. Es van aplicar 150 µl d'una solució de glucosa 1-fosfat 40 mM i glucosa 1,6-bisfosfat 20 mM. L'elució es va fer mitjançant un gradient discontinu de bicarbonat amònic a una concentració 50, 100 i 300 mM. Es van recollir fraccions de 2 ml.

(○) Glucosa 1-fosfat.

(●) Glucosa 1,6-bisfosfat.



senzillesa.

El primer pas era la detecció dels diferents sucres un cop feta la cromatografia. La glucosa 1,6-bisfosfat i la glucosa 1-fosfat són esters fosfòrics làbils al tractament àcid. Per aquesta raó és possible el seu revelat mitjançant un revelador de fosfats. El revelat es basa, doncs, en la hidròlisi àcida del fosfat i la detecció colorimètrica d'aquest per la formació d'un complex colorejat de fosfomolibdat.

El revelador que va donar uns resultats òptims (358) està compost per heptamolibdat amònic 1%, àcid clorhídric 0,75% i àcid perclòric 3,5% en acetona. Es va assajar també un reactiu aquós basat en la mateixa reacció, però va resultar tenir menys sensibilitat. Era possible accelerar la visualització de les taques irradiant uniformement el paper amb llum ultravioleta (2537 Å, 15 w).

Per a revelar la glucosa 6-fosfat i la glucosa es va utilitzar el reactiu de ftalat d'anilina, ja que els esters fosfòrics escasament hidrolitzables com la glucosa 6-fosfat no donen la reacció anterior. La reacció colorimètrica es basa en la reducció del ftalat d'anilina (358) que es transforma en un compost colorejat. Només els sucres reductors són capaços de donar positiva aquesta reacció i, per tant, no és aplicable a la glucosa 1-fosfat ni a la glucosa 1,6-bisfosfat. Per accelerar la reacció calia escalfar les mostres a l'estufa a 80°C.

La separació cromatogràfica en paper o capa fina dels derivats fosforilats de la glucosa no està gaire descrita a la bibliografia (357,358). Per tant, es van assajar diversos soports i fases mòbils. Totes les separacions es van fer amb la càmera de cromatografia saturada, per assegurar la reproductibilitat dels recorreguts.

Com a soports es van assajar el paper Whatman n° 1, la capa fina de cel.lulosa (DC-Alurolle), el paper de bescanvi iònic Whatman DE81 i la capa fina de bescanvi iònic PEI-cel.lulosa. Un resum dels resultats obtinguts es mostra a la taula 7.

Els soports de bescanvi iònic van donar molt bon resultat, com era d'esperar. Es va triar finalment el paper Whatman DE81 degut a que és més fàcil de manipular a l'hora de quantificar la radioactivitat continguda a les taques.

En quant a les fases mòbils, van resultar ésser les millors:

- etanol/borat amònic 0,1M pH 9 (60/40): aquest sistema permet la separació dels quatre sucres assajats i, per tant, té una resolució que no és igualada per cap altre dels mètodes assajats. Malgrat aquesta qualitat no és un sistema útil per els assaigs rutinaris ja que la separació entre la glucosa 1,6-bisfosfat i els derivats monofosforilats no és prou definida perquè es puguin retallar les zones de paper corresponent a cada sucre de manera inequívoca.

TAULA 7. SEPARACIÓ DELS DERIVATS FOSFORILATS
DE LA GLUCOSA MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA
ASCENDENT EN PAPER O CAPA FINA

SOPORT

FASE MÒBIL

		R f				
			G16P ₂	G1P	G6P	Gluc

Repart

Whatman 1	metanol/NH ₃ /H ₂ O (6/1/3)		0,25	0,35	0,33	--
Whatman 1	etanol/NH ₃ /H ₂ O (6/1/3)		0,10	0,25	0,22	--
Cel.lulosa (C.C.F.)	metanol/NH ₃ /H ₂ O (6/1/3)		0,28	0,50	0,49	--
Cel.lulosa (C.C.F.)	etanol/NH ₃ /H ₂ O (6/1/3)		0,13	0,46	--	0,80
Cel.lulosa (C.C.F.)	etanol/borat amònic 0,1 M pH 9 (60/40)		0,16	0,46	--	--

Bescanvi iònic

Whatman DE81	etanol/borat amònic 0,1 M pH 10 (60/40)		0,19	0,49	0,20	--
Whatman DE81	etanol/borat amònic 0,1 M pH 9 (60/40)		0,06	0,32	0,17	--
Whatman DE81	etanol/fòrmic/H ₂ O (40/15/45)		0,04	0,35	0,35	0,92
PEI-cel.	etanol/borat amònic 0,1 M pH 9 (60/40)		0,02	0,13	0,02	0,64

- etanol/àcid fòrmic/aigua (40/15/45): aquest sistema va ésser utilitzat de manera rutinària en tots els assaigs realitzats per el mètode radioactiu. La principal característica és la separació neta entre la glucosa 1,6-bisfosfat, les glucoses monofosforilades i la glucosa.

Calen remarcar algunes anotacions pràctiques d'importància:

a) El temps de preparació del solvent a la cubeta va ésser sempre de 12 a 24 hores.

b) El temps de recorregut de la cromatografia va ésser entre 8 i 15 hores. Amb aquest temps, el front sobrepassava l'extrem del paper (16 cm), però temps més curts eren insuficients, mentre que encara que es passés de les 8 hores. les taques romanien immòbils.

c) Es va comprovar també el funcionament del sistema amb marcadors radioactius.

d) Per a la seva aplicació a l'assaig de glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, es van fer proves adreçades a comprovar que la mostra provinent de les incubacions es comportaven de la mateixa manera que els patrons. Com a resultat, es va eliminar la precipitació àcida com a mètode per aturar la reacció ja que, durant el recorregut cromatogràfic, la glucosa 1-fosfat s'hidrolitzava donant glucosa. Inclús en el cas de que es neutralitzés la mostra, l'augment de força iònica que això implicava modificava molt els recorreguts cromatogràfics. Per aquesta raó es va decidir aturar les reaccions per ebullició al bany maria. També es va comprovar que cap component del medi d'incubació o de les mostres

(sacarosa, glicerol, etc) alterés el comportament cromatogràfic de les mostres.

Es va posar a punt també un altre mètode de separació dels derivats fosforilats de la glucosa basat en la diferent solubilitat de les sals d'aquests derivats. Concretament, la sal bàrica de la glucosa 1,6-bisfosfat és insoluble en aigua a pH neutres (7,5-8,0) mentre que les corresponents a glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat són solubles (359). Aquestes característiques van fer possible un nou mètode de separació, caracteritzat per la seva senzillesa. Es tractava d'una cromatografia ràpida en paper Whatman ET31. En tires de 1,5 x 12 cm es col·locaven 20 μ l de la mostra i 50 μ l d'acetat bàric 1M. S'assecaven a l'estufa i es feia pujar la cromatografia en un vas que contenia 1 cm d'acetat bàric 1M. Just abans de que arribés al límit superior del paper (30 minuts) es treien les tires, s'assecaven a l'estufa, es retallaven en seccions de 1 cm i es comptava la radioactivitat utilitzant toluè-PP0 0,5% com a líquid d'escintil·lació. La glucosa 1-fosfat corria molt localitzada amb el front, mentre que la glucosa 1,6-bisfosfat quedava en el punt de mostra, encara que feia una cua. El mètode no permet separar les glucoses monofosfat de la glucosa, però té l'avantatge de la seva gran rapidesa.

3.3. ESTUDI DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA

3.3.1. MÚSCUL ESQUELÈTIC I ALTRES TEIXITS DE PORC

Com ja s'ha esmentat prèviament a la Introducció, les dades existents a la bibliografia sobre les activitats responsables de la degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat en diversos teixits eren escases. En el moment d'iniciar aquest treball es reduïen a la identificació de preparacions hepàtiques amb activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, de pH òptim àcid (157,158). En múscul esquelètic, el grup de Beitner i col. (4) havien identificat una activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en extractes, però no havien fet cap intent de purificació.

Amb aquests escasos antecedents, el treball que aquí es presenta es va iniciar amb la detecció en diferents teixits de porc de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Els teixits escollits van ésser el múscul esquelètic, el múscul cardíac, el cervell i el fetge. A la taula 8, es mostren els resultats obtinguts a partir d'extractes tisulars, preparats com es descriu a l'apartat 2.6.1.. Com es pot veure, el fetge és el teixit que conté una activitat fosfatasa més elevada, encara que al cervell li correspon l'activitat específica més alta. El múscul esquelètic conté aproximadament $31,7 \pm 9,3$ mU/g teixit.

Es va escollir el teixit muscular per a començar l'estudi degut a la seva relativa riquesa en activitat

TAULA 8. ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT
FOSFATASA EN TEIXITS DE PORC

Els extractes es van preparar com es descriu a l'apartat 2.6.1.. L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es va determinar per el mètode d'Itaya. Es presenten els resultats \pm s.e.m. El nombre de determinacions va ésser de 3-8.

TEIXIT	G 1.6-P FOSFATASA 2 (mU/g teixit)
Múscul	31,7±9,3
Fetge	75,7±7,4
Cervell	15,4±2,1
Cor	16,9±4,4

glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i a que s'havia postulat precisament que era en múscul esquelètic on podia exercir un paper regulador.

El primer pas va ésser la determinació de la localització subcel.lular de l'enzim. El fraccionament es va fer segons el mètode de Walker i Dow, descrit a l'apartat 2.7., que permet separar per centrifugació diferencial les principals fraccions subcel.lulars. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 9. La major part de l'activitat fosfatasa (91%) es va recuperar en el sobrenedant de 100000 x g, que correspon a la fracció citoplasmàtica. Molta menys activitat (8%) es va recuperar en el sediment obtingut a 35000 x g i que correspon a la fracció mitocondrial-lisosomal. La fracció microsomal, que conté també el retícul sarcoplàsmic (sediment de 100000 x g) pràcticament no conté activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

A la vista d'aquests resultats es va utilitzar el sobrenedant de 35000 x g en els estudis següents.

3.3.1.1. Separació de diferents pics d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa presents en extractes de múscul de porc

El primer pas encaminat a la purificació d'enzims amb activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa va ésser un fraccionament amb sulfat amònic. Fraccions de 12 ml procedents d'un extracte de múscul esquelètic van ésser precipitades amb concentracions creixents de sulfat amònic

TAULA 9. DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR DE
L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA EN
MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PORC

El fraccionament subcel·lular es va fer segons el mètode de Walker i Dow. L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es va determinar segons el mètode d'Itaya.

FRACCIÓ	■U TOTALS	ACTIVITAT ESPECÍFICA
S 5000	2500	0,85
S 35000	2304	0,79
P 35000	200	1,23
S 100000	2292	0,86
P 100000	90	0,66

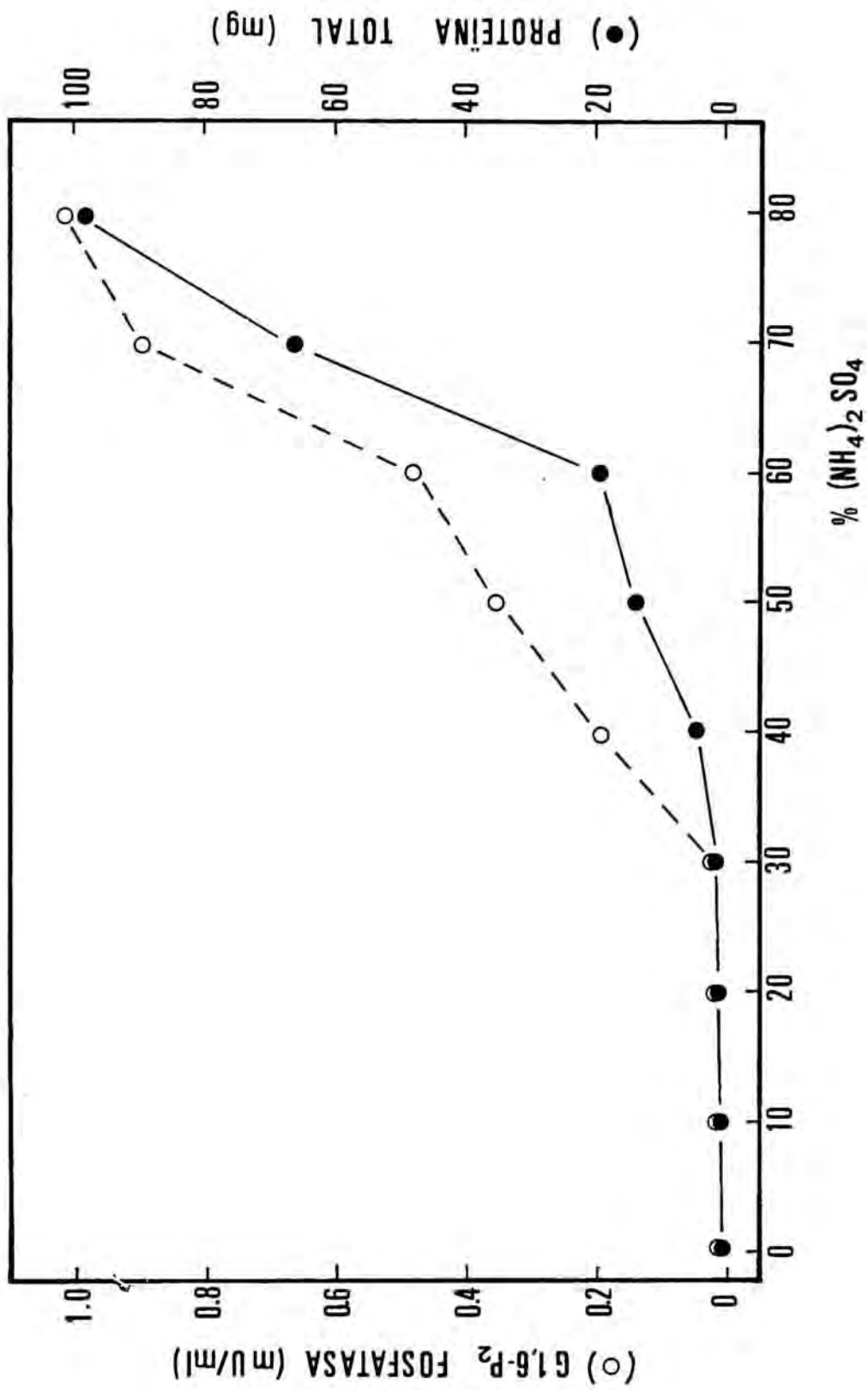
(10-80% concentració final). L'adició de la sal es va fer afegint lentament una solució de sulfat amònic saturada i neutralitzada fins a arribar a la concentració final desitjada. Les preparacions es van deixar sedimentar a 4°C durant dues hores i es van centrifugar a 7000 rpm durant 30 minuts. Els precipitats obtinguts es van resuspendre en el tampó d'homogenització i es van dialitzar exhaustivament contra el mateix tampó durant una nit. Es va determinar l'activitat i la concentració de proteïna en les diferents mostres. El resultat es mostra a la figura 13. Com es pot apreciar, la precipitació d'activitat i proteïna és quasi paral·lela, de manera que no produïa cap millora en l'activitat específica de la preparació. Per aquesta raó, es va fer una precipitació al 75% com a pas inicial de purificació.

Es va intentar també un fraccionament amb polietilenglicol 6000, a concentracions creixents des del 5 al 25%. Els resultats no van ésser satisfactoris i es va preferir la precipitació amb sulfat amònic.

Per a determinar el tipus de resina de bescanvi iònic capaç de retenir l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es van portar a terme aleshores unes proves en "batch". El tipus de resina que va donar millor resultat va ésser la DE-cel·lulosa, la qual retenia la major part de l'activitat. En quant a la forma d'elució, experiments previs van demostrar que l'activitat fosfatasa era fortament inhibida per el KCl (250 mM produïa un 50% d'inhibició). Altres assaigs van

FIGURA 13. PRECIPITACIÓ AMB SULFAT AMONIC DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA A PARTIR D'UN EXTRACTE DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PORC

Fraccions de 12 ml d'un extracte de múscul de porc es van precipitar amb concentracions creixents de sulfat amònic (10-80%). En els sediments obtinguts es va assajar l'activitat fosfatasa (mètode d'Itaya) i la concentració de proteïna.



demostrar que aquelles solucions que contenien l'anió clorur inhibien l'enzim. Per aquesta raó, es va decidir utilitzar un gradient de Tris-acetat per procedir a l'elució cromatogràfica.

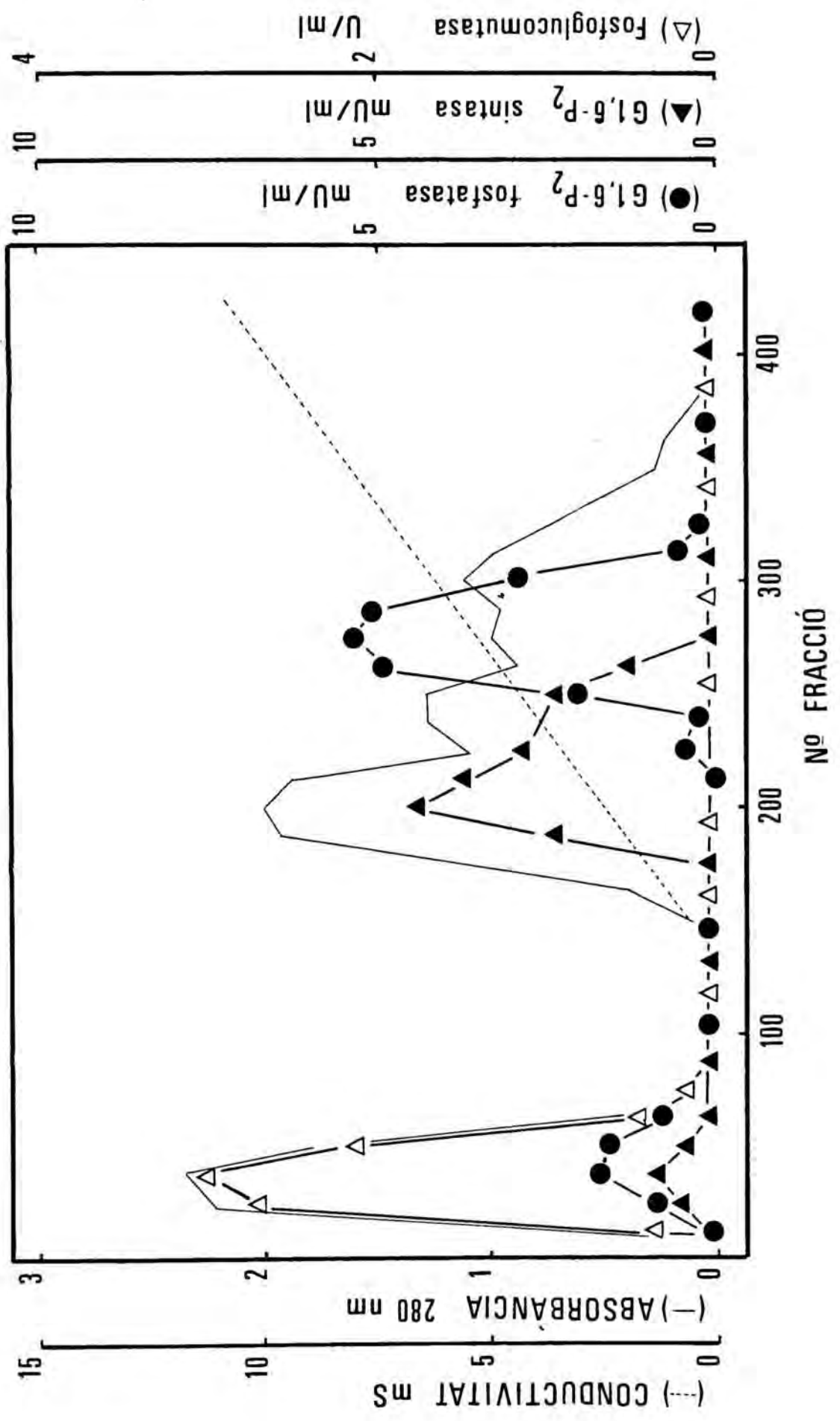
Quan el sobrenedant de la centrifugació de 35000 x g va ésser precipitat amb sulfat amònic i sotmés a cromatografia en DE-cel.lulosa, el patró d'elució diferia segons el procediment d'elució. A la figura 14 es mostra el patró d'elució obtingut quan la mostra, aplicada a una columna equilibrada amb una solució de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic, era eluïda mitjançant un gradient continu del mateix tampó a una concentració entre 20 i 500 mM. La velocitat de flux va ésser de 45 ml/h i les fraccions recollides de 3 ml.

Com s'observa a la figura, s'obtenien dos pics d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa: el primer, que no es fixava a la columna, representava aproximadament el 20% de l'activitat total. Aquest pic d'exclusió contenia també tota l'activitat fosfoglucomutasa i part de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa. El pic majoritari d'activitat fosfatasa eluïa en el gradient a una concentració 210 mM de Tris-acetat i es solapava parcialment amb el pic d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa.

Quan es feia una elució fraccionada, de manera que s'eluïa la columna de DE-cel.lulosa amb una solució de Tris 100 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid

FIGURA 14. SEPARACIÓ DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA D'ALTRES ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES MITJANÇANT CROMATOGRAFIA EN DE-CEL.LULOSA

El precipitat de sulfat amònic (80%) va ésser aplicat a una columna (3 x 13 cm) de DE-cel.lulosa. La columna es va rentar amb Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustat amb àcid acètic a pH 7,5 i es va eluir amb un gradient linial de Tris-acetat des de 20 a 500 mM. El fluxe era de 45 ml/h i es van recollir fraccions de 3 ml.

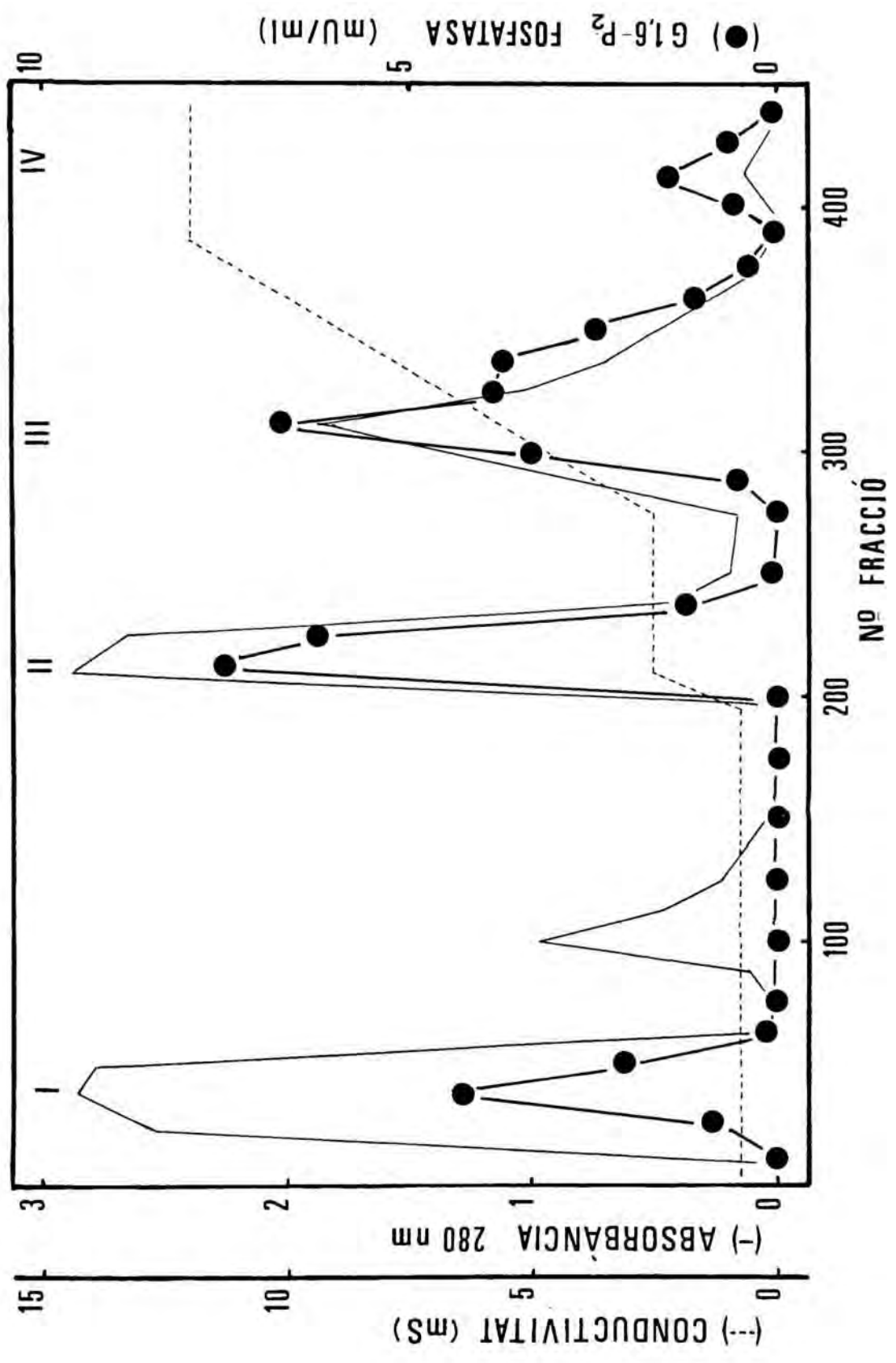


acètic abans d'aplicar el gradient, s'obtenien quatre pics d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, tal com es mostra a la figura 15. Aquests pics van ésser anomenats pic I, que no s'arrapava a la columna, pic II, que eluïa a 100 mM Tris-acetat i pics III i IV, que eluïen en el gradient a una concentració de Tris-acetat de 300 i 500 mM respectivament. Els quatre pics representaven aproximadament el 15, 10, 65 i 10% de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa recuperada.

L'especificitat de substrat dels quatre pics va ésser estudiada i els resultats es mostren a la taula 10. Es van utilitzar com a substrats diverses hexoses fosforilades: glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat i fructosa 1,6-bisfosfat, i p-nitrofenilfosfat, substrat de les fosfatases inespecífiques àcides i alcalines a diferents valors de pH. Com s'observa a la taula, l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es trobava associada majoritàriament al pic III, el qual contenia també la major part de l'activitat sobre glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat. L'activitat específica del pic III sobre la glucosa 1,6-bisfosfat va ésser de 7 mU/mg de proteïna. L'activitat fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es trobava associada majoritàriament al pic II, encara que una part important es trobava també en els pics III i IV. L'activitat sobre p-nitrofenilfosfat a pH àcid, neutre i alcalí, estava associada majoritàriament al pic II. En aquest pic II es trobava també gran part de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa que era retenida per la columna.

FIGURA 15. AÏLLAMENT DE DIVERSOS PICS AMB ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA PER CROMATOGRAFIA EN DE-CEL.LULOSA

El precipitat de sulfat amònic (80%) va ésser aplicat a una columna (3 x 13 cm) de DE-cel.lulosa. La columna es va rentar amb Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustat amb àcid acètic a pH 7,5 i es va eluir primerament amb el mateix tampó a una concentració de 100 mM i després amb un gradient linial de Tris-acetat des de 100 a 500 mM. El fluxe era de 45 ml/h i es van recollir fraccions de 3 ml.



TAULA 10. ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT DELS PICS
OBTINGUTS MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA EN DE-
CEL·LULOSA

L'activitat fosfatasa es va determinar segons
el mètode d'Itaya. La concentració de substrat
va ésser en tots els casos 1 mM.

*** ACTIVITAT FOSFATASA**

SUBSTRAT	PIC I	PIC II	PIC III	PIC IV
Glucosa 1,6-P ₂	13	10	64	13
Fructosa 1,6-P ₂	12	36	27	25
Glucosa 1-P	4	8	82	6
Glucosa 6-P	8	14	71	7
p-Nitrofenil-P				
pH 4,8	14	74	10	2
pH 7,5	6	80	11	3
pH 10,5	1	52	42	5

*** ACTIVITAT SINTASA**

Glucosa 1-P	6	90	2	2
-------------	---	----	---	---

TAULA 11. ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT DELS PICS
II I III OBTINGUTS MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA EN
DE-CEL.LULOSA

L'activitat fosfatasa es va assajar segons el
mètode d'Itaya. Es presenten els resultats
obtinguts a partir de 80 g de múscul.

ACTIVITAT FOSFATASA

SUBSTRAT	PIC II	PIC III
Glucosa 1,6-P ₂	85	319
Glucosa 1-P	180	760
Glucosa 6-P	172	493
Fructosa 1,6-P ₂	1360	620
p-Nitrofenil-P		
pH 4,8	351	48
pH 7,5	214	30
pH 10,5	58	48

En termes quantitativs, les activitats dels pics II i III sobre els diversos substrats s'observen a la taula 11, on es veu que, encara que el pic III conté la major part de l'activitat fosfatasa sobre glucosa 1,6-bisfosfat, aquesta és quantitativament més petita que sobre altres sucres fosforilats.

L'activitat present en el sediment de 35000 x g donava un perfil similar després d'ésser sotmesa a cromatografia en DE-cel.lulosa en les mateixes condicions. Les activitats mesurades sobre els diversos substrats eren molt baixes i totes es trobaven associades al pic que eluïa amb el gradient.

3.3.1.2. Caracterització de les activitats del pic III sobre diferents substrats.

Es va intentar esbrinar amb aquestes proves si l'activitat que presentava el pic III sobre els diferents substrats corresponia o no a la mateixa entitat enzimàtica. Entre les diferents propietats funcionals que es van estudiar cal senyalar:

1.- Estabilitat tèrmica: Totes les activitats fosfatasa associades al pic III difereixen en la seva estabilitat enfront el calor. Com es veu a la taula 12, l'activitat fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es perdia totalment quan s'escalfava la mostra a 67°C durant 5 minuts.

TAULA 12. INACTIVACIÓ TÈRMICA DE LES
ACTIVITATS ASSOCIADES AL PIC III

El pic III obtingut de la cromatografia en DE-cel.lulosa (3 mg proteïna/ml) va ésser escalfat a 60°C i 67°C durant 5 minuts. L'activitat fosfatasa es va determinar segons el mètode d'Itaya.

SUBSTRAT	% ACTIVITAT FOSFATASA	
	60°C	67°C
Glucosa 1,6-P ₂	86	70
Fructosa 1,6-P ₂	15	5
Glucosa 1-P	100	100
Glucosa 6-P	30	25

L'activitat sobre glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa 1-fosfat mostrava molta més estabilitat, de manera que, després de 5 minuts a 67°C, restaven el 70% i el 100% de l'activitat original, respectivament. L'activitat sobre glucosa 6-fosfat mostrava una estabilitat intermitja, de manera que quedava el 25% d'activitat després d'escalfar la mostra.

2.- Efecte del pH: Es va determinar el pH òptim sobre glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat i fructosa 1,6-bisfosfat. La figura 16 mostra els perfils obtinguts utilitzant glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa 1-fosfat com a substrats. Com es pot veure, no són exactament superposables, però mostren un pH òptim neutre idèntic, entre 7,0-7,2. També va ésser el pH òptim quan es van utilitzar glucosa 6-fosfat o fructosa 1,6-bisfosfat com a substrats.

3.- Efecte dels cations divalents magnesi i manganès: Com es pot veure a la figura 17, els cations divalents magnesi i manganès són necessaris per a l'activitat fosfatasa mesurada sobre glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat. L'efecte dels dos cations, però, és força diferent ja que el magnesi activa més efectivament que el manganès, encara que aquest ho fa a concentracions més baixes ($K_a \text{ Mg}^{++} \approx 5 \text{ mM}$, $K_a \text{ Mn}^{++} \approx 1 \text{ mM}$), i a concentracions més altes resulta ésser inhibitori. El patró d'activació és similar sobre els tres substrats utilitzats.

4.- Efecte dels anions fluorur i clorur: Com ja s'ha comentat prèviament, l'anió clorur és un inhibidor de

FIGURA 16. pH OPTIM DE LES ACTIVITATS GLUCOSA
1,6-BISFOSFAT FOSFATASA I GLUCOSA 1-FOSFAT
FOSFATASA DEL PIC III

Les solucions amortidores utilitzades van ésser: acètic-acetat (pH 5,0-5,5), imidazol-acètic (pH 5,5-7,5), Tris-acètic (pH 7,0-9,0) i glicina-NaOH (pH 9,-9,5).

Panel A: glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

Panel B: glucosa 1-fosfat fosfatasa.

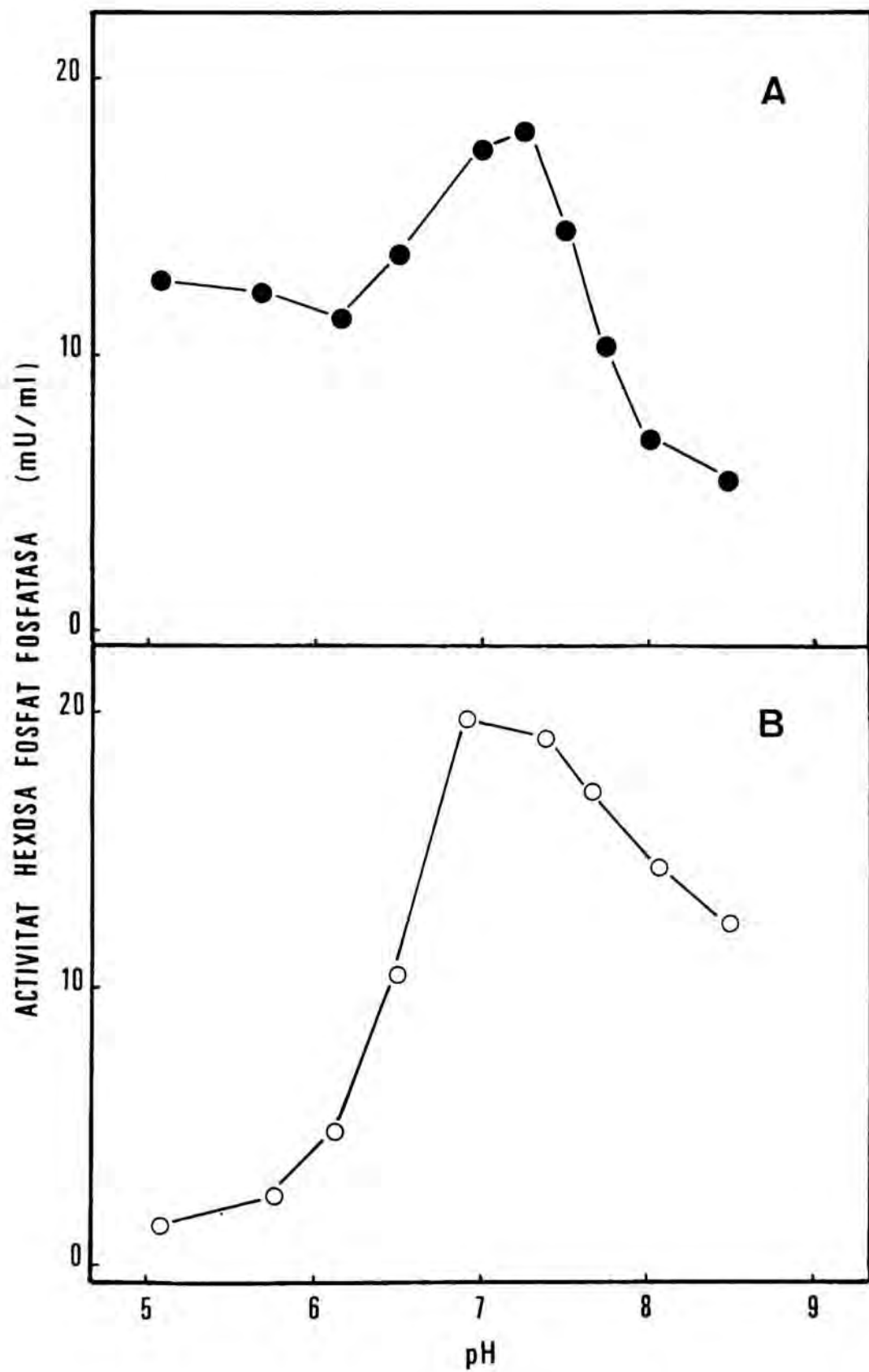


FIGURA 17. EFECTE DEL MAGNESI I DEL MANGANÈS
SOBRE LES ACTIVITATS FOSFATASA DEL PIC III

L'activitat fosfatasa es va determinar utilitzant com a substrats glucosa 1,6-bisfosfat (●), glucosa 1-fosfat (□) i glucosa 6-fosfat (○) en presència de diferents concentracions d'acetat magnèsic (panel A) o acetat de manganès (panel B).

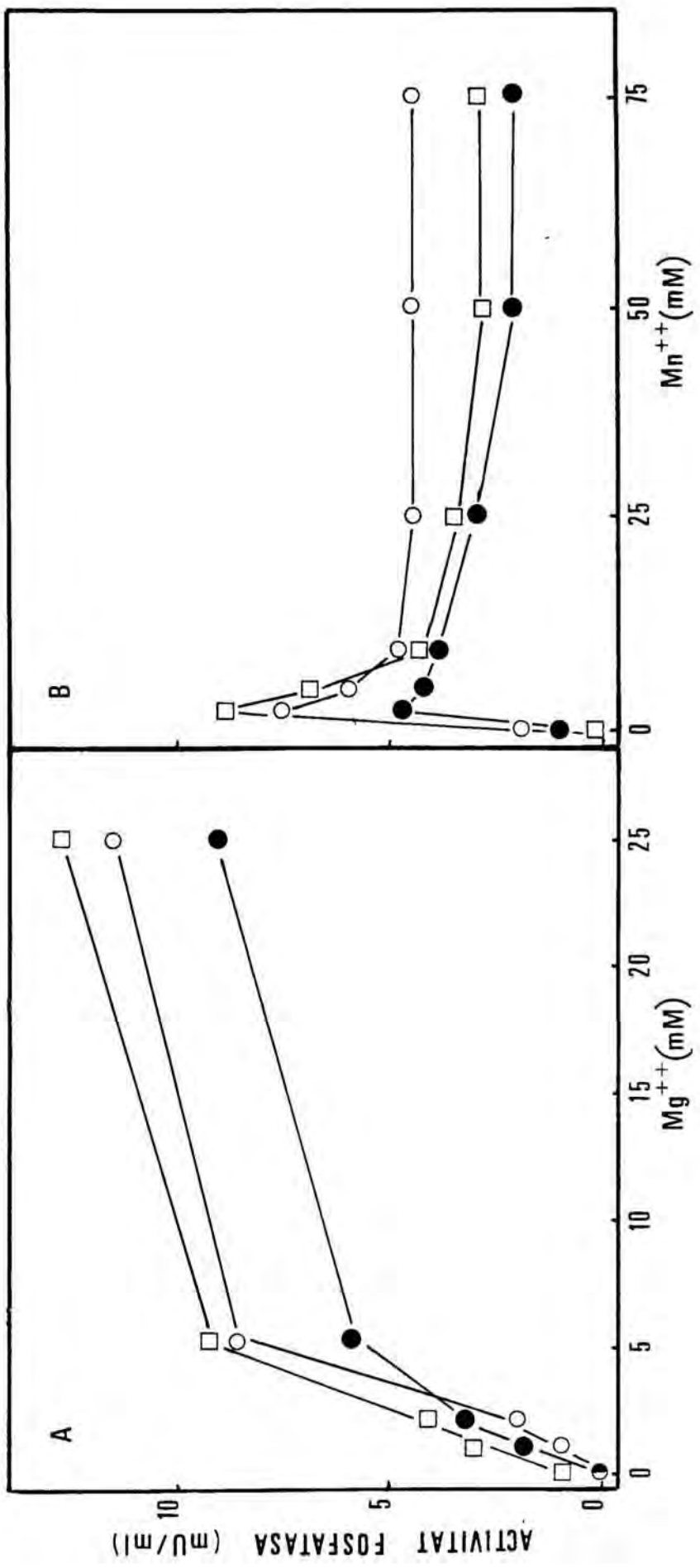
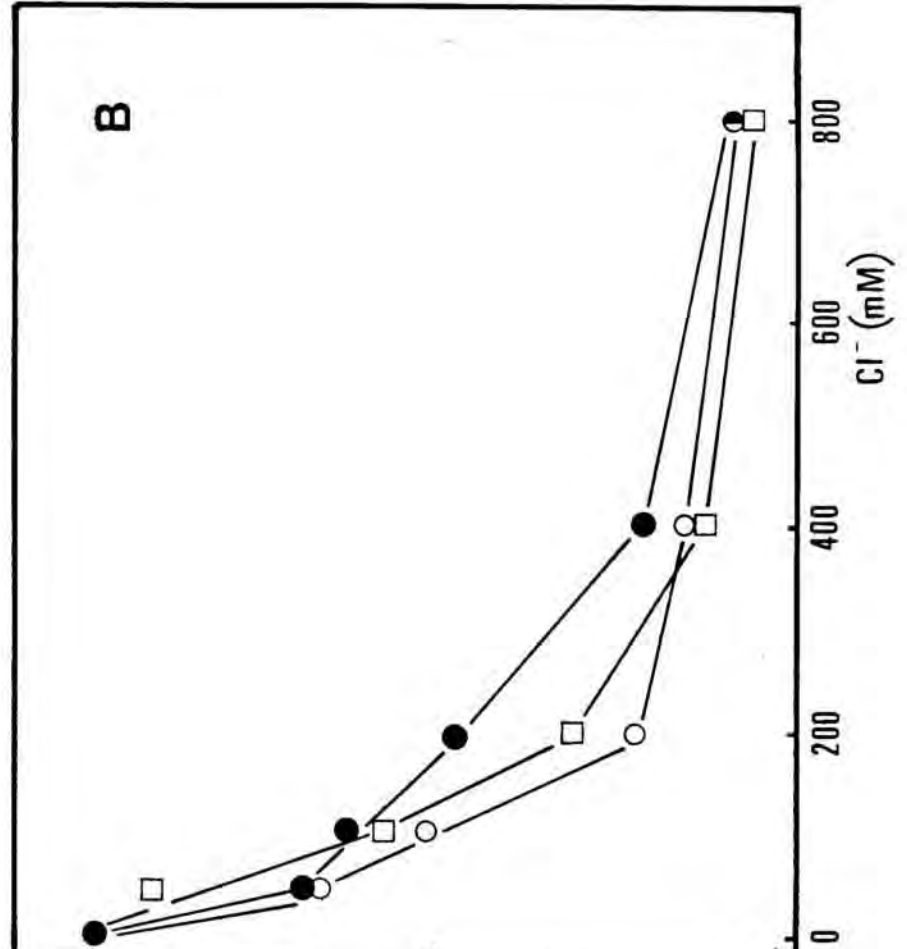
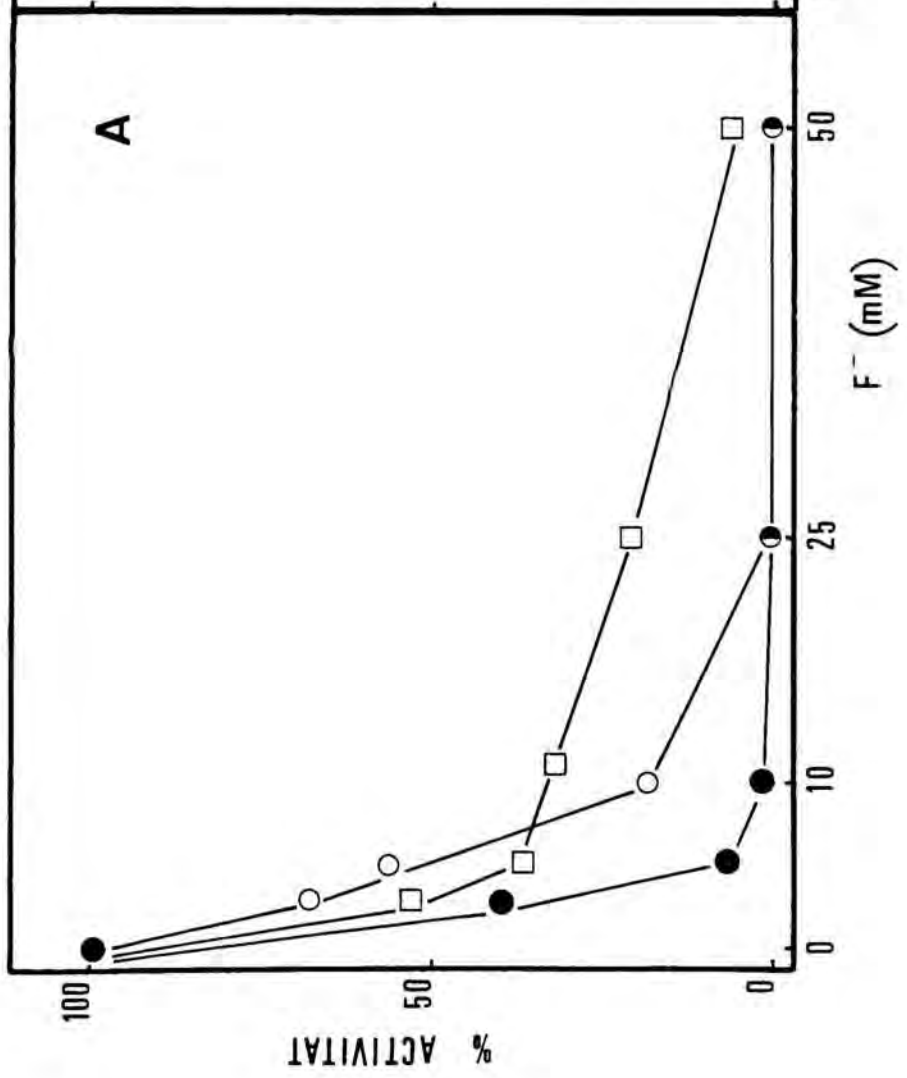


FIGURA 18. EFECTE DELS ANIONS FLUORUR I CLORUR
SOBRE LES ACTIVITATS FOSFATASA DEL PIC III

L'activitat fosfatasa es va determinar utilitzant com a substrat glucosa 1,6-bisfosfat (●), glucosa 1-fosfat (□) i glucosa 6-fosfat (○) en presència de diferents concentracions de fluorur sòdic (panel A) o clorur sòdic (panel B).



l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i també va resultar ser-ho sobre altres sucres fosforilats com la glucosa 1-fosfat i la glucosa 6-fosfat. En quant a l'anió fluorur, un inhibidor molt comú de les fosfatases, és un potent inhibidor de totes les activitat associades al pic III. El patró d'inhibició és lleugerament diferent segons el substrat, ja que una concentració de 5 mM inhibia totalment l'activitat fosfatasa sobre glucosa 1,6-bisfosfat i reduïa l'activitat sobre glucosa 6-fosfat i glucosa 1-fosfat al 40 i 60%, respectivament. Els resultats es mostren a la figura 18.

5.- Efecte del calci i l'EGTA: L'any 1982, Wakelam i col. (174) van descriure que l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic de rata era activable per calci i calmodulina. En vista d'aquesta aportació, es va determinar l'efecte del calci sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa del pic III a concentracions entre $1\mu\text{M}$ i 1mM i es va comprovar que no tenia cap efecte. Tampoc va mostrar cap efecte la incorporació d'EGTA, quelant específic del calci, a concentracions entre $0,1\mu\text{M}$ i 1mM a l'assaig.

6.- Efecte de l'IMP: L'any 1982, Guha i Rose (159) van descriure que el nucleòtid IMP era un potent activador de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de cervell de ratolí, de manera que en absència del nucleòtid, l'enzim no presentava pràcticament activitat. Es va assajar aleshores l'efecte de l'IMP sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa dels pics II i III procedents de la separació mitjançant

cromatografia en DE-cel.lulosa del sobrenedant de 35000 x g i també procedents del sediment de 35000 x g. En cap cas es va detectar cap efecte del nucleòtid.

7.- Efecte del tetracionat: El tractament amb tetracionat ($K_2S_2O_8$) 1 mM durant 30 minuts a 37°C no afectava l'activitat del pic III mesurada sobre glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat o fructosa 1,6-bisfosfat. Aquest compost és un oxidant dels grups -SH.

8.- Patró cinètic: La cinètica obtinguda al determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa del pic III al variar la concentració de substrat seguia el model de Michaelis-Menten. Es va determinar la K_m segons el mètode de Lineweaver-Burk, que va resultar ésser de 800 μM .

3.3.1.3. Intent d'ulterior purificació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa

La preparació enzimàtica que corresponia al pic III obtingut per cromatografia en DE-cel.lulosa contenia la major part de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa del múscul. Malgrat això, aquesta preparació era capaç d'hidrolitzar altres substrats, alguns d'ells amb més eficàcia que no pas la glucosa 1,6-bisfosfat. A més, semblava haver-hi més d'una activitat en aquesta fracció.

Per assolir una millor purificació, es van assajar diverses tècniques cromatogràfiques: gel filtració,

cromatografia hidrofòbica i cromatografia d'afinitat. Degut a que la mostra presentava activitat especialment sobre glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat, es va fer el seguiment de les diferents columnes assajades sobre aquests substrats.

1.- Cromatografia en Sephadex G-100: 1 ml de mostra procedent del pic III de DE-cel.lulosa, prèviament concentrat i dialitzat (9 mg de proteïna) va ésser aplicat a una columna de Sephadex G-100 (1 x 50 cm) a una velocitat de fluxe de 10 ml/h. Es van recollir fraccions de 1 ml i es va determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Es va recollir un petit pic d'activitat solapat amb el de proteïna. Un cop concentrat es va determinar l'activitat sobre els altres substrats. Els resultats van demostrar que tenia també activitat sobre ells.

2.- Cromatografia en Cibacron Blue Sepharose 4B: Es tracta d'un tipus de cromatografia per la qual presenta afinitat la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de cervell. La columna (1 x 0,5 cm) es va equilibrar amb solució amortidora de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic a una velocitat de 20 ml/h. La mostra utilitzada va ésser el pic III obtingut de la cromatografia en DE-cel.lulosa. 0,8 ml d'aquesta preparació (9 mg de proteïna) es van dipositar a la columna i aquesta es va rentar exhaustivament amb el tampó d'equilibrat fins que l'absorbància a 280 nm va ésser menor de 0,01. Es va determinar l'activitat de les fraccions obtingudes sobre glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat i

fructosa 1,6-bisfosfat. Els resultats mostraven que cap de les activitats era retenida per la columna, de manera que coeluien amb el pic d'exclusió.

3.- Cromatografia en δ -butilamino Sepharosa: Es tracta d'una resina amb un braç hidrofòbic de butilamina. La columna (1 x 1 cm) es va equilibrar amb Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustat a pH 7,5 amb àcid acètic a una velocitat de 12 ml/h. 0,5 ml (4,5 mg de proteïna) del pic III obtingut de la cromatografia en DE-cel.lulosa es van aplicar a la columna i, després de rentar-la exhaustivament amb el mateix tampó d'equilibrat, es va aplicar un gradient discontinu de Tris-acetat β -mercaptoetanol 2 mM pH 7,5 a una concentració de 100 mM i 300 mM. Les fraccions recollides es van assajar per activitat fosfatasa sobre glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat. Totes les activitats eluien majoritàriament a una concentració de Tris-acetat 300 mM.

4.- Cromatografia d'afinitat en Sepharosa 4B acoblada a glucosamina 6-fosfat: Es tractava de veure si aquesta columna podia retenir l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, degut a la similitud que presentava el lligand amb el substrat de l'enzim. La columna (1 x 1 cm) es va equilibrar amb solució de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic a una velocitat de 20 ml/h. 0,5 ml (4,5 mg de proteïna) del pic III obtingut a partir de la cromatografia en DE-cel.lulosa es van aplicar a la columna. Aquesta es va rentar exhaustivament amb el mateix

tampó d'equilibrat i després es va procedir a l'elució amb un gradient discontinu de Tris-acetat β -mercaptoetanol 2 mM pH 7,5 a una concentració de 100, 300 i 500 mM. L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es va recuperar parcialment en el pic d'exclusió i la fracció eluïda a 100 mM, encara que el rendiment era molt baix. Es va intentar aleshores una elució específica amb el substrat, glucosa 1,6-bisfosfat, a concentracions 1 i 5 mM. Tampoc es va aconseguir eluir l'activitat.

3.3.1.4. Estudi dels restants pics amb activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa eluits de la cromatografia en DE-cel.lulosa

L'anomenat pic III, encara que era el que representava la major part de l'activitat fosfatasa sobre glucosa 1,6-bisfosfat del múscul, no presentava activació per IMP ni per calci. No es podia millorar el seu estat de purificació a causa de que, com s'ha vist, en les diferents cromatografies assajades, l'activitat es repartia en diversos pics sense aconseguir-se un pic majoritari i lliure, almenys parcialment, d'activitat fosfatasa sobre altres substrats. A més, encara que l'activitat present en el pic III era força estable, les preparacions obtingudes després del seu fraccionament, s'inactivaven molt ràpidament.

En aquesta situació. es va procedir a l'estudi dels altres pics que contenien activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, tenint en compte especialment el possible efecte

d'activació per IMP. En primer lloc, es va estudiar l'efecte de sacarosa 250 mM i de PMSF 0,5 mM al medi d'extracció. La seva adició, però, no va suposar cap diferència en l'activitat fosfatasa obtinguda, ni en els perfils cromatogràfics en DE-cel.lulosa, ni en l'especificitat de substrat dels diferents pics, ni en la manca d'activació per IMP.

També es va assajar l'efecte de l'IMP sobre l'activitat de les diferents fraccions subcel.lulars obtingudes per centrifugació diferencial. En cap cas es va observar una activació pel nucleòtid. Una activitat IMP fosfatasa es trobava localitzada preferentment a la fracció citosòlica.

Els pics obtinguts a partir de la cromatografia en DE-cel.lulosa es van assajar en presència i absència d'IMP 1 mM. Cap d'ells va presentar un efecte activador significatiu, ja que l'increment de fòsfat alliberat era explicat per l'activitat IMP fosfatasa present. Per assegurar, en tot cas, que no existia cap pic d'activitat activable per IMP, es va sotmetre una preparació del sobrenedant de 35000 x g a cromatografia en DE-cel.lulosa i es va seguir l'elució de l'activitat assajant les fraccions en presència i absència d'IMP i per activitat IMP fosfatasa. Els perfils obtinguts van ésser els esperats i no es va produir l'aparició de cap nou pic que presentés activitat en presència del nucleòtid. També es va sotmetre a cromatografia en DE-cel.lulosa el sediment obtingut per centrifugació a 35000 x g. Com ja s'ha

esmentat, les activitat fosfatasa en aquesta fracció són molt baixes i elueixen majoritàriament amb el gradient. No es va produir cap alteració del perfil cromatogràfic en assajar les fraccions en presència del nucleòtid. L'activitat IMP fosfatasa d'aquesta fracció era també molt baixa.

El tractament del sediment de 35000 x g per congelació i descongelació, que provoca el trencament dels lisosomes, no provocava cap canvi en l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la mostra. Tampoc va causar cap variació en la seva sensibilitat a l'IMP.

Tant el grup de Rose i col.laboradors en cervell com el grup de Pette i col.laboradors en el múscul, havien fet servir en els seus treballs sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa unes concentracions de substrat baixes: 50 μM i 200 μM , respectivament. En el cas del múscul, Wakelam i col. (174) havien calculat una K_m aparent en extracte de múscul de 22 μM . En el nostre treball, s'havia utilitzat rutinàriament una concentració de substrat en l'assaig de 1 mM. Es va pensar aleshores que les diferències obtingudes respecte al treball d'altres autors podien ésser degudes a la diferent concentració de substrat utilitzada. Es van fer, doncs, algunes proves emprant una concentració de glucosa 1,6-bisfosfat de 50 o 100 μM i que van incloure la determinació d'activitat en extracte i l'efecte que produïa l'adició d'IMP a l'assaig i, per altra banda, el seguiment de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa eluïda d'una cromatografia en DE-cel.lulosa en presència i absència d'IMP.

Cap d'aquests assaigs va oferir cap diferència respecte al patró establert a concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat més altes.

Per altra banda, l'activació per calci, que no havia donat resultat positiu en el pic III obtingut per cromatografia en DE-cel.lulosa, es va assajar també sobre els altres pics procedents d'aquesta separació cromatogràfica i sobre el sediment de 35000 x g. Ni l'adició directa de calci, ni l'adició d'EGTA a la mescla d'assaig va produir cap efecte sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

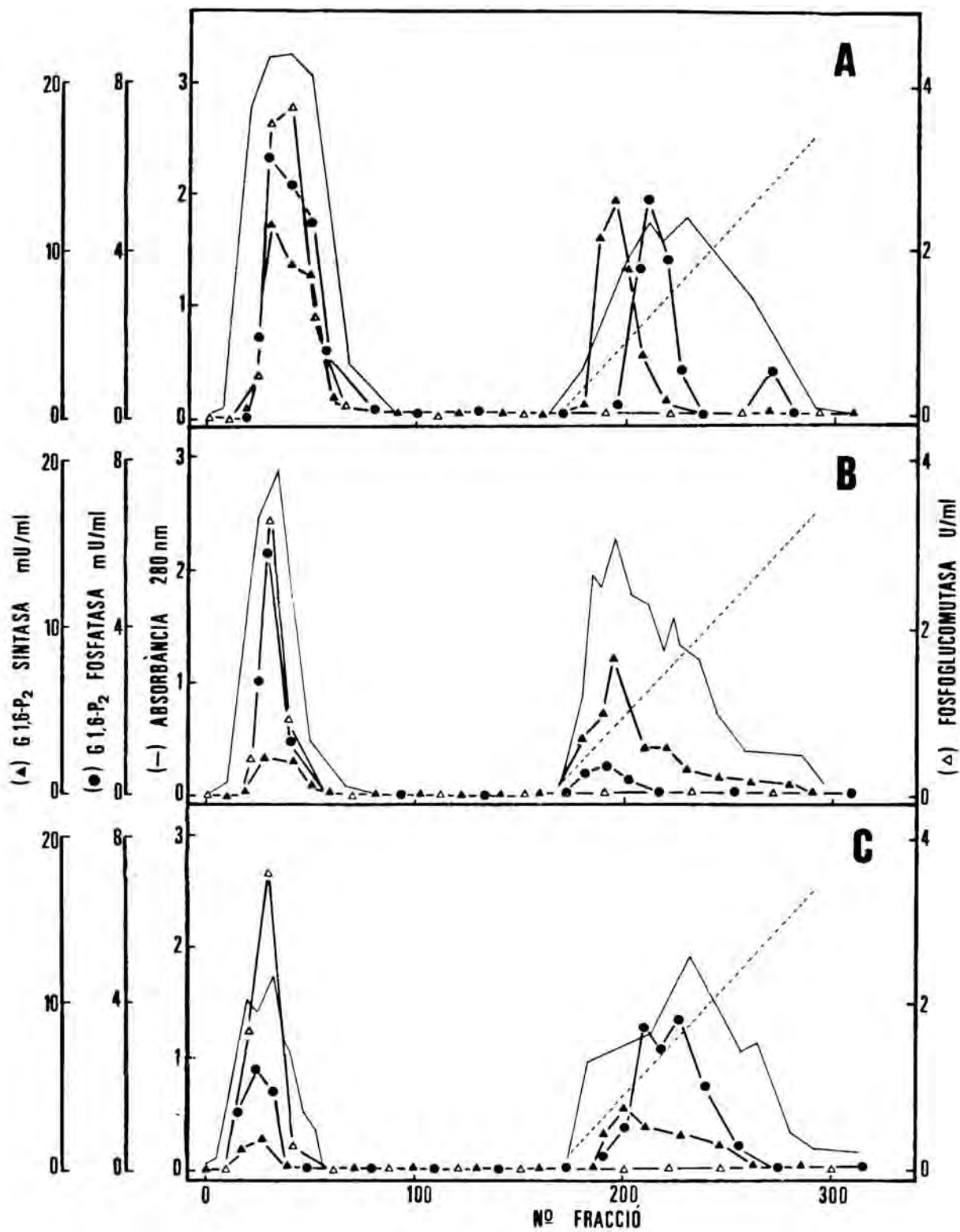
3.3.1.5. Patrons d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en diferents teixis de porc

Un cop establert el perfil cromatogràfic que s'obtenia quan es sotmetien preparacions procedents de múscul esquelètic a cromatografia en DE-cel.lulosa, es va procedir a investigar si els demás teixits seguien un patró similar o si existien diferències significatives entre ells. Els teixits escollits van ésser el cervell, fetge i múscul cardíac.

Els extractes tissulars preparats segons s'especifica a l'apartat 2.6.1., es van precipitar amb sulfat amònic al 75% i, després d'ésser dialitzats exhaustivament, es van sotmetre a cromatografia en DE-cel.lulosa. L'elució es va realitzar mitjançant un rentat previ de la columna amb solució amortidora de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2mM

FIGURA 19. PERFILS EN DE-CEL.LULOSA
D'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA,
GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT SINTASA I
FOSFOGLUCOMUTASA DE DIVERSOS TEIXITS DE PORC

Els extractes procedents dels diversos teixits es van precipitar amb sulfat amònic (80%) i es van aplicar a una columna de DE-cel.lulosa (3 x 13 cm) equilibrada amb Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustat a pH 7,5 amb àcid acètic. L'elució es va fer mitjançant un gradient linial de Tris-acetat des de 20-500 mM. El fluxe va ésser de 45 ml/h i les fraccions recollides de 3 ml. Els teixits utilitzats van ésser: cervell (panel A), fetge (panel B) i cor (panel C).



ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic i posteriorment s'aplicava un gradient continu de Tris-acetat entre 20 i 500 mM a pH 7,5 i en presència de β -mercaptoetanol 2 mM. Els patrons obtinguts es mostren a la figura 19, on es veuen els perfils d'elució corresponents a les activitats fosfoglucomutasa, glucosa 1,6-bisfosfat sintasa i glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en els tres teixits.

La fosfoglucomutasa, tal com s'havia descrit prèviament a la bibliografia, no és retenida per la resina en cap cas. En quant a les activitats de síntesi i degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat, els perfils són bastant similars als corresponents al múscul esquelètic. Així, en cervell i múscul cardíac, tant la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa com la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa presenten un pic d'activitat que no és retingut per la resina i que, per tant, elueix amb el pic d'exclusió, i un altre pic, majoritari en ambdós casos, que és retingut per la columna. Tal com succeeix en el múscul esquelètic, ambdues activitat elueixen a diferent força iònica (a 125 mM la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa i a 230 mM la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa), encara que es solapen parcialment.

En el cas de les activitats procedents de fetge, és de senyalar que, encara que els perfils corresponents a l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa i a la fosfoglucomutasa són anàlegs als obtinguts per altres teixits, per la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa hi ha una interessant diferència, ja que el pic que s'elueix amb el

gradient és proporcionalment més petit, de manera que la major part de l'activitat surt amb el pic d'exclusió. A més, l'elució té lloc a una força iònica més baixa que en la resta de teixits.

3.3.2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATA

Un cop establerts els patrons enzimàtics presents en el múscul esquelètic de porc, es va proseguir l'estudi en el teixit procedent de rata, ja que aquest era l'animal escollit per a realitzar una sèrie d'estudis fisiològics sobre les variacions de nivells de glucosa 1,6-bisfosfat que es podien trobar en diferents situacions.

Es va assajar en primer lloc la influència del tipus de mort de l'animal: decapitació o anestèsia prèvia amb tiopental sòdic. El tipus de mort no va afectar els resultats en quant a l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa obtinguda i es va optar per l'anestèsia seguida pel desangrament de l'animal. D'aquesta manera s'evitaven, per una banda, les fortes contraccions musculars provocades per la decapitació i que podien modificar el metabolisme muscular i, per l'altra, una excessiva contaminació hemàtica. Es van utilitzar en tots els casos rates alimentades.

L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul de rata va ésser del mateix ordre que l'existent en múscul de porc: $12,94 \pm 2,27$ mU/g de teixit.

3.3.2.1. PURIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATA

- Cromatografia en DE-cel.lulosa

Es va sotmetre un extracte de múscul de rata a cromatografia en DE-cel.lulosa en les mateixes condicions descrites per al teixit procedent de porc. El resultat, mostrat a la figura 20, va demostrar que el perfil obtingut en el cas de múscul de rata era idèntic a l'obtingut a partir del teixit de porc.

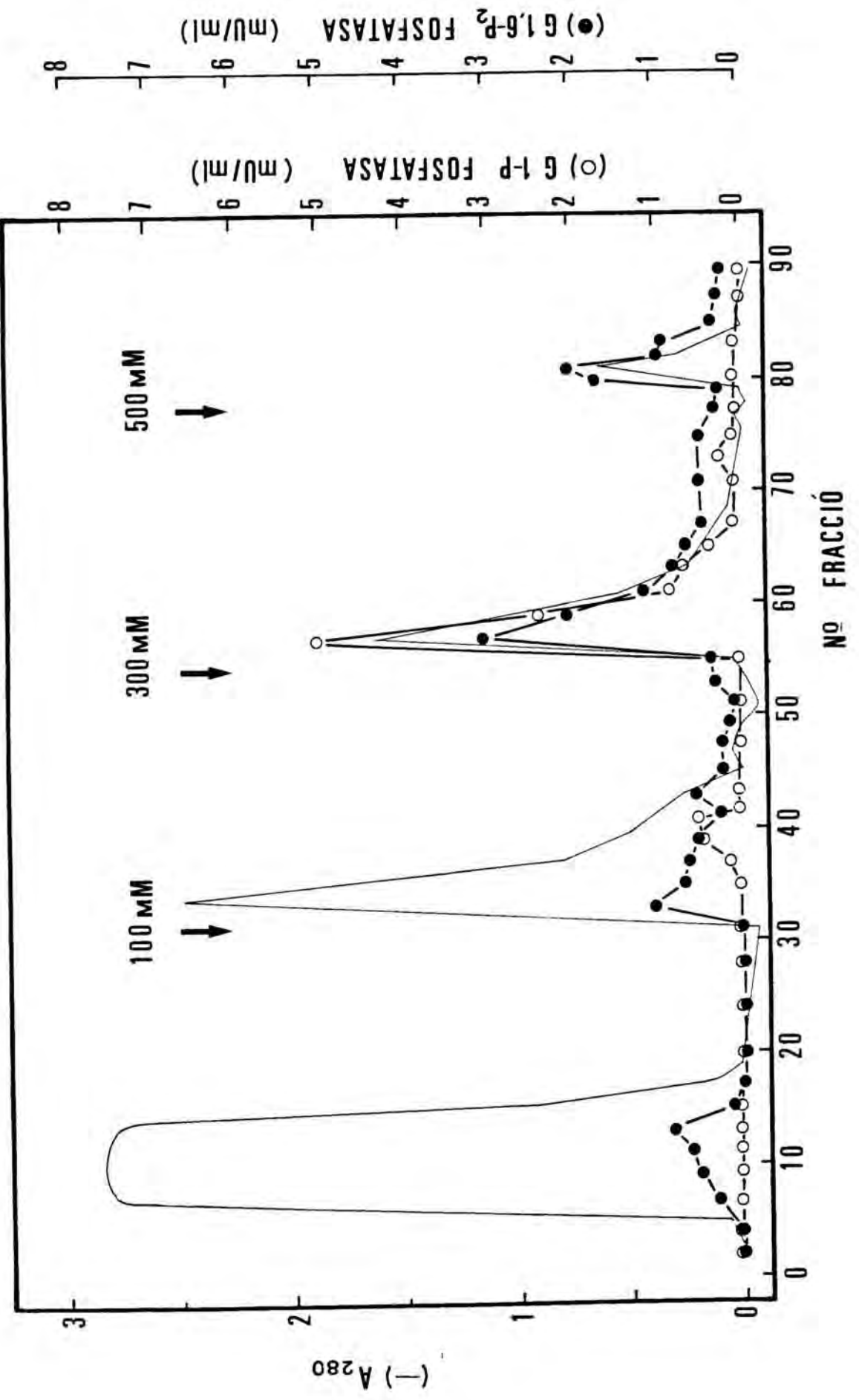
S'obtenien quatre pics d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, el més important dels quals eluïa a una força iònica de 300 mM de Tris-acetat (pic III). No s'observava en cap cas activació deguda a la presència d'IMP, ja que l'activitat IMP fosfatasa explicava, en el seu cas, l'increment de l'alliberament de fosfat.

El seguiment de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa al llarg de la cromatografia es va fer també pel mètode espectrofotomètric basat en la determinació de la desaparició de la glucosa 1,6-bisfosfat present a la mescla d'assaig descrit a l'apartat 2.3.1.2., que, en principi, presentava l'avantatge d'ésser més específic. Els perfils obtinguts van ésser similars, però amb el problema de que el mètode és més laboriós i presenta un marge d'error relativament elevat degut a que la seva sensibilitat exigia la dilució de les mostres incubades prèviament. Per aquesta

FIGURA 20. CROMATOGRAFIA EN DE-CEL.LULOSA D'UN
EXTRACTE PROCEDENT DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE
RATA

L'extracte va ésser precipitat amb sulfat amònic (80%) i aplicat a una columna de DE-cel.lulosa (1,5 x 6 cm). L'elució es va fer mitjançant un gradient dicontinu de Tris-acetat pH 7,5 β -mercaptoetanol 2 mM a una concentració de 20, 100, 300 i 500 mM. El fluxe va ésser de 45 ml/h i es van recollir fraccions de 2 ml.

L'activitat fosfatasa es va determinar segons el mètode d'Itaya.



raó, tots els processos cromatogràfics es van seguir per el mètode basat en la determinació del fosfat alliberat. El mètode espectrofotomètric es va utilitzar principalment en proves en extracte com les que es comentaran més endavant.

- Cromatografia d'afinitat en Sepharosa 4B acoblada a glucosamina 6-fosfat

El pic eluit a 300 mM procedent de la cromatografia en DE-cel.lulosa ja havia estat sotmés a aquest tipus de tractament en el cas del teixit de porc. Es va sotmetre, doncs, una preparació del pic III de múscul de rata en les mateixes condicions esmentades a l'apartat 3.3.1.3.. L'elució es va fer mitjançant un gradient discontinu de Tris-acetat a concentracions de 20, 100, 300 i 500 mM a pH 7,5 i en presència de β -mercaptoetanol 2 mM. Es va assajar l'activitat de les fraccions recollides sobre glucosa 1,6-bisfosfat en presència i ausència d'IMP, i sobre altres hexoses fosforilades: glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat i fructosa 1,6-bisfosfat.

En el cas del múscul de rata, el patró d'elució va ésser el mateix que en el múscul de porc: es recuperava un gran pic d'activitat fosfatasa sobre glucosa 1-fosfat que eluia a una força iònica de 100 mM Tris-acetat i que anava acompanyat per unes activitats molt baixes sobre els demás substrats. L'elució específica amb glucosa 1,6-bisfosfat no va provocar tampoc l'elució de més activitat fosfatasa sobre aquest substrat.

El pic d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa que eluia de la cromatografia en DE-cel.lulosa a una força iònica de 500 mM Tris-acetat representava una petita part de l'activitat total que es recuperava de la columna. Malgrat això, no presentava pràcticament activitat fosfatasa sobre la glucosa 1-fosfat i, degut a que prèviament no havíem fet cap estudi sobre aquest pic d'activitat, es va fer un estudi sobre la seva especificitat de substrat, que va resultar similar a la del pic IV procedent de múscul de porc. El pas d'aquesta preparació per una cromatografia en Sepharose-glucosamina 6-fosfat no va aportar cap resultat positiu, doncs l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa era petita i va eluir majoritàriament amb l'activitat fosfatasa sobre altres substrats.

3.3.2.2. DETECCIÓ D'UN ACTIVADOR DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA EN EXTRACTES DE MÚSCUL DE RATA

La precipitació amb sulfat amònic de l'extracte ocasionava una pèrdua d'activitat considerable respecte a la inicial. De la mateixa manera, quan l'extracte es dialitzava exhaustivament, també desapareixia gran part de l'activitat. Aquestes proves es van fer amb el mètode espectrofotomètric, ja que la determinació de l'alliberament de fosfat exigia la diàlisi de totes les mostres que s'assajaven per tal d'eliminar els fosfats endògens.

Rose i col. (159) havien identificat l'activació per IMP en el cas de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de

cervell basant-se en indicis d'aquest tipus. De manera que vem intentar esbrinar si en el múscul aquest paper era portat a terme per un compost diferent de l'IMP.

Per tal d'averiguar-ho, es va seguir el següent protocol: Es va preparar un extracte de múscul de rata tal com s'explica a l'apartat 2.6.1, utilitzant com a medi d'homogenització una solució composta per trietanolamina 10 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 2 mM i sacarosa 250 mM a pH 7,5. Es van repartir 30 ml d'aquest extracte en quatre alíquotes: una d'elles es va reservar per assajar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa directament, un altra es va sotmetre a diàlisi exhaustiva contra una solució de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic, i l'altra es va bullir a 100°C durant 15 minuts per eliminar la proteïna i seguidament es va centrifugar a 15000 rpm durant 10 minuts. El reste de l'extracte es va precipitar amb sulfat amònic al 80% de concentració final, es va deixar reposar durant dues hores a 4°C, es va centrifugar a 7000 x g durant 30 minuts i el sediment es va resuspendre en un petit volum del mateix medi d'homogenització, es va dialitzar i finalment es va ajustar el volum fins regenerar el volum d'extracte original del qual provenia.

L'activitat d'aquestes mostres es va assajar pel mètode espectrefotomètric que determina la glucosa 1,6-bisfosfat que desapareix del medi d'incubació. Els resultats es mostren a la figura 21. Com es pot observar, l'extracte precipitat amb sulfat amònic pràcticament no mostra activitat

fosfatasa en aquestes condicions, mentre que l'addició de l'extracte bullit permet recuperar en gran part l'activitat original. L'efecte de l'extracte bullit és dependent de la seva concentració, tal com es mostra a la figura 22.

Paral·lelament es van realitzar una sèrie de controls per assegurar que cap dels elements presents en el medi d'homogenització (sacarosa, EDTA) tenia efecte sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

Un cop establert aquest model, es va assajar en primer lloc si el calci o l'IMP tenien efecte sobre l'activitat present en el precipitat de sulfat amònic. El nucleòtid no va exercir cap acció i, en quant a l'ió, tampoc va tenir cap efecte, tant sol com en presència de calmodulina 1 μ M o trifluoperazina 100 μ M. Tampoc van provocar cap efecte l'EDTA, l'EGTA, ni els ions magnesi (acetat magnèsic 20 mM) o potasi (KCl 150 mM).

Per a procedir a la identificació de l'activador present en l'extracte bullit, es van fer les següents proves de caracterització:

1.- Tractament amb àcid i base de l'extracte bullit: A 1 ml de l'extracte bullit se li van afegir 20 μ l de HCl 5 N (concentració final 0,1 N) i es va escalfar a 100°C durant 15 minuts. Immediatament es va submergir en gel per refredar la mostra, es va centrifugar a 15000 rpm durant 5 minuts en una centrífuga Eppendorf i es va neutralitzar amb NaOH.

FIGURA 21. EFECTE DE L'EXTRACTE BULLIT SOBRE
L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA DE
MUSCUL DE RATA

Es representa la desaparició de la glucosa
1,6-bisfosfat del medi d'incubació en funció
del temps.

(Δ) Extracte.

(\square) Precipitat de sulfat amònic.

(\blacksquare) Precipitat de sulfat amònic + extracte
bullit.

(\blacktriangle) Extracte bullit.

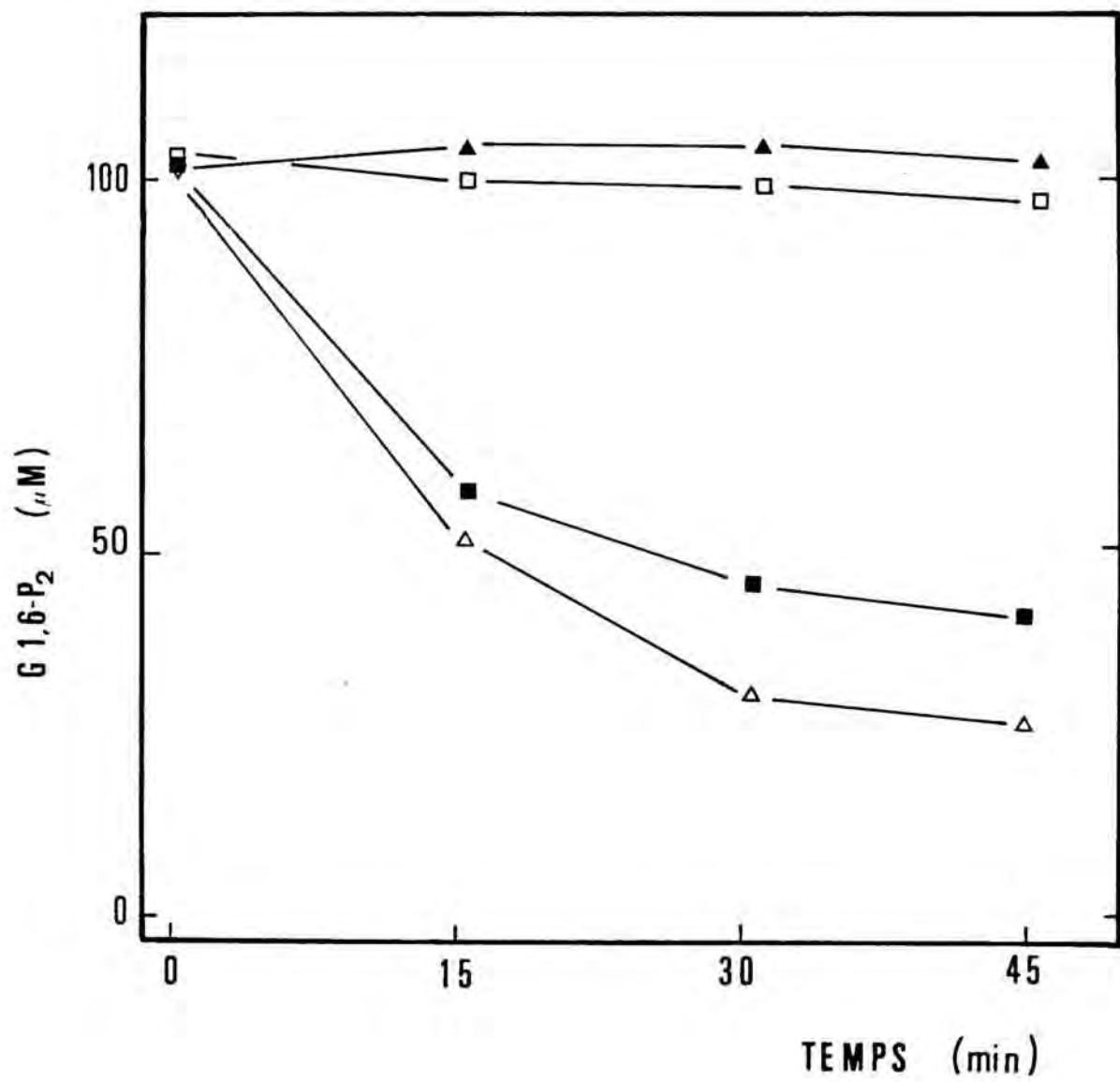


FIGURA 22. PRESENCIA D'UN ACTIVADOR DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA EN L'EXTRACTE BULLIT DE MUSCUL DE RATA. EFECTE DE LA CONCENTRACIO

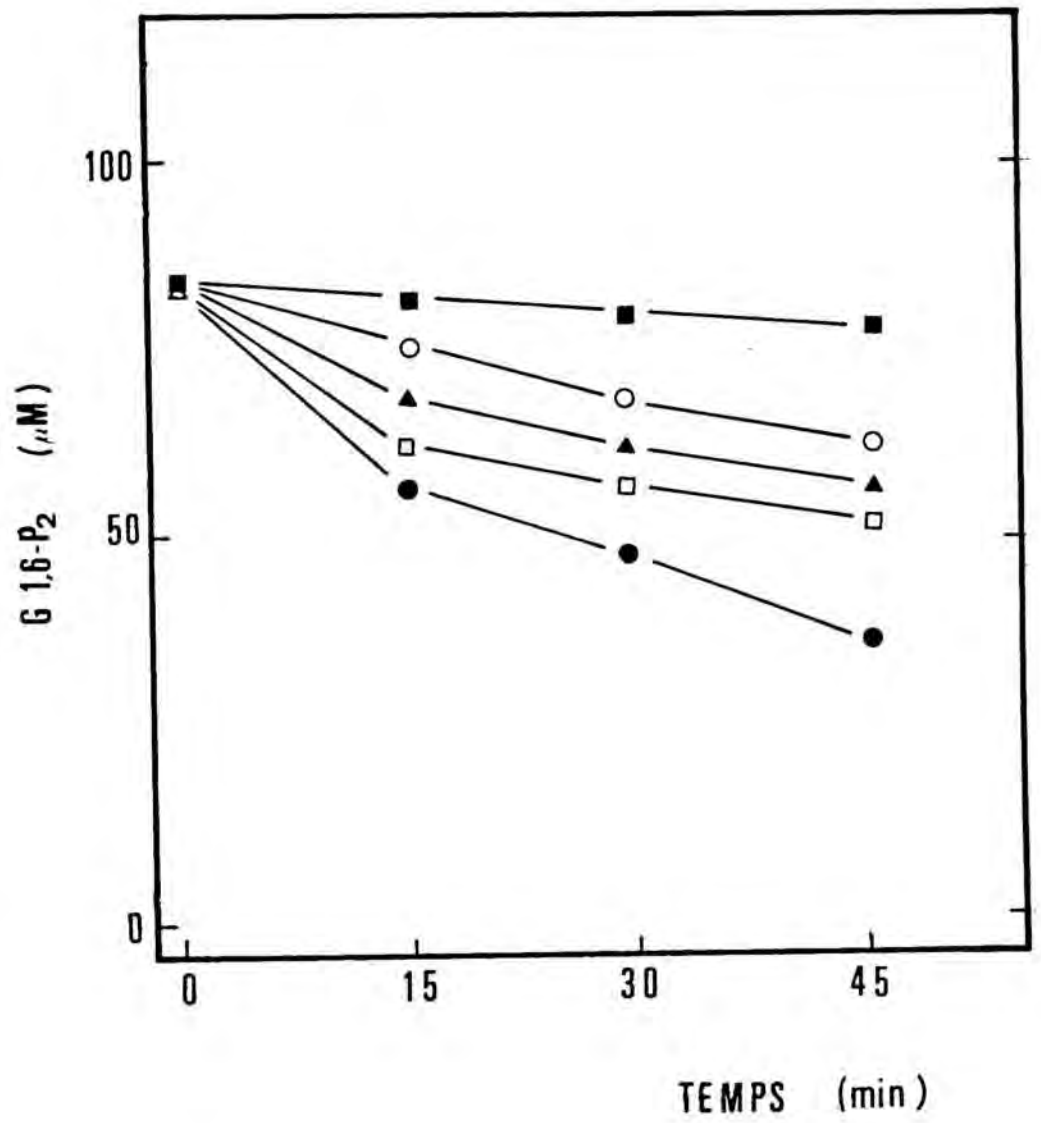
(■) Precipitat de sulfat amònic.

(○) Precipitat de sulfat amònic + extracte bullit dilució 1/4.

(▲) Idem, dilució 1/3.

(□) Idem, dilució 1/2.

(●) Idem, dilució 1/1.



Per altra banda, a 1 ml de l'extracte bullit se li van afegir 20 μ l de NaOH 5 M (concentració final 0,1 M) i es va escalfar a 100°C durant 5 minuts. Immediatament, la mostra es va refredar en gel, es va centrifugar i es va neutralitzar amb HCl.

L'extracte bullit després del tractament àcid i alcalí, va ésser assajat sobre el precipitat de sulfat amònic tal com s'ha esmentat prèviament. Els resultats van mostrar que es tractava d'un compost totalment estable als dos tractaments.

2.- Tractament amb charcoals: El charcoals és capaç d'adsorbir els nucleòtids degut a la seva afinitat per les bases nitrogenades. 1,5 ml de l'extracte bullit van ésser tractats amb 150 mg de charcoals activat durant 30 minuts amb agitació continua. Tot seguit va ésser centrifugat a 15000 rpm durant 15 minuts i es tornava a repetir el tractament. L'eficàcia del procés es seguia determinant l'absorbància a 260 i 280 nm. El tractament amb charcoals, tal com es presenta a la figura 23, elimina en gran part l'efecte activador de l'extracte bullit.

Es va fer aleshores un tractament del charcoals per eluir el possible activador que s'hi hagués quedat adsorbit. El procés va ésser el següent: el sediment de charcoals procedent del primer tractament de l'extracte bullit va ésser resuspès en 0,5 ml d'una solució d'etanol al 50% i amoniac al 0,5%. Aquest tractament és capaç de separar els nucleòtids

adsorbits al carbó actiu. La mostra es va deixar amb agitació vigorosa durant 60 minuts a temperatura ambient. Seguidament es va centrifugar a 15000 rpm durant 10 minuts en una centrífuga Eppendorf. La relació d'absorbàncies a 260 nm/280 nm en comparació amb l'absorbància de l'extracte bullit original va permetre establir que l'elució dels nucleòtids havia estat parcial (30-40%). En quant a l'efecte activador, s'ha de resaltar que es logra, almenys parcialment, restaurar-lo.

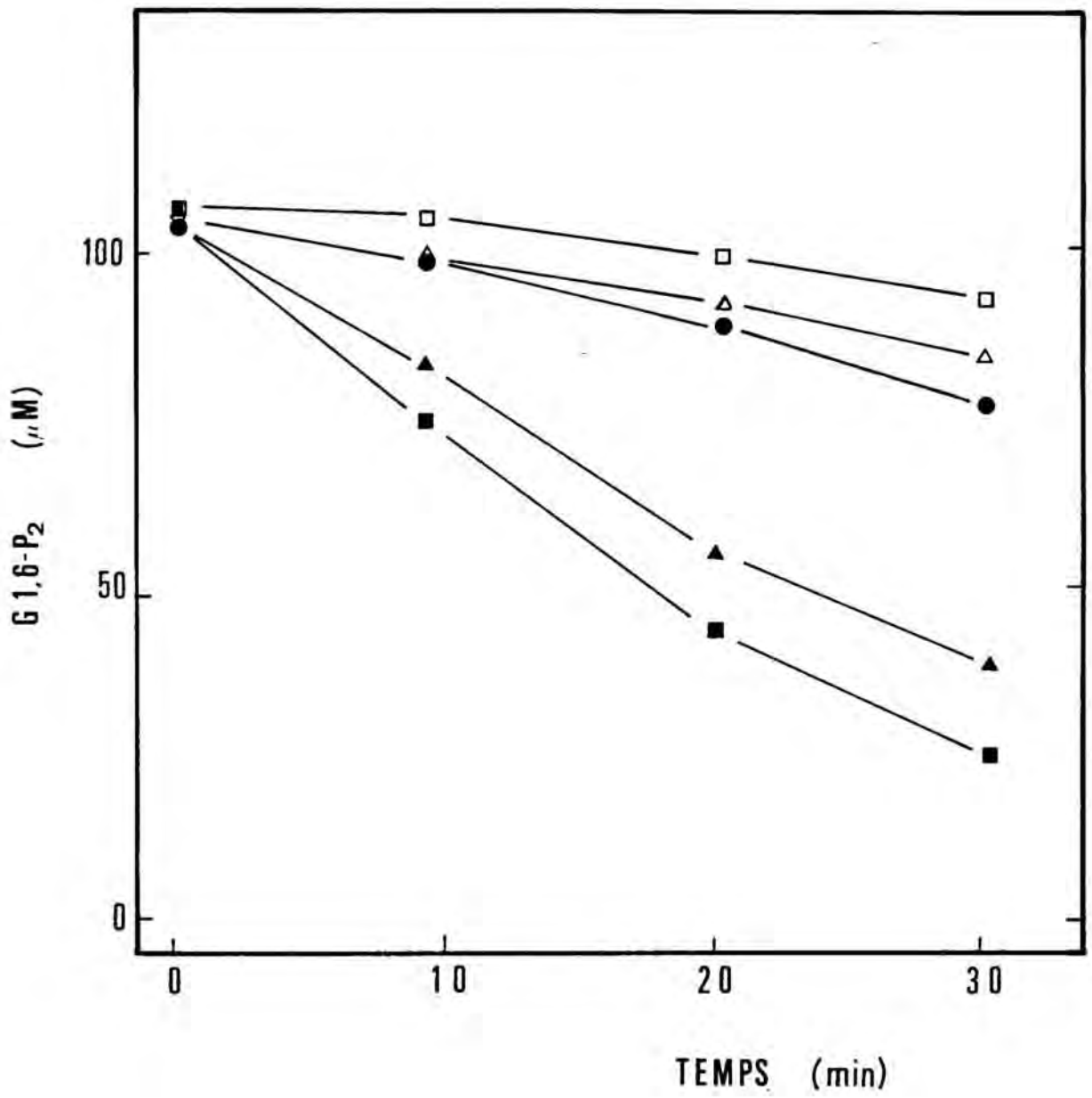
3.- Tractament amb Dowex AG-1-X8: Aquest intercanviador reté els compostos carregats negativament. El tractament es va fer de la següent manera: a 1 ml de resina se li va afegir 0,5 ml de l'extracte bullit. Els dos components es van deixar en contacte durant 30 minuts amb agitació. Posteriorment es va centrifugar a 2000 rpm durant 5 minuts i el líquid sobrenedant es va extreure i es va assajar el seu efecte activador sobre el precipitat de sulfat amònic. Els resultats es presenten a la figura 23 i mostren que el tractament amb aquesta resina fa desaparèixer parcialment l'efecte activador.

Es va intentar també eluir de la resina aquells compostos que havien quedat retinguts. Per a aconseguir-ho, la resina procedent del tractament de l'extracte bullit va ésser tractada amb 0,5 ml de HCl 0,1 M. Aquesta preparació es va deixar durant 60 minuts amb agitació vigorosa. Seguidament es va centrifugar a 2000 rpm durant 5 minuts i es va recollir el líquid sobrenedant, que va ésser immediatament neutralitzat

FIGURA 23. TRACTAMENT DE L'EXTRACTE BULLIT AMB CHARCOAL I DOWEX AG-1-X8 I EL SEU EFECTE SOBRE L'ACTIVACIO DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA

El precipitat de sulfat amònic es va incubar en presència de:

- (□) Medi d'homogenització.
- (■) Extracte bullit.
- (△) Extracte bullit tractat amb charcoal.
- (▲) Solució extreta del charcoal amb etanol/
NH₃.
- (●) Extracte bullit tractat amb Dowex AG-1-X8



amb NaOH. Els resultats obtinguts van demostrar que l'efecte activador es recuperava parcialment.

4.- Tractament amb fosfatasa alcalina: Es tractava de comprovar si l'activador tenia algun enllaç tipus éster fosfat que fos susceptible d'hidròlisi per aquesta fosfatasa. El tractament es va fer amb fosfatasa alcalina tipus I d'intestí de vaca: 435 µl de l'extracte bullit es van tractar amb 10 µl (2 U) de fosfatasa alcalina en presència de 5 µl de clorur magnèsic 250 mM i 50 µl d'una solució amortidora de Tris 1 M ajustada a pH 8,0 amb àcid clorhídric. La incubació es va realitzar a 30°C durant 30 minuts i la reacció es va aturar per ebullició a 100°C durant 10 minuts. La mostra es va refredar ràpidament, es va centrifugar i es va assajar el seu efecte activador sobre un precipitat de sulfat amònic, tal com s'ha esmentat prèviament. Simultàniament es van realitzar els controls adients i una incubació de la preparació de fosfatasa alcalina amb p-nitrofenilfosfat. Els resultats van mostrar que el tractament amb fosfatasa alcalina no afecta de manera significativa l'activació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa provocada per l'extracte bullit.

En vista dels resultats obtinguts, es pot concloure que l'activador de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa present a l'extracte bullit és presumiblement de naturalesa nucleotídica i que conté un sol grup fosfat o potser no en conté.

Es va assajar aleshores l'efecte de diversos nucleòtids sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Es van incloure nucleòtids pirimidínics i purínics, amb diferent nombre de fosfats, i també nucleòsids.

Els resultats obtinguts es mostren a la taula 13, de la qual es desprèn que sembla ésser que els nucleòtids que posseeixen el nucli de guanina són els més capaços d'estimular l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, encara que cap d'ells arriba a fer-ho amb la mateixa potència que l'extracte bullit.

En quant a la utilitat que representava l'ús d'aquest extracte especialment en el que fa referència en el seguiment de l'activitat al llarg dels processos cromatogràfics, es va realitzar una columna de bescanvi iònic en DE-cel.lulosa en les mateixes condicions que les esmentades en l'apartat anterior. Es va seguir l'elució de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa mitjançant l'assaig espectrofotomètric en presència i absència de l'extracte bullit. A causa de la baixa activitat que presentaven els extracte i a que l'efecte activador no és molt gran, no es va identificar cap nou pic que hagués passat desapercebut en anteriors experiments.

Hem de comentar aquí que l'assaig radioactiu dissenyat per nosaltres també va ésser aplicat a l'estudi de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul de rata. Ara bé, s'ha de recalcar que era impossible assajar l'activitat d'extracte no dialitzats amb aquest mètode degut

TAULA 13. EFECTE DE DIVERSOS NUCLEÒTIDS I
NUCLEÒSIDS DOBRE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-
BISFOSFAT FOSFATASA

El precipitat de sulfat amònic es va incubar en presència de la concentració indicada del nucleòtid. Els resultats es donen com a percentatge d'activació respecte a la causada per l'extracte bullit.

NUCLEÒTID	ACTIVACIÓ (%)
EXTRACTE BULLIT	100
INOSINA (1 mM)	0
IMP (0,05-1 mM)	0-5
TIMIDINA (1 mM)	0
CITIDINA (1 mM)	0
CTP (0,05-0,5 mM)	10-20
URIDINA (1 mM)	0
UTP (0,05-0,5 mM)	10-20
ADENOSINA (1 mM)	80
AMP (0,1-0,5 mM)	30-40
ADP (0,1-0,5 mM)	30-40
ATP (1-5 mM)	20-30
AMP cíclic (0,05-0,1 mM)	20-30
GUANOSINA (1 mM)	80
GMP (0,25-1 mM)	80-90
GDP (0,25-1 mM)	80-90
GTP (0,25-1 mM)	80-90
GMP cíclic (0,05-0,25 mM)	50-90

a l'existència d'una activitat fosfoglucomutasa molt elevada juntament amb glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat (a una concentració calculada de 20 i 200 μM respectivament). Aquest enzim, en presència de la $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -glucosa 1,6-bisfosfat substrat de l'assaig, provocava un intercanvi isotòpic molt ràpid entre aquestes molècules i això es reflexava com una disminució brusca de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat a l'assaig, simultàniament a un increment de la concentració de les hexoses monofosfat. Això es va comprovar quan es va incubar fosfoglucomutasa comercial en presència de les esmentades concentració de glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat amb la mescla de reacció que contenia $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -glucosa 1,6-bisfosfat. El resultat mostrava clarament que la fosfoglucomutasa era capaç realment de produir aquest intercanvi.

3.3.3. ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA DE LA FOSFOGLUCOMUTASA DE MÚSCUL ESQUELÈTIC

Com ja s'ha comentat a la Introducció, la fosfoglucomutasa, l'enzim que interconverteix la glucosa 6-fosfat i glucosa 1-fosfat, manifesta una activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa com a conseqüència del seu mecanisme de reacció. Aquesta capacitat catalítica es manifesta quan el fosfoenzim format a partir de la transferència del grup fosfat des de la glucosa 1,6-bisfosfat a l'enzim, s'hidrolitza i el fosforil, en absència d'un acceptor de fosfats més favorable, és transferit a l'aigua (9).

Aquesta activitat hidrolítica de la fosfoglucomutasa és molt baixa en relació amb la seva activitat mutasa i inclús alguns autors han postulat que no era detectable en absència de l'activador xilosa 1-fosfat (43). Aquest compost és un potent activador de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa a causa de que la seva estructura és semblant a la del substrat glucosa 1-fosfat, però sense capacitat per acceptar el grup fosforil cedit per l'enzim.

El nostre propòsit va ésser determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa de múscul esquelètic en presència i absència de xilosa 1-fosfat i intentar deduir si podria representar un paper important en el metabolisme de la glucosa 1,6-bisfosfat en la cèl.lula.

Per a la determinació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa es va utilitzar sempre el mètode radioactiu basat en la utilització del substrat [^{14}C]-glucosa 1,6-bisfosfat i la detecció dels productes mitjançant cromatografia de bescanvi iònic en paper.

Es va utilitzar en primer lloc fosfoglucomutasa comercial procedent de múscul de conill i es va determinar la seva activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. El procediment va ésser el següent: 50 μl de fosfoglucomutasa es van dessalar mitjançant el seu pas a través de Sephadex G-25 (apartat 2.12.2.) i es va fer una dilució 1:4 amb solució

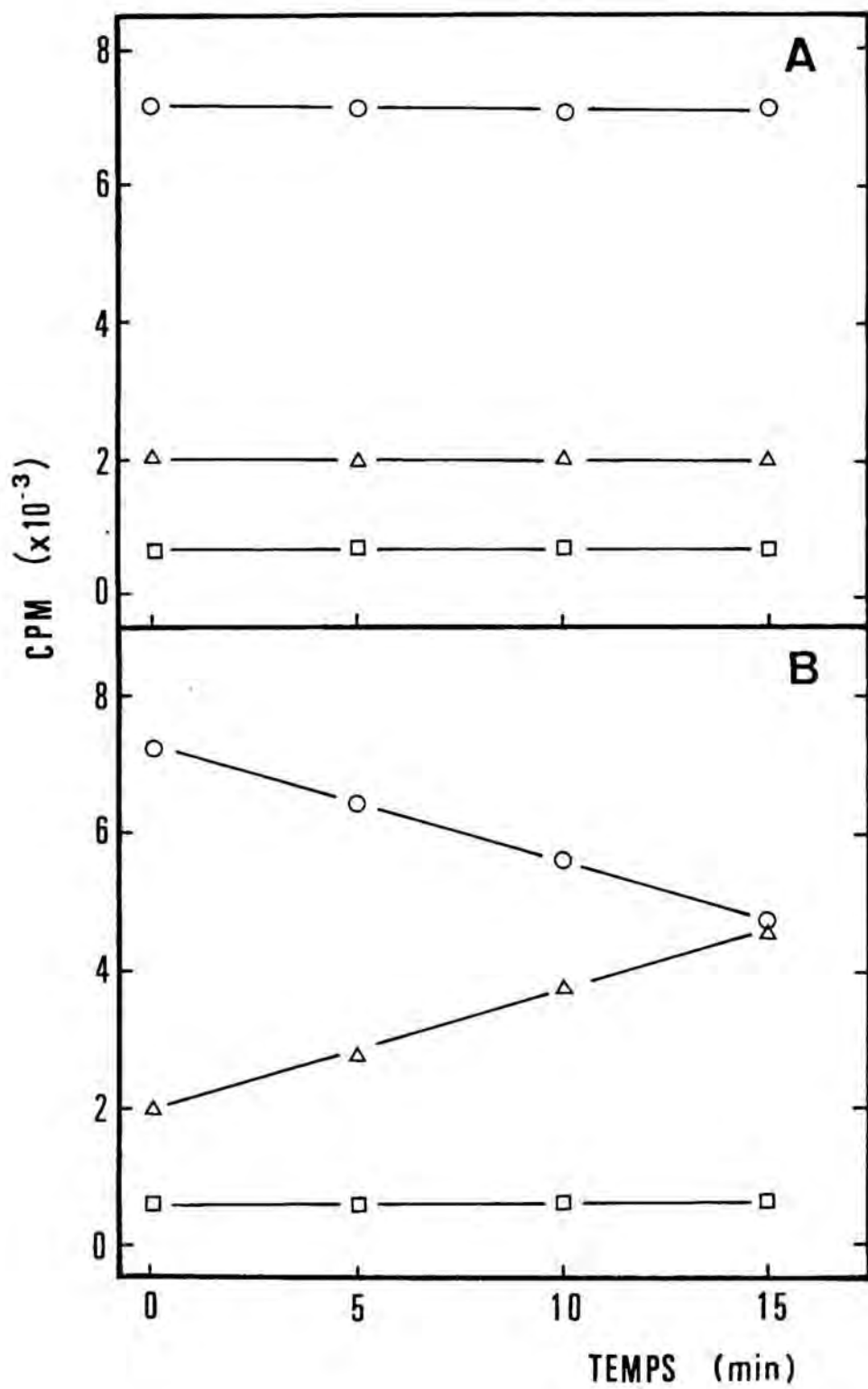
amortidora de Tris 20 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic en presència de β -mercaptoetanol 2 mM. La mostra enzimàtica preparada d'aquesta manera es va assajar segons està descrit a l'apartat 2.3.1.3., utilitzant una ¹⁴[U C]-glucosa 1,6-bisfosfat de 7500 cpm/nmol. La reacció es va portar a terme en absència i presència de xilosa 1-fosfat 1 mM. Prèviament es va comprovar que la xilosa 1-fosfat no modificava el comportament cromatogràfic dels diferents sucres. El resultat es mostra a la figura 24. Com es pot apreciar, la fosfoglucomutasa no presenta activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en absència de xilosa 1-fosfat, però sí en presència de l'activador.

Malgrat això, si s'assajava l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa sense xilosa 1-fosfat però utilitzant una concentració més elevada de fosfoglucomutasa i incubant temps més llargs, l'activitat fosfatasa era perfectament detectable i es va calcular de l'ordre de 0,09 mU/mg proteïna, mentre que en presència de xilosa 1-fosfat era de 1,60 mU/mg. Per tant, l'activació provocada per la xilosa 1-fosfat és de unes 20 vegades. L'activitat fosfoglucomutasa de la mateixa preparació es va calcular en 103 U/mg proteïna.

La relació d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa / glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa obtinguda va ésser, doncs, 1/15/1000000. La relació glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa era 1/70000.

FIGURA 24. EFECTE DE LA XILOSA 1-FOSFAT SOBRE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA DE LA FOSFOGLUCOMUTASA

Es va determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa d'una preparació de fosfoglucomutasa comercial en absència (panel A) i presència de xilosa 1-fosfat 1 mM (panel B). L'enzim es va dessalar prèviament. La determinació d'activitat es va fer segons el mètode radioactiu, el qual mostra la radioactivitat present a la glucosa 1,6-bisfosfat (○), glucosa monofosfat (△) i glucosa (□).



Tal com s'observa a la figura 25, l'efecte activador de la xilosa 1-fosfat era dependent de la seva concentració, de manera que la K_a és de l'ordre de 50 μM . No s'observaven fenòmens d'inhibició a concentració fins 1 mM.

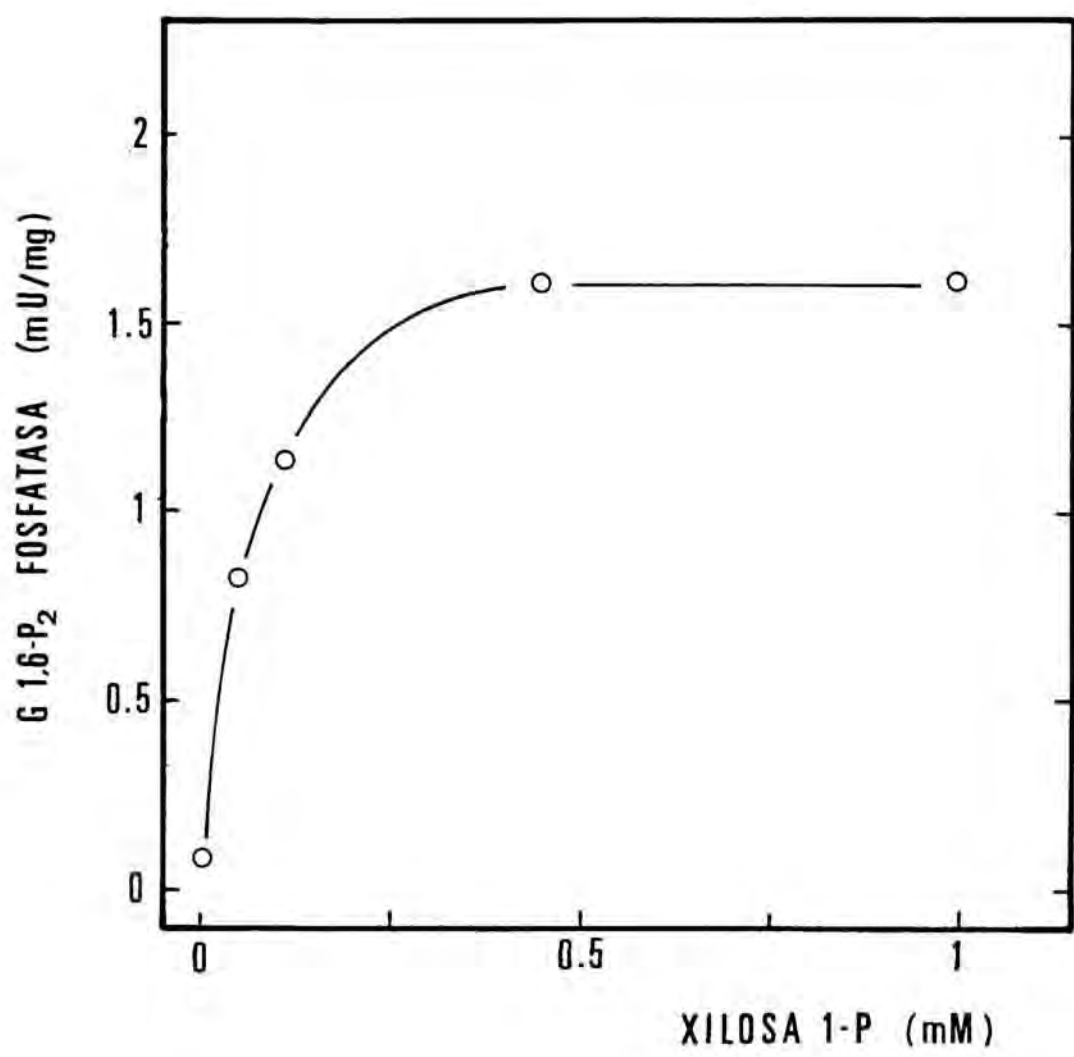
Per altra banda, es va determinar l'efecte de l'anió vanadat sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa. Es conegut que la fosfoglucomutasa, com altres transferases i enzims que actuen a través de la formació d'un fosfoenzim intermediari, és fortament inhibida per el vanadat. Això és degut a que aquest anió adopta una configuració espacial trigonal anàloga a la que posseeix el grup fosforil i, d'aquesta manera, pot ocupar en el centre actiu una posició anàloga a la que ocuparia aquest grup. L'interès d'aquest estudi sobre l'efecte del vanadat sobre les activitat colaterals de la fosfoglucomutasa, radica en que permet treure conclusions sobre el mecanisme de reacció detallat d'aquest enzim.

Es va utilitzar en tots els casos el mètode radioactiu, ja que l'espectrefotomètric era inservible degut a la inhibició pel vanadat de la fosfoglucomutasa que s'utilitza per a la determinació posterior de la glucosa 1,6-bisfosfat. Per altra banda, el mètode colorimètric basat en la quantificació del fosfat inorgànic alliberat no gaudeix de suficient sensibilitat.

El mètode va ésser el següent: el dia abans de la realització de l'experiment es va preparar una solució de

FIGURA 25. EFECTE DE LA XILOSA 1-FOSFAT SOBRE
L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA DE
LA FOSFOGLUCOMUTASA

Es va determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa d'una preparació comercial de fosfoglucomutasa procedent de múscul de conill. L'enzim es va dessalar prèviament. La determinació de l'activitat es va fer mitjançant el mètode radioactiu.



monovanadat sòdic (NaVO_3) 25 mM i es va deixar reposar tota la nit a temperatura ambient. Aquesta precaució es feia per evitar la formació amb el temps de complexes com el decavanadat. Sempre es van utilitzar solucions de vanadat preparades extemporàniament.

20 μl de fosfoglucomutasa comercial de múscul de conill prèviament dessalada es van preincubar amb vanadat de manera que les concentracions finals de l'anió van ésser: 0, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 i 4200 μM . La preincubació de les mostres es va realitzar a 37°C durant 10 minuts. Passat aquest temps es van afegir 20 μl de la mescla de reacció que contenia el substrat [U-¹⁴C]-glucosa 1,6-bisfosfat i la incubació es va allargar durant 30 minuts.

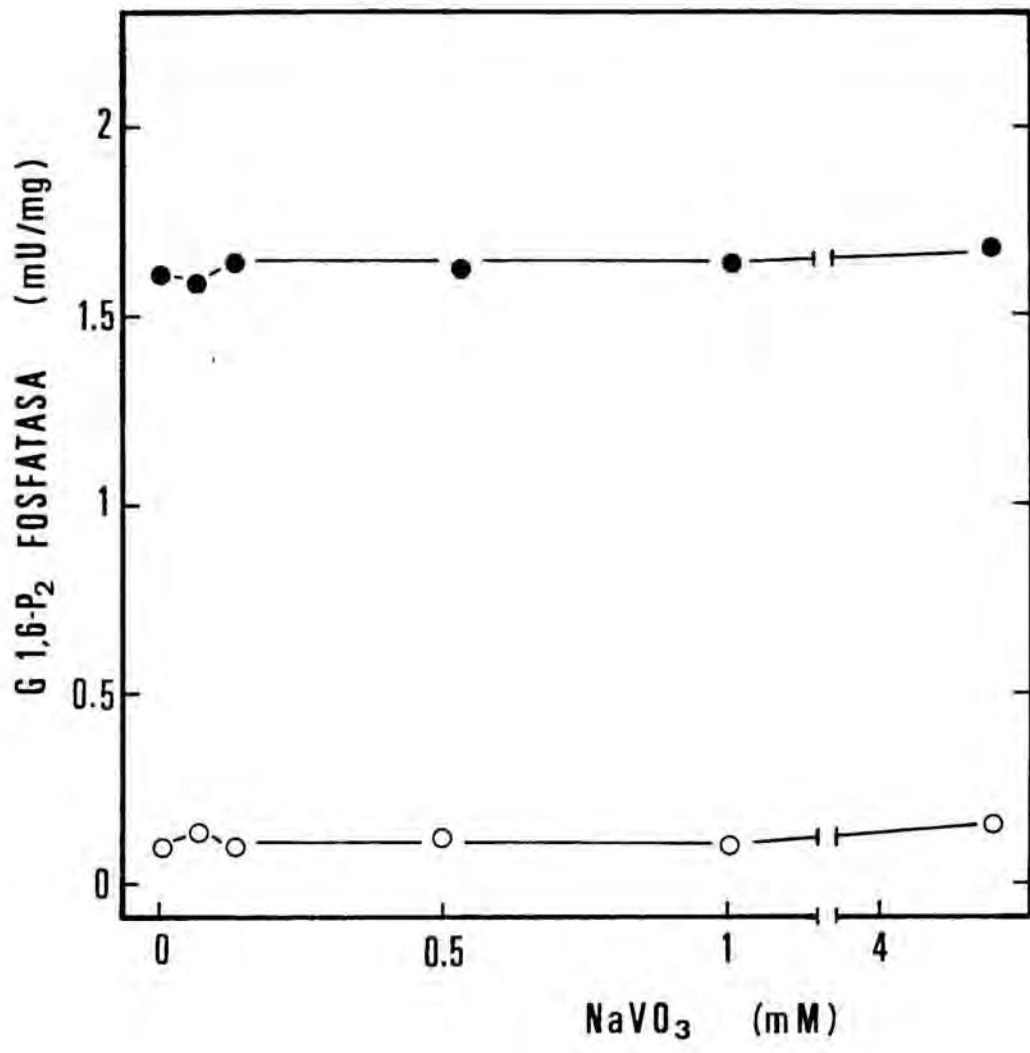
Els resultats van demostrar que el vanadat no afecta en absolut l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa en contraposició a l'activitat mutasa. L'efecte de l'anió sobre l'activitat mutasa es va determinar afegint vanadat a la cubeta de l'espectrefotòmetre fins a la concentració final desitjada. S'ha de senyalar que el vanadat absorbeix a 340 nm, longitud d'ona a la qual es realitza la determinació i, per tant, s'han de restar els blancs corresponents. Es va determinar també la influència del vanadat sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada per xilosa 1-fosfat. La xilosa 1-fosfat es va afegir, juntament amb la mescla de reacció, després de la preincubació prèvia amb l'efector. Els resultats, que es mostren a la figura 26, indiquen que no hi ha cap efecte

sobre l'enzim activat ni tampoc en l'activació a diferents concentracions de xilosa 1-fosfat.

També es va assajar l'efecte del vanadat sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa d'un extracte de múscul de rata. Un extracte prèviament dialitzat es va preincubar en presència de concentracions creixents de vanadat seguint un protocol similar al comentat per la fosfoglucomutasa purificada. Els resultats mostren que tampoc la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en extracte és afectada per la presència de vanadat.

FIGURA 26. EFECTE DEL VANADAT SOBRE
L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA DE
LA FOSFOGLUCOMUTASA

L'enzim, prèviament dessalat, es va preincubar durant 10 minuts amb les concentracions indicades de vanadat. Després d'aquest temps, es va determinar l'activitat fosfatasa mitjançant el mètode radioactiu en absència (○) i presència (●) de xilosa 1-fosfat 1 mM.



3.4. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UNA ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA ESPECÍFICA A PARTIR DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PORC

L'intent de purificació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic de porc ens va permetre identificar una activitat hidrolítica important a pH neutre sobre glucosa 1-fosfat, que en el primer pas de purificació (DE-cel.lulosa) anava associada a l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa però que, en un pas posterior (Sephrose 4B-glucosamina 6-fosfat) quedava pràcticament exenta d'activitat sobre altres substrats.

Aquesta raó, juntament amb el fet que no existia a la bibliografia pràcticament cap referència a aquest tipus d'activitat enzimàtica en teixits de mamífer, va fer que aprofondíssim en la purificació i caracterització d'aquest enzim.

3.4.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA EN EXTRACTES MUSCULARS

La determinació de l'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa en extracte era difícil degut a la presència de fosfoglucomutasa, la qual té una activitat aproximada de 200-250 U/g teixit. Aquest enzim transformaria la glucosa 1-fosfat a glucosa 6-fosfat fins arribar a les concentracions que corresponen a l'equilibri (favorable a la formació de glucosa 6-fosfat) amb la qual cosa es mesurarien simultàniament les activitat hidrolítiques sobre glucosa 1-

fosfat i glucosa 6-fosfat.

Per evitar aquest problema, es va mesurar l'activitat fosfatasa en presència de vanadat sòdic 10 mM, el qual és un potent inhibidor de la fosfoglucomutasa, mentre que no afecta a l'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa purificada, com s'havia comprovat prèviament. Per a la determinació es va fer, doncs, una preincubació de l'extracte en presència de vanadat a la concentració desitjada durant 15 minuts i es va determinar l'activitat fosfatasa després d'una incubació de 60 minuts mitjançant la determinació del fosfat alliberat. El vanadat no interfereix amb aquest mètode. En presència de vanadat 10 mM i mantenint la mateixa relació de concentracions inhibidor:proteïna, l'activitat mutasa va resultar ésser de <0,3% de l'original, en absència de glucosa 1,6-bisfosfat.

Les activitats trobades van ésser de 39 mU, 26 mU i 12 mU per g de teixit sobre els substrats següents: glucosa 1-fosfat, galactosa 1-fosfat i mannososa 1-fosfat.

3.4.2. PURIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA

L'extracte cru procedent de 600 g de múscul esquelètic de porc va ésser preparat tal com es descriu a l'apartat 2.6.1..La preparació obtinguda després de la centrifugació a 35000 x g va ésser processada com es descriu a continuació. Tots els passos van ésser duts a terme a 4°C.

3.4.2.1. PRECIPITACIÓ AMB SULFAT AMÒNIC

L'extracte cru obtingut es va precipitar mitjançant l'addició d'una solució de sulfat amònic saturada i neutralitzada fins arribar a una concentració final del 80%. La suspensió obtinguda es va deixar reposar a 4°C durant un mínim de 2 hores i el precipitat es va recollir mitjançant centrifugació a 7000 x g durant 30 minuts. Tot seguit es va ressuspendre en una solució de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic i es va dialitzar durant una nit contra el mateix tampó.

3.4.2.2. CROMATOGRAFIA DE BESCANVI IÒNIC EN DE-CEL.LULOSA

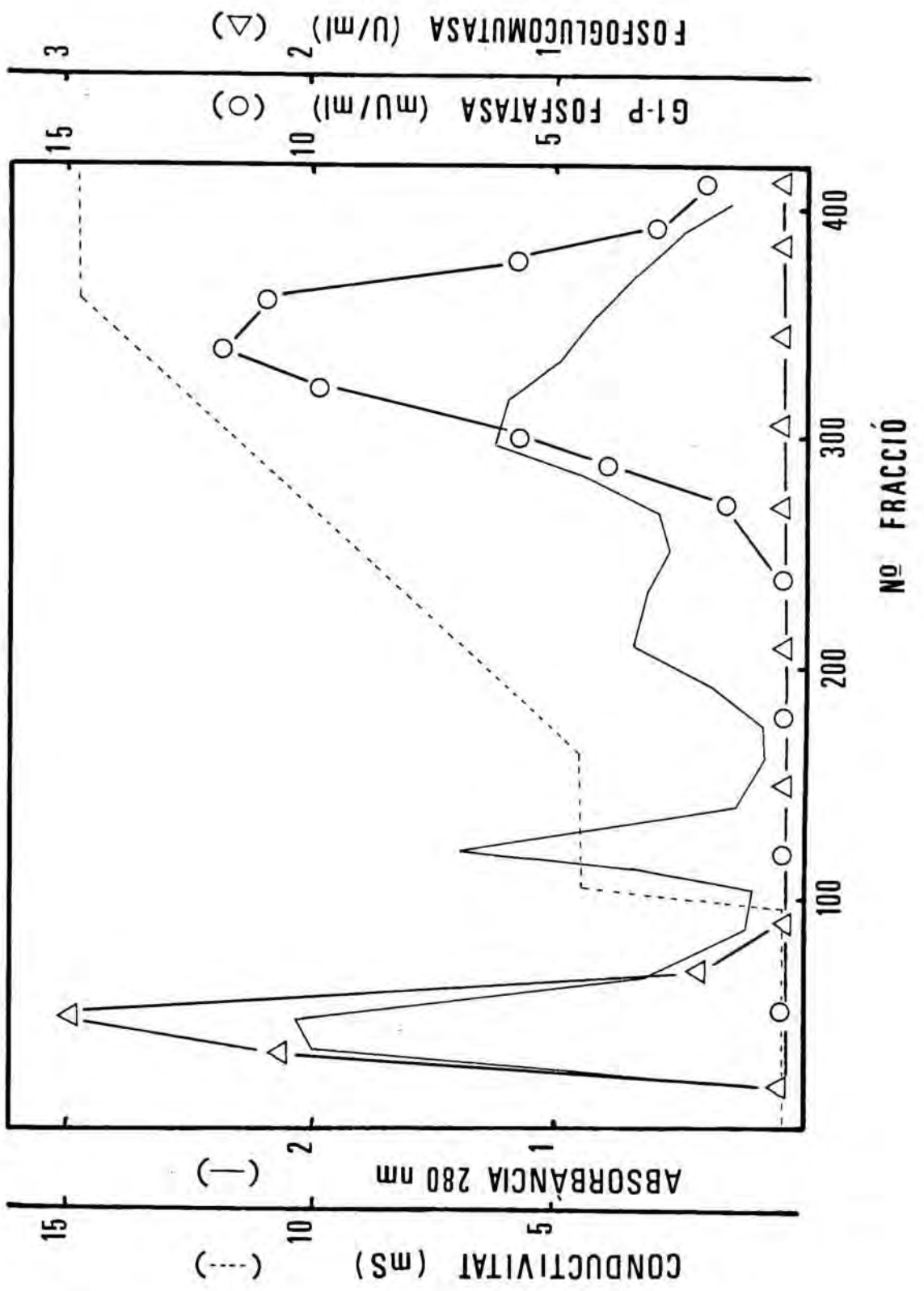
La solució obtinguda va ésser aplicada a una columna de DE-cel.lulosa (3 x 25 cm) prèviament equilibrada amb la mateixa solució d'homogenització a una velocitat de flux de 45 ml/h. A continuació es va rentar la columna amb la mateixa solució fins que l'absorbància que presentaven les fraccions a 280 nm era més petita de 0,05 i posteriorment amb la mateixa solució a una concentració de Tris de 100 mM. Finalment es va aplicar un gradient linial de 1250 ml d'una solució de Tris-acetat entre 100 i 300 mM en presència de β -mercaptoetanol 2 mM i a pH 7,5. El flux de la columna va ésser de 45 ml/h i es van recollir fraccions de 5 ml.

El perfil d'elució de la columna es presenta a la figura 27, en la que s'observa com l'activitat mesurada utilitzant glucosa 1-fosfat com a substrat elueix com un sol

FIGURA 27. PERFIL CROMATOGRÀFIC EN DE-
CEL.LULOSA DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1-FOSFAT
FOSFATASA DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PORC

L'extracte muscular va ésser precipitat amb sulfat amònic i aplicat a una columna (3 x 13 cm) de DE-cel.lulosa. El flux va ésser de 45 ml/h i es van recollir fraccions de 3 ml.

Es va determinar l'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa i fosfoglucomutasa.



pic en el gradient a una concentració de 240 mM. S'observa que s'aconsegueix una completa separació de l'activitat fosfoglucomutasa, la qual no és retenida per aquest tipus de resina.

El pic que presentava activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa es va recollir, es van reunir les fraccions (320 ml) i es van precipitar mitjançant l'addició d'una solució de sulfat amònic saturada i neutralitzada fins assolir una concentració final del 80%. Després de 90 minuts, el precipitat va ésser recollit per centrifugació (7000 x g, 30 minuts), es va ressuspènere en la mateixa solució d'homogenització i es va dialitzar exhaustivament contra la mateixa solució.

3.4.2.3. CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRACIÓ EN COLUMNA DE SEPHADEX G-150

La preparació procedent de la cromatografia en DE-cel.lulosa, convenientment concentrada i dialitzada, es va repartir en alíquotes i part va ésser aplicada a una columna de gel filtració de Sephadex G-150. La columna (1,5 x 143 cm) va ésser prèviament empaquetada a una velocitat de 10 ml/h utilitzant una solució de Tris 20 mM, EDTA 1 mM, clorur sòdic 100 mM, β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic.

Es van aplicar 2 ml de la mostra (150 mg proteïna) en una solució que contenia clorur sòdic 100 mM i glicerol 5%

per facilitar l'aplicació de la mostra. La velocitat de flux va ésser de 5 ml/h i es van recollir fraccions d 2 ml. Com es pot veure a la figura 28, l'activitat elueix com una única forma molecular. Les fraccions amb activitat fosfatasa van ésser recollides, reunides, concentrades per ultrafiltració a través de membranes Amicon, i dialitzades enfront del mateix tampó d'homogenització per eliminar l'excés de clorur sòdic.

3.4.2.4. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT EN SEPHAROSE 4B-GLUCOSAMINA 6-FOSFAT

Immediatament després de la diàlisi, la preparació obtinguda va ésser cromatografiada en una columna d'afinitat constituïda per Sepharose 4B-hexametilen-aminosuccinil-glucosamina 6-fosfat. La columna (1 x 4 cm) estava prèviament equilibrada amb una solució de Tris 20 mM β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic a un flux de 20 ml/h.

2,5 ml de mostra (8 mg proteïna) van ésser aplicats a la columna i l'elució es va realitzar mitjançant un gradient discontinu (20, 100 i 300 mM) de solució de Tris ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic en presència de β -mercaptoetanol 2 mM. El flux va ésser de 20 ml/h i es van recollir fraccions de 2 ml. L'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa eluïa a una concentració de 100 mM, de manera que el pic d'activitat estava lleugerament desplaçat del pic de proteïna, tal com es pot observar a la figura 29. Aquesta característica permetia obtenir preparacions d'elevada activitat específica. Amb el rentat a 300 mM pràcticament no eluïa més activitat

FIGURA 28. CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRACIÓ EN
SEPHADEX G-150 DE LA GLUCOSA 1-FOSFAT
FOSFATASA DE MÚSCUL DE PORC

La mostra (150 mg proteïna) va ésser aplicada a la columna (1,5 x 143 cm). Es va eluir amb una solució de Tris 20 mM, EDTA 1 mM, clorur sòdic 100 mM, β -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic. La velocitat va ésser de 5 ml/h i es van recollir fraccions de 2 ml.

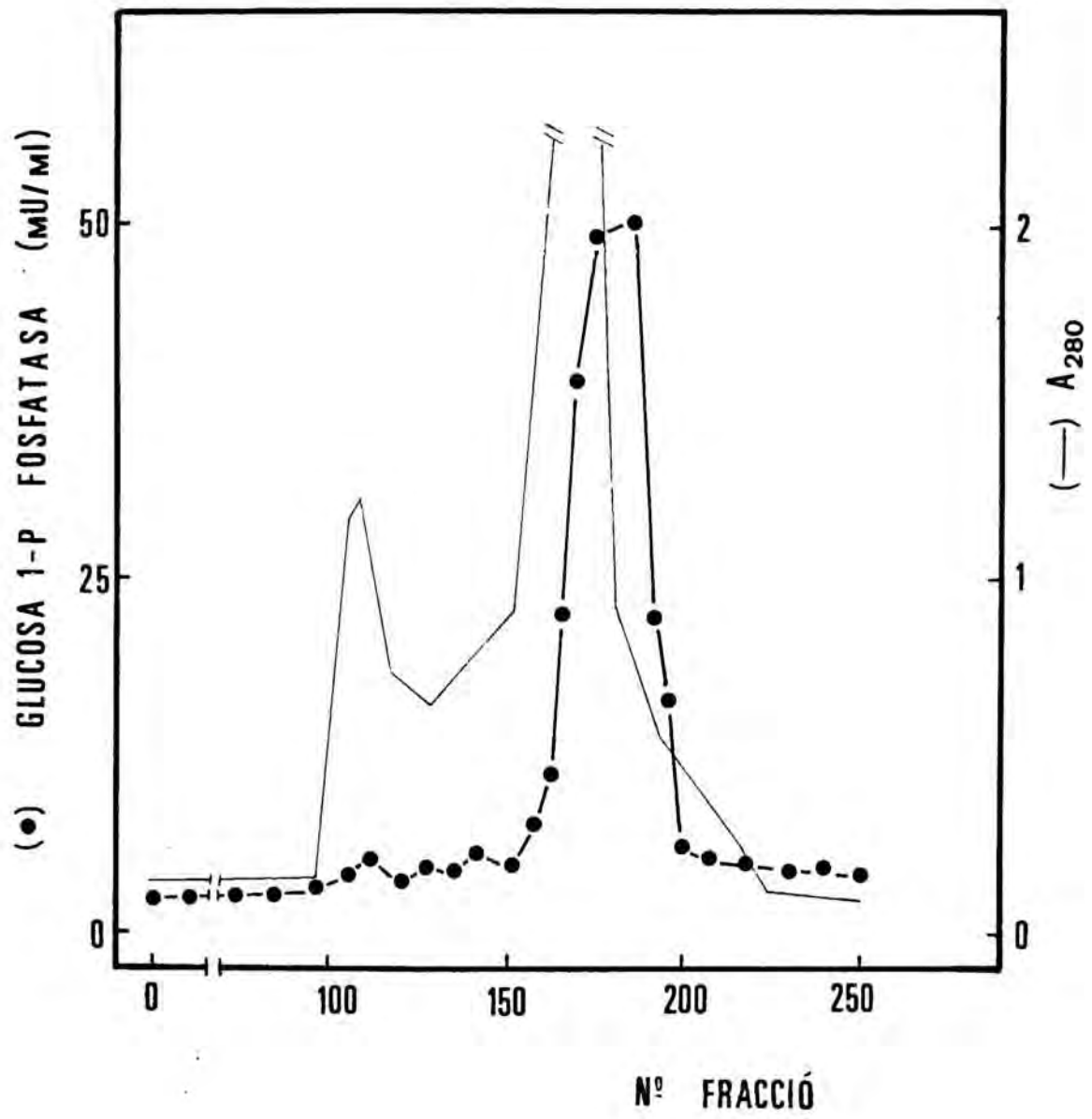
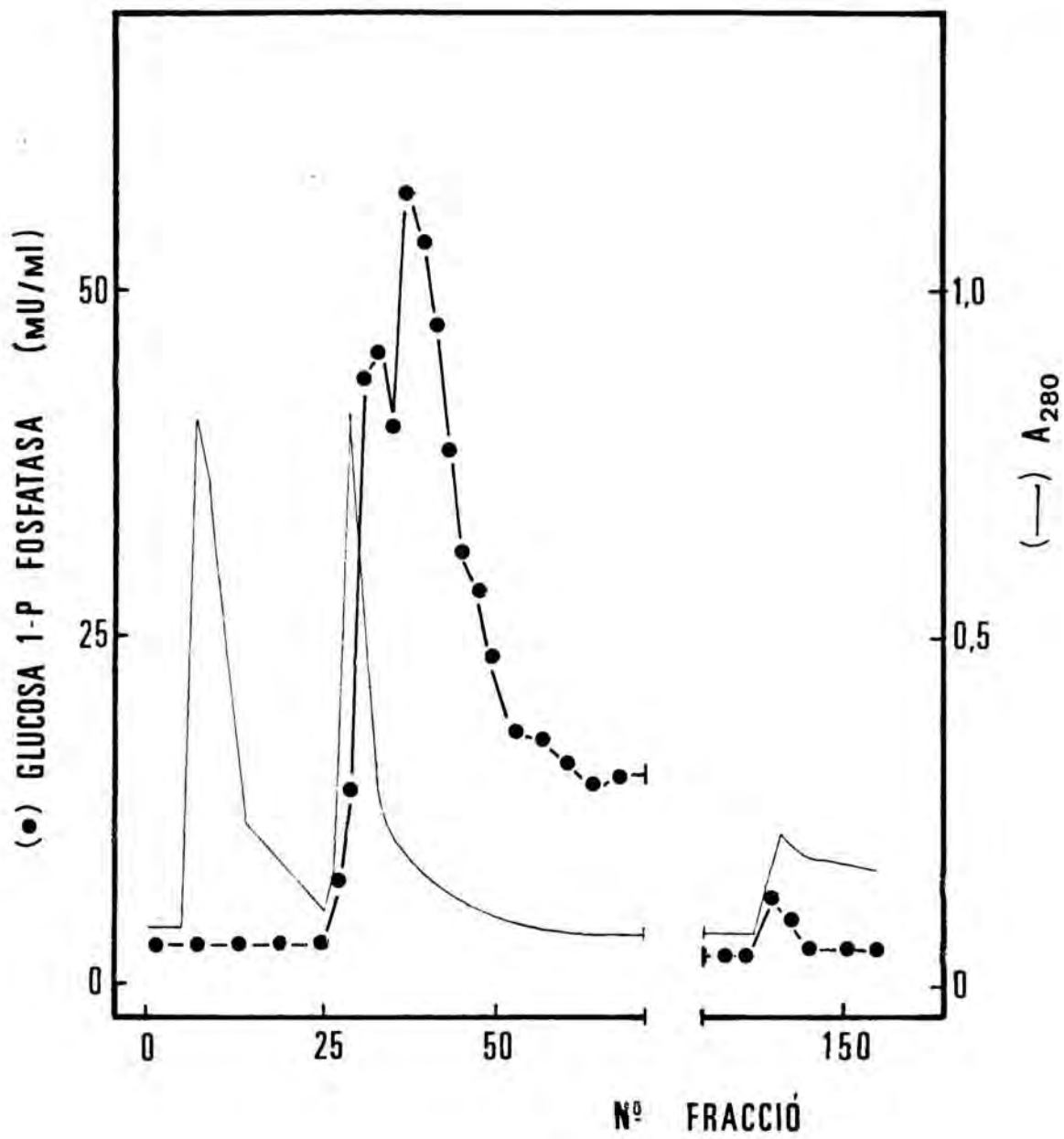


FIGURA 29. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT EN
SEPHAROSE 4B-GLUCOSAMINA 6-FOSFAT DE LA
GLUCOSA 1-FOSFAT FOSFATASA

La mostra procedent de la cromatografia de gel filtració, convenientment dialitzada i concentrada, va ésser aplicada a una columna de Sepharose 4B acoblada a glucosamina 6-fosfat. L'elució es va fer mitjançant un gradient discontinu de Tris-acetat pH 7,5 a una concentració de 20, 100 i 300 mM en presència de β -mercaptoetanol 2 mM. La velocitat va ésser de 20 ml/h i es van recollir fraccions de 2 ml.



fosfatasa. Les fraccions que mostraven activitat van ésser recollides, concentrades per ultrafiltració i dialitzades. La taula 14 resumeix els resultats del procediment de purificació.

La preparació final obtinguda era conservada a -80°C en presència de glicerol al 50%. Malgrat aquestes precaucions, l'activitat era molt poc estable, ja que es perdia quasi totalment després de 15 dies. No es va aconseguir una purificació a homogeneïtat, ja que apareixien varies bandes de proteïna (4 o 5) quan es sotmetia la preparació a electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS.

3.4.3. CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL I FUNCIONAL

3.4.3.1. DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR

La determinació del pes molecular es va fer mitjançant cromatografia de gel filtració en Sephadex G-75. La calibració de la columna (1,5 x 150 cm) es va fer amb una mostra que contenia: albúmina sèrica bovina (63 Kd, 10 mg), ovoalbúmina (44 Kd, 10 mg), mioglobina (17 Kd, 10 mg), vitamina B₁₂ (3 mg) i blau dextrà en un volum de 2,5 ml en presència de NaCl 100 mM i glicerol 5%. El flux va ésser de 5 ml/h i es van recollir fraccions de 2 ml.

Per a la determinació del pes molecular de la glucosa 1-fosfat fosfatasa es va aplicar a la columna prèviament

TAULA 14. PURIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT
ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA DE MÚSCUL DE
PORC

Es va utilitzar com a substrat glucosa 1-
fosfat.

	■U/ml	■l	UNITATS	■g prot/■l	■U/■g	RENDIMENT PURIFICACIO
EXTRACTE	98,9	1675	165,66	79,00	1,25	100
DE-CEL. LULOSA	233,7	320	70,13	6,11	38,26	42
I SULFAT AMONIC	1800,9	47	84,64	17,87	100,78	51
SEPHADEX G-150	4045,4	13	52,81	18,00	224,75	32
SEPH-GLUCOSAMINA 6-P	75,0	78	30,55	0,067	1119,40	18
						900

calibrada 2 ml de la mostra purificada en presència de clorur sòdic 100 mM i glicerol 5%. S'hi afegien 3 mg de vitamina B¹² per assegurar que el comportament de la columna era anàleg al del procés de calibració. El pes molecular obtingut va ésser de 54 Kd, tal com s'observa a la figura 30.

3.4.3.2. ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT

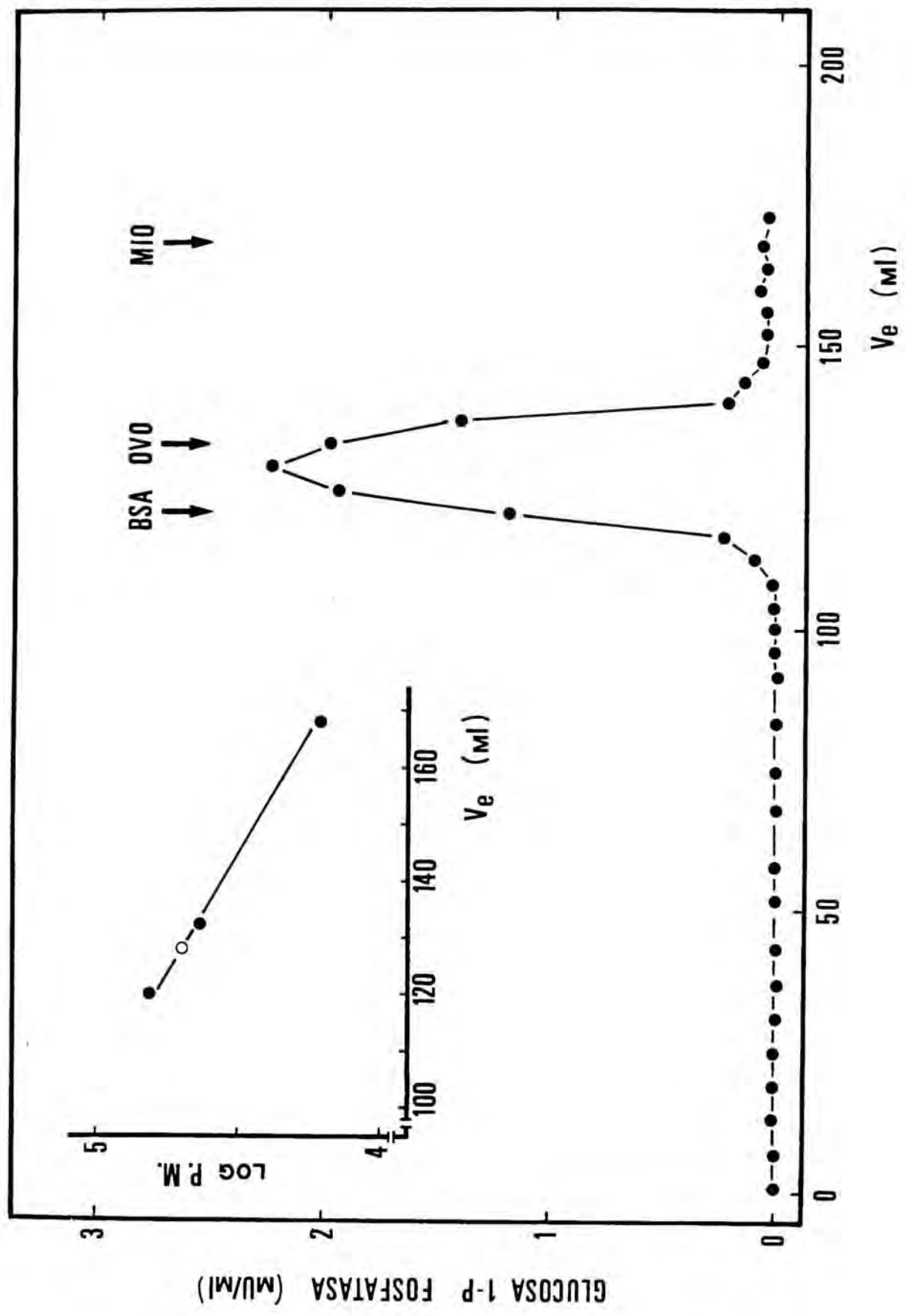
Es va estudiar l'especificitat de substrat de la preparació purificada sobre diversos sucres mono i bisfosforilats, trioses, nucleòtids, p-nitrofenilfosfat i derivats fosforilats d'aminoàcids a pH 7,5. Com s'observa a la taula 15, l'enzim és força específic per a les tres aldohexoses l-fosfat: glucosa l-fosfat, galactosa l-fosfat i, amb menys eficiència, mannososa l-fosfat. La fructosa l-fosfat i les hexoses fosforilades en C⁶ o bisfosforilades no són hidrolitzades significativament. Tampoc ho són els nucleòtids, els aminoàcids fosforilats o el p-nitrofenilfosfat a diversos pH. Les activitat específiques de la preparació purificada sobre glucosa l-fosfat, galactosa l-fosfat i mannososa l-fosfat van ésser 1120, 1030 i 540 mU/mg proteïna.

Per tal de descartar que l'activitat fosfatasa fos una reacció colateral d'altres enzims que poden utilitzar aldohexoses l-fosfat com a substrat, es va assajar l'activitat glicògeno-fosforilasa i galactoquinasa de la preparació. Els resultats van mostrar que no posseïa cap d'aquestes activitat, ni tampoc activitat fosfoglucomutasa.

FIGURA 30. DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR DE
L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA PER GEL
FILTRACIÓ EN SEPHADEX G-75

2 ml de la mostra purificada es van aplicar a una columna de Sephadex G-75 (1,5 x 150 cm) prèviament calibrada. Es van utilitzar com a proteïnes de pes molecular conegut: albúmina sèrica bovina (67 Kd), ovoalbúmina (44 Kd) i mioglobina (17 Kd).

La velocitat de flux va ésser de 5 ml/h.



TAULA 15. ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT DE
L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA

L'activitat fosfatasa es va assajar segons el
mètode d'Itaya. La concentració de substrat
va ésser de 1 mM.

SUBSTRAT	% ACTIVITAT
Glucosa 1-P	100
Glucosa 6-P	3
Glucosa 1,6-P	15
2	
Galactosa 1-P	112
Galactosa 6-P	0
Fructosa 1-P	0
Fructosa 6-P	9
Fructosa 1,6-P ₂	0
Fructosa 2,6-P	0
2	
Manosa 6-P	0
Manosa 1-P	60
Ribosa 5-P	10
Ribulosa 5-P	31
Glicerat 2-P	0
Glicerat 3-P	0
Glicerat 2,3-P	0
2	
Glicerol 1-P	11
Glicerol 2-P	37
Fosfoenolpiruvat	1
Glicolat 2-P	20
Gliceraldehid 3-P	5
p-Nitrofenil-P	
pH 4,8	3
pH 7,5	2
pH 10,5	10
ATP	9
ADP	9
AMP	13
IMP	3
NADP ⁺	0
UDPG	0
Serina-P	0
Tirosina-P	0
Treonina-P	0

Per altra banda, tampoc tenia activitat proteino-fosfatasa quan s'utilitzava glicògeno-fosforilasa a, glicògeno-sintasa o HMG-CoA reductasa com a substrats.

3.4.3.3. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES

Els patrons d'activitat obtinguts en variar les concentracions de glucosa 1-fosfat, galactosa 1-fosfat o mannanosa 1-fosfat seguien en els tres casos una cinètica hiperbòlica. Els valors de K_m , obtinguts a partir de la representació de Lineweaver-Burk van ésser de 0,7 mM, 0,8 mM i 1,25 mM, respectivament (figures 31, 32 i 33).

3.4.3.4. EFECTE DEL PH

La dependència de l'activitat fosfatasa respecte al pH utilitzant els tres substrats es mostra a la figura 34. El pH real de cada incubació es va determinar a 37°C mitjançant un microelectrode adequat per a la determinació del pH en petits volums. El pH òptim va ésser de 7,0-7,2 si s'utilitzava glucosa 1-fosfat o galactosa 1-fosfat com a substrat, mentre que si s'utilitzava mannanosa 1-fosfat, el pic d'activitat era més ample, amb un màxim a 7,4.

3.4.3.5 EFECTE DELS PRODUCTES DE REACCIÓ

El fosfat inorgànic va resultar ésser inhibidor de la reacció quan s'utilitzava glucosa 1-fosfat com a substrat. Es va determinar l'efecte de diferents concentracions de fosfat

FIGURA 31. DETERMINACIÓ DE LA CONSTANT DE
MICHAELIS DE L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA
UTILITZANT GLUCOSA 1-FOSFAT COM A SUBSTRAT

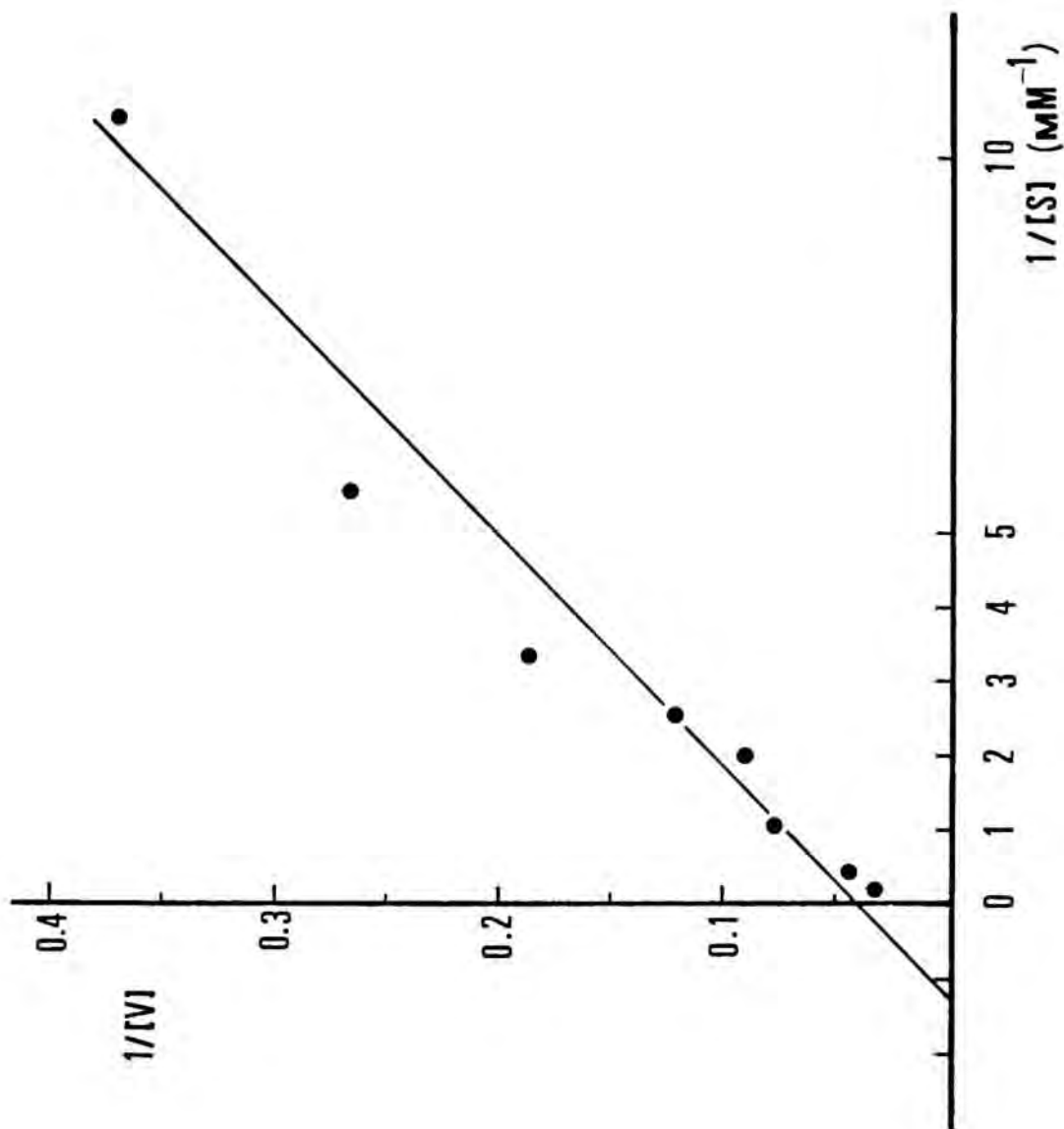


FIGURA 32. DETERMINACIÓ DE LA CONSTANT DE
MICHAELIS DE L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA
UTILITZANT GALACTOSA 1-FOSFAT COM A SUBSTRAT

FIGURA 33. DETERMINACIÓ DE LA CONSTANT DE
MICHAELIS DE L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA
UTILITZANT MANOSA 1-FOSFAT COM A SUBSTRAT

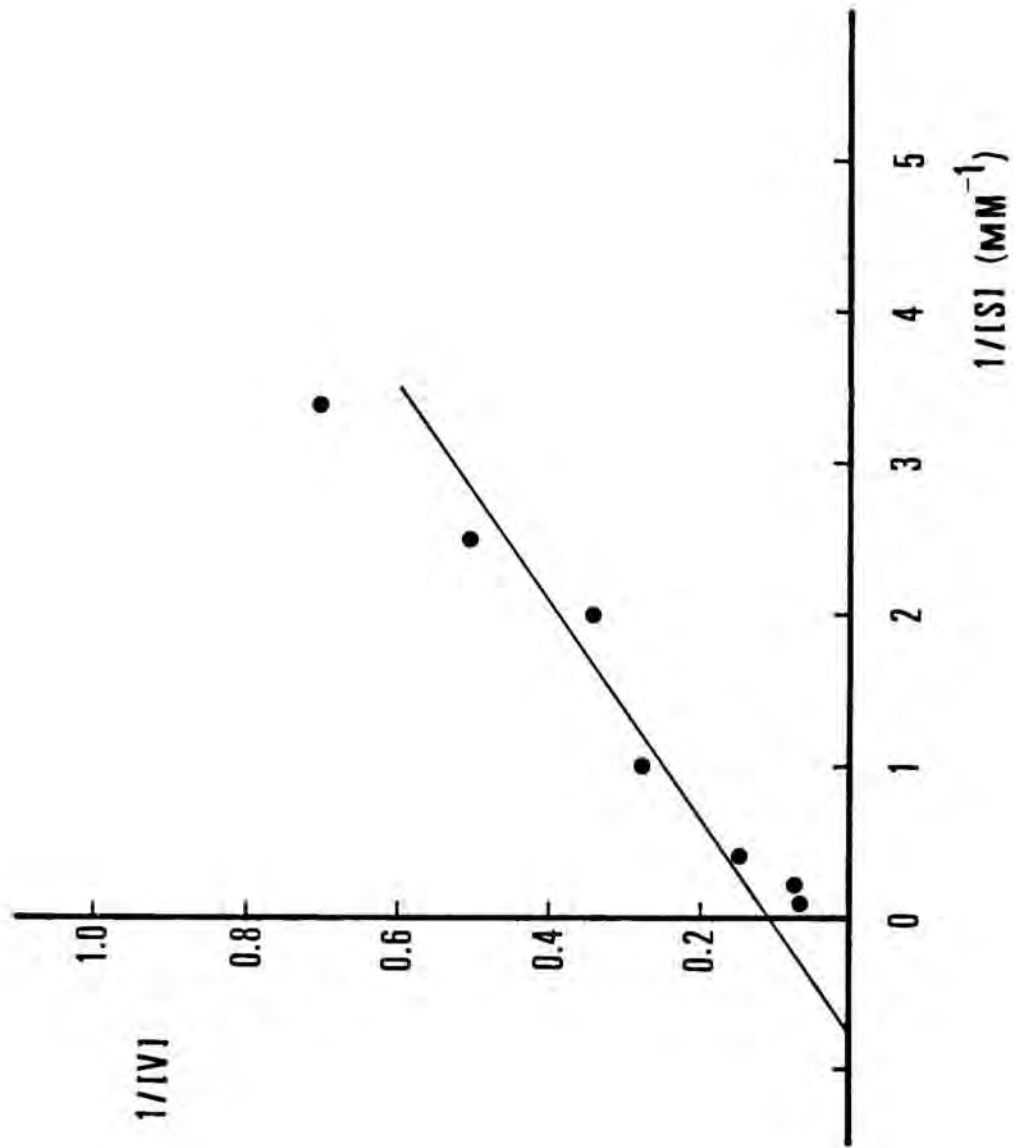
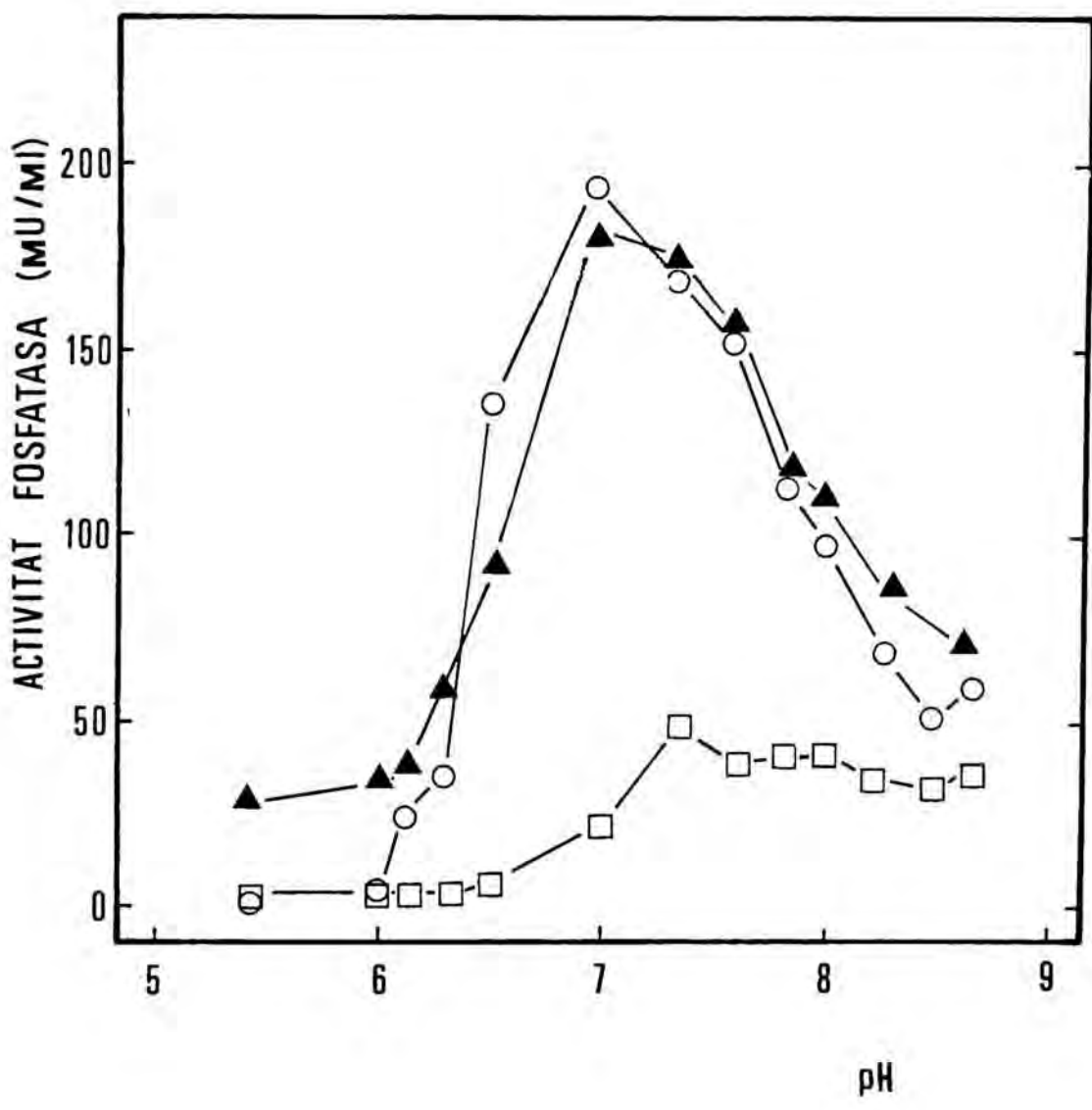


FIGURA 34. pH ÒPTIM DE L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT
FOSFATASA

Es va determinar l'activitat fosfatasa utilitzant com a substrat glucosa 1-fosfat (▲), galactosa 1-fosfat (○) i mannososa 1-fosfat (□).

Es van utilitzar les següents solucions amortidores: acètic-acetat (pH 5,0-5,5), imidazol-acètic (pH 5,5-7,5), Tris-acètic (pH 7,0-9,0) i glicina-NaOH (pH 8,0-9,0).



en variar la concentració de substrat utilitzada. Les incubacions es van fer en presència d'una solució de fosfat monosòdic/disòdic ajustat a pH 7,5. Per a determinar l'activitat fosfatasa es va assajar la glucosa 1-fosfat desapareguda de la mescla d'incubació.

Les característiques cinètiques de la inhibició es mostren a la figura 35. Com es pot observar a partir de la representació dels inversos, es tractava d'una inhibició competitiva respecte a la glucosa 1-fosfat. La K_i calculada va ésser de 1,5 mM. També es va calcular la K_i a partir de la representació de Dixon (360), tal com es presenta a la figura 36. El resultat va ésser força concordant (1,7 mM).

Glucosa, galactosa i mannososa a concentració entre 0-50 mM no van exercir cap efecte.

3.4.3.6. EFECTE DELS CATIONS DIVALENTS

L'activitat fosfatasa sobre glucosa 1-fosfat, galactosa 1-fosfat i mannososa 1-fosfat requeria la presència d'un catió divalent. L'efecte del magnesi i del manganès es presenta a la figura 37. El magnesi va ésser l'activador més efectiu amb un efecte màxim a 3-5 mM per els tres substrats. El manganès mostrava un efecte màxim a concentracions més baixes (1 mM) però a concentracions més altes es convertia en inhibidor. Ambdós cations no mostren efectes sinèrgics o antagònics.

FIGURA 35. INHIBICIO DE LA GLUCOSA 1-FOSFAT FOSFATASA PER FOSFAT. REPRESENTACIO DE LINEWEAVER-BURK

L'activitat fosfatasa sobre glucosa 1-fosfat es va assajar en presència de diferents concentracions de fosfat sòdic pH 7,5:

(○) 0 mM, (■) 1 mM, (▲) 2 mM i (▽) 10 mM.

El càlcul de la K_i es va fer a partir de la representació secundària de les K_m aparents.

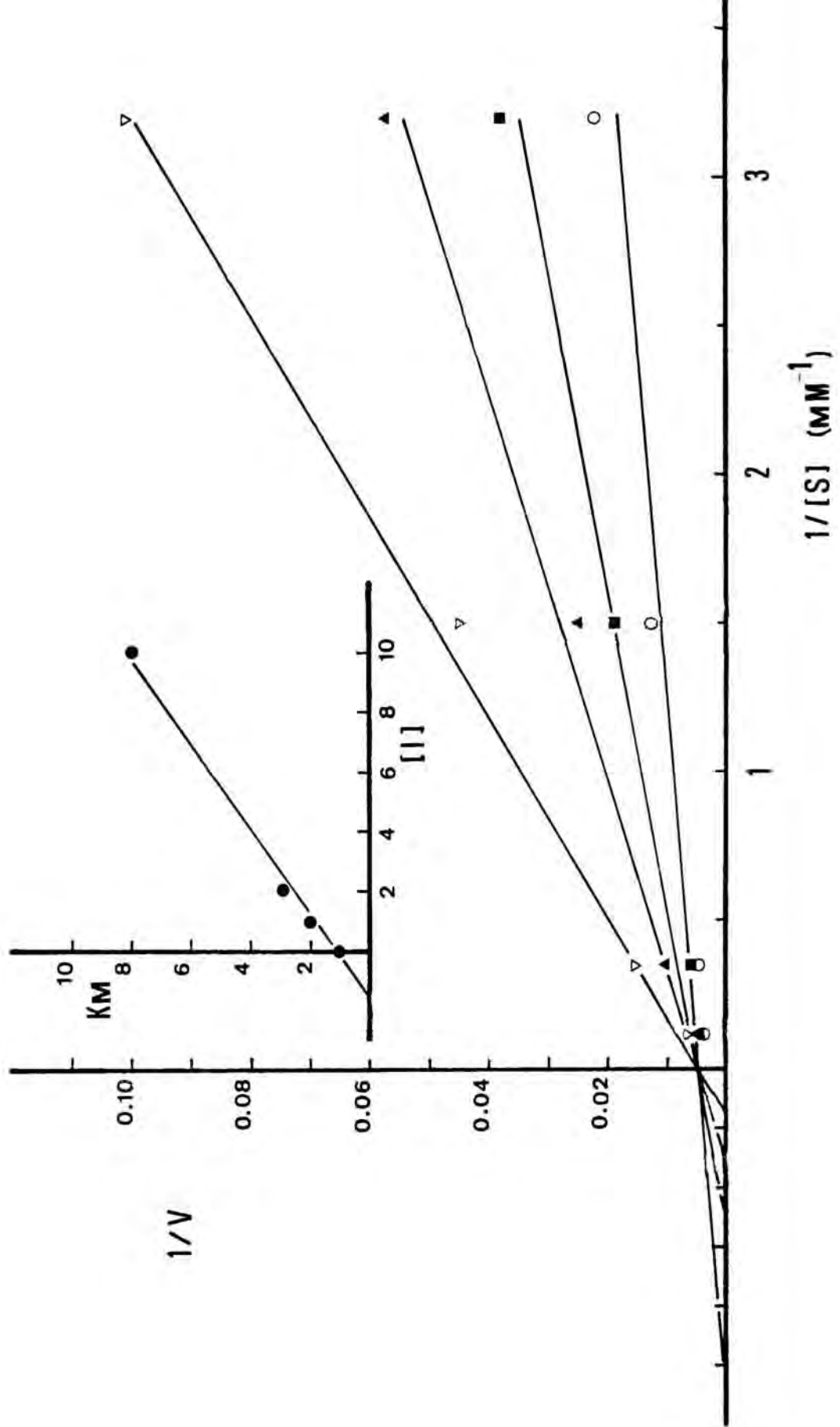


FIGURA 36. INHIBICIÓ DE LA GLUCOSA 1-FOSFAT
FOSFATASA PER FOSFAT. REPRESENTACIÓ DE DIXON

L'activitat fosfatasa sobre glucosa 1-fosfat
es va assajar en presència de diferents
concentracions de fosfat sòdic pH 7,5.

[S] mM

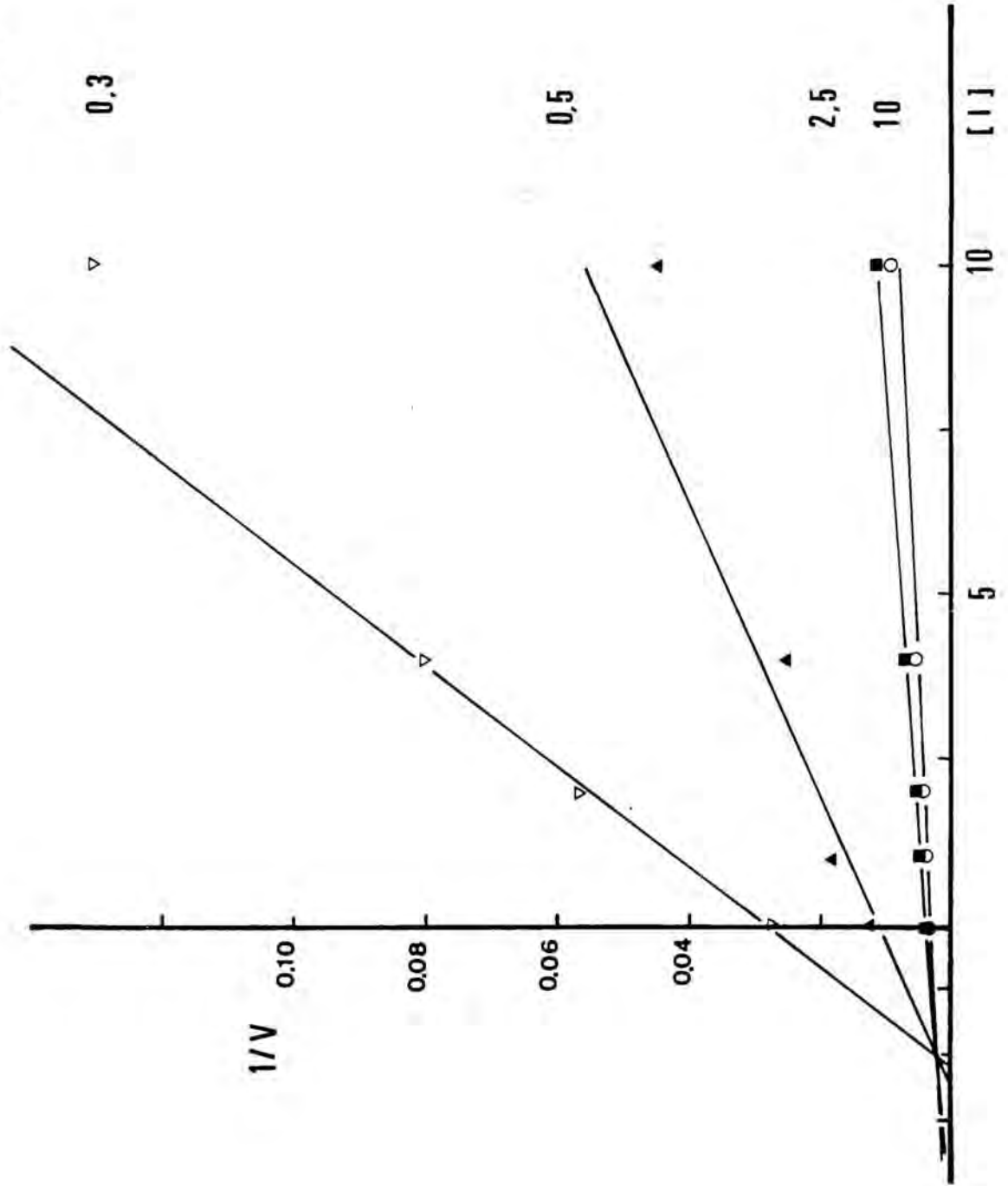
0.3

0,5

2,5

10

[I]



Cobalt i zinc tenien un efecte activador molt més petit, mentre que el calci no presentava cap efecte.

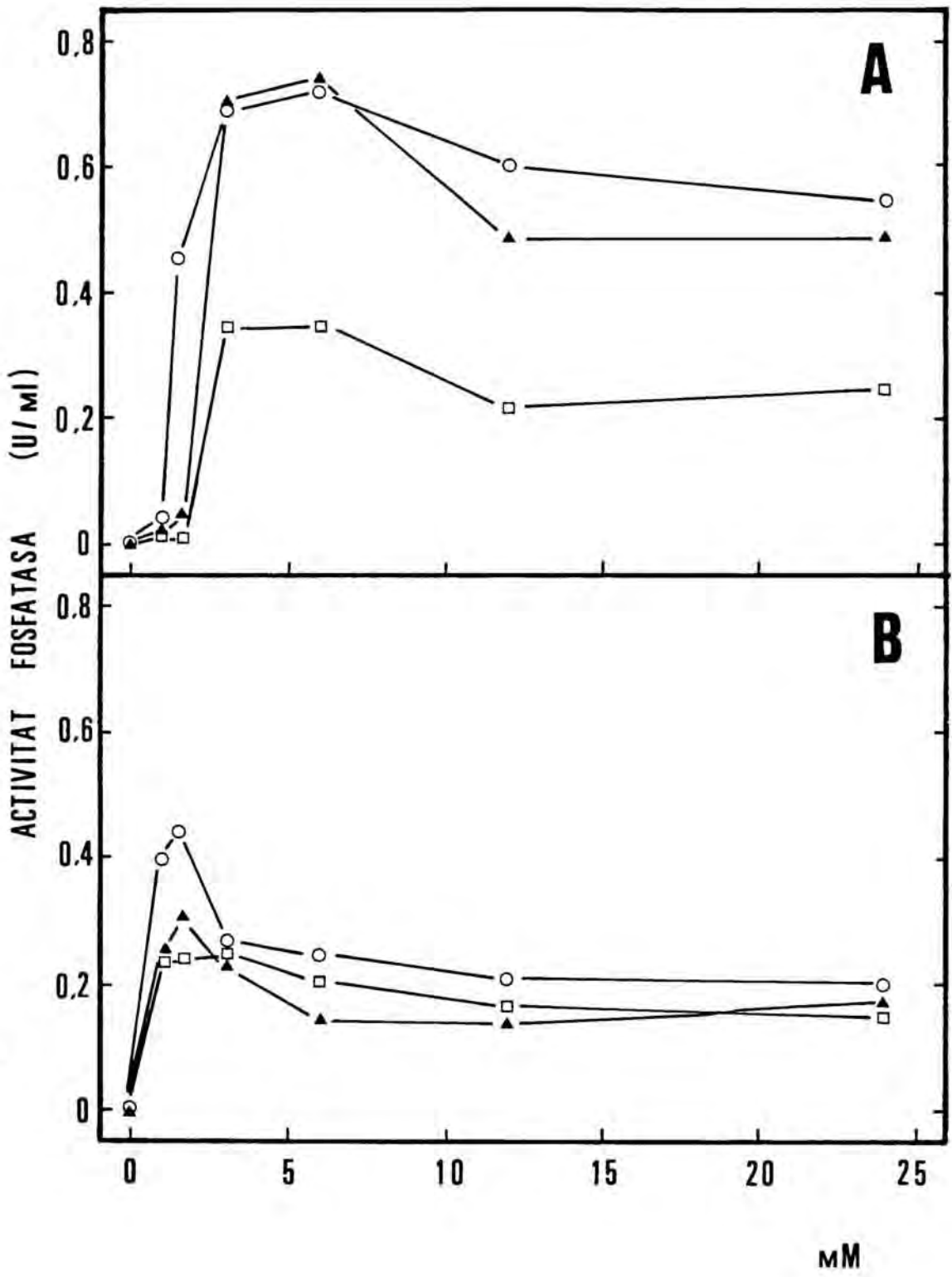
3.4.3.7. EFECTE D'INHIBIDORS

Es va assajar la influència de diversos composts amb efecte sobre altres fosfatases. Així, es va assajar l'activitat fosfatasa utilitzant glucosa 1-fosfat com a substrat en presència de fluorur, clorur, tartrat (inhibidor de la fosfatasa àcida prostàtica) i vanadat (inhibidor de la fosfatasa àcida, alcalina i ATPases). Com es pot veure a la taula 16, el fluorur es comporta com un potent inhibidor, mentre que el clorur és inhibidor a concentracions molt més altes. El mercuri (0,5 mM) inhibeix un 50%, mentre que el tartrat i el vanadat no inhibeixen en absolut.

També es van assajar l' α - i β -glicerolfosfat (aquest últim activador de la fructosa 2,6-bisfosfat fosfatasa de fetge), l'IMP (activador de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de cervell), l'AMP, ADP i ATP. Cap d'ells va produir cap efecte.

**FIGURA 37. EFECTE DE CATIONS DIVALENTS SOBRE
L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA**

Es va determinar l'activitat fosfatasa sobre glucosa 1-fosfat (\blacktriangle), galactosa 1-fosfat (\circ) i mannososa 1-fosfat (\square) en presència de diverses concentracions d'acetat magnèsic (panel A) i acetat de manganès (panel B).



TAULA 16. EFECTE DE DIVERSOS INHIBIDORS SOBRE
L'ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA

Es va determinar l'activitat fosfatasa sobre
glucosa 1-fosfat.

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓ (mM)	% ACTIVITAT
---	-	100
Fluorur	0,125	70
	0,250	39
	0,500	26
	1	16
	2	9
	5	5
	10	3
Clorur	100	89
	200	86
	500	44
Tartrat	0,5	100
Hg ²⁺	0,5	47
Vanadat	10	97

4. DISCUSSIÓ

La glucosa 1,6-bisfosfat és un potent regulador del metabolisme de carbohidrats que es caracteritza per tenir efecte sobre diferents enzims clau de les diferents vies metabòliques dels carbohidrats, incloent especialment la fosfoglucomutasa, fosfofructoquinasa i hexoquinasa.

La seva acció està relativament ben caracteritzada en el múscul esquelètic, on se li atribueix un paper en nombroses situacions fisiològiques, patològiques i hormonals, i també en el cervell, on està present a concentracions força elevades. El múscul esquelètic es distingeix per tenir uns nivells baixos de fructosa 2,6-bisfosfat, un altre sucre bisfosforilat que té una importància clau en la regulació de les vies glicolítica i gluconeogènica especialment en el fetge.

En el moment de l'inici del present treball, es trobaven a la bibliografia alguns estudis sobre les variacions en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat. El grup de Beitner i col. (3,4) ha treballat en múscul esquelètic de rata sotmés a l'acció de diferents hormones i situacions fisiològiques com el dejuni o l'anòxia, i han identificat nombrosos efectors que fan variar la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat. Malgrat aquests fets, restaven nombroses questions obertes sobre el problema de si la glucosa 1,6-bisfosfat jugava realment un paper regulador o no en el múscul esquelètic. Amb aquests antecedents vem escollir certes situacions i vem determinar els patrons de variació de glucosa 1,6-bisfosfat, juntament amb el d'altres metabòlits i

activitats enzimàtiques relacionades.

Ja que pràcticament els únics grups que han treballat sobre la glucosa 1,6-bisfosfat en múscul esquelètic han estat el de Beitner (3,4), el de Wakelam (174,185) i el de Hofer (183,184), és convenient comparar quantitativament els seus resultats amb els obtinguts en el present treball.

Els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en múscul esquelètic de rata descrits per Beitner varien significativament amb l'edat de l'animal (216), ja que el creixement implica l'augment de la concentració del metabòlit. Per rates adultes (200-300 g), com les utilitzades per nosaltres en el present treball, els nivells oscil·len entre 18-21 nmols/g teixit (167,216), d'acord amb els resultats descrits per nosaltres (21,1±3,9 nmols/g). El grup de Hofer (183) ha treballat amb múscul psoas de conill i els nivells descrits són de 43 nmols/g teixit. El múscul de ratolí també posseeix uns nivells més elevats: 35-45 nmol/g teixit (44,165,213).

Pel que fa als nivells d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, els descrits per Beitner són de l'ordre de 0,2-0,3 mU/mg proteïna (167,169-171). S'ha de senyalar, però, que la definició de mU feta per aquests autors correspon a 1 nmol de substrat transformat en 15 minuts a 37°C. A més, l'assaig de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa difereix marcadament del nostre i de l'emprat per

altres autors ja que la concentració de substrat utilitzada és només de 2 μM , marcadament per sota dels nivells intracel·lulars existents i de la K_m descrita per Wakelam i col. (174) en múscul de rata. Wakelam i col.laboradors, descriuen en extracte de múscul de rata una activitat de 0,2 mU/mg de proteïna en el cas de l'activitat no estimulada per calci. En aquest cas es tracta d'unitats internacionals i la temperatura és de 37°C. En ambdós casos, la mesura es fa per la determinació de la desaparició de glucosa 1,6-bisfosfat mitjançant un mètode fluorimètric.

Les dades aportades per nosaltres són també de l'ordre de 0,2 mU/mg proteïna i coincideixen tant si es determina l'activitat per el mètode espectrofotomètric o radioactiu. Si es determina pel mètode d'Itaya, l'activitat és lleugerament més elevada (0,4 mU/mg) degut possiblement a que s'hidrolitzen parcialment les hexoses monofosfat produïdes per acció de la fosfatasa i es quantifica igualment el fosfat alliberat.

4.1. DEJUNI

L'efecte del dejuni i la realimentació sobre els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en múscul esquelètic havia estat descrit per Beitner i col. (165) l'any 1979. Aquests autors sotmetien a ratolins a 22 hores de dejuni i determinaven els valors en animals normals i congènitament distròfics.

En el nostre estudi vem treballar amb animals sans sotmesos a diferents graus de dejuni i vem determinar els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat juntament amb els de glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat i glicogen. També es va determinar el grau de glicèmia.

D'acord amb les dades aportades per Beitner i col.laboradors, el dejuni provoca una important disminució dels nivells musculars de glucosa 1,6-bisfosfat. Aquests autors aconseguixen una disminució del 50% després de 22 hores de dejuni, mentre que en el nostre cas, la disminució no és gaire aparent a les 24 hores (10%), però s'accentua marcadament a les 48 hores (50% de disminució) i a les 72 hores (70% de disminució). Degut al ritme d'alimentació de les rates, és possible que les diferències trobades siguin degudes a que les hores reals de dejuni no siguin les descrites.

Dintre dels canvis trobats en els altres metabòlits, cal destacar que la glicèmia segueix un patró ja descrit, segons el qual es produeix a les 24 hores una disminució dels nivells de glucosa en sang, que és compensada gràcies a la gluconeogènesi hepàtica. EL glicógen muscular segueix un patró similar, ja que la disminució inicial és ràpidament frenada quan el múscul s'adapta a consumir majoritàriament altres compostos per a obtenir energia.

Quant a la raó que justifiqui aquesta disminució de la glucosa 1,6-bisfosfat, Beitner i col.laboradors havien

abogant per una activació per raons desconegudes de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Malgrat aquest resultat, nosaltres no hem pogut reproduir aquest efecte, doncs l'activitat fosfatasa roman sense variar significativament durant els diferents graus de dejuni. L'activitat sintasa tampoc varia, però s'ha de senyalar que l'assaig utilitzat mesura només dues de les activitats implicades a la síntesi de la glucosa 1,6-bisfosfat: la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa dependent de 1,3-bisfosfoglicerat i la glucosa 1-fosfat quinasa. S'ha proposat l'existència de dues activitats més amb capacitat de síntesi: la fosfoglucomutasa i la glucosa 1-fosfat dismutasa. Les dues citades en primer lloc semblen ésser les més abundants en múscul esquelètic (141). Una altra possibilitat és la disminució en la disponibilitat de substrats per a la síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat: hem mesurat doncs la variació de la concentració de glucosa 1-fosfat i de glucosa 6-fosfat i els resultats mostren que no varien significativament. Es requereixen per a la síntesi, però, altres substrats que no han estat mesurats.

4.2. TIPUS MUSCULARS

En el present treball s'ha portat a terme per primera vegada un estudi encaminat a relacionar els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i fructosa 2,6-bisfosfat amb el tipus de fibra muscular. Com ja s'ha comentat en la Introducció, els diferents músculs es diferencien marcadament segons la

seva composició de fibres (293). Aquestes diferències no són únicament estructurals o fisiològiques, sinó també bioquímiques ja que gran part del metabolisme dels diferents tipus de fibres es basa en el diferent contingut enzimàtic. Precisament la importància de la via glicolítica respecte a altres formes d'obtenció d'energia és una de les característiques que defineix més clarament aquells músculs amb preponderància de fibres I (oxidatives) o IIb (glicolítiques). De fet, cada cop més es remarca la importància de que els treballs per definir els efectes metabòlics de qualsevol manipulació experimental en el múscul han d'incloure estudis en diferents tipus estructurals (288). Apart dels aspectes esmentats, cal ressaltar les diferències en la capacitat gluconeogènica, que només té lloc en fibres IIa i IIb ja que les I no tenen activitat fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (295) i en la sensibilitat a la insulina (294).

Per aquestes raons ens vem proposar determinar els continguts de glucosa 1,6-bisfosfat i fructosa 2,6-bisfosfat, ambdós reguladors del metabolisme de carbohidrats, en diferents tipus de músculs, així com les activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i fosfofructoquinasa-2. També es va determinar el contingut de glicogen i de tres activitats enzimàtiques responsables del metabolisme de la glucosa, sigui sanguínia o procedent del glicogen: fosfofructoquinasa, fosfoglucomutasa i glicògeno-fosforilasa. Els tipus musculars escollits van ésser: soleus (85% fibres I), diafragma (20% fibres I, 60% fibres IIa i 20% fibres IIb), gastrocnemius

(fibres IIa i IIb) i extensor llarg dels dits o E.D.L. (90% fibres IIb).

El contingut de metabolits bisfosforilats en diversos tipus musculars no ha estat mai determinat. Nordenberg i col. (220) han fet determinacions en alguns músculs però sense establir una relació amb la composició de fibres. Segons els seus resultats, el diafragma té un contingut baix en glucosa 1,6-bisfosfat (6,75 nmol/g), el tibialis anterior té un contingut més elevat (19,4 nmol/g), mentre que el gastrocnemius té un contingut intermedi (12,9 nmols/g). En quant a la fructosa 2,6-bisfosfat, molt recentment (288), s'ha descrit que el nivell en biceps femoris (mixte) és més alt (0,97 nmol/g) que en soleus (0,57 nmols/g) o en tensor fascia latae (glicolític, 0,60 nmols/g). Els nostres resultats, que amplien les dades aquí esmentades, les confirmen en part, ja que segons els nostres resultats el múscul amb més capacitat glicolítica (E.D.L.) és el que té un contingut més alt d'ambdós metabòlits bisfosforilats (31,96 nmols glucosa 1,6-bisfosfat/g i 0,91 nmol fructosa 2,6-bisfosfat/g), mentre que el que té més capacitat oxidativa, el soleus, és el que en té menys (11,80 nmols glucosa 1,6-bisfosfat/g i 0,43 nmols fructosa 2,6-bisfosfat/g). El contingut de glucosa 1,6-bisfosfat dels dos músculs de composició mixta és també intermig: així, el gastrocnemius conté 16,26 nmols/g, mentre que el diafragma, que conté els tres tipus de fibres amb preponderància de les IIa, conté 15,25 nmols/g. Es a dir, existeix una bona correlació entre capacitat glicolítica del múscul i contingut en glucosa 1,6-

bisfosfat. La fructosa 2,6-bisfosfat no segueix una relació tan estricta, doncs el contingut del diafragma és alt (0,99 nmols/g) mentre que el del gastrocnemius és baix (0,37 nmols/g). Per completar aquestes dades, es va determinar el contingut en glicogen, on també hi va haver una bona correlació amb el percentatge de fibres IIB, ja que l'E.D.L. té, juntament amb el gastrocnemius, el contingut més alt (28,55 i 29,78 μ mols glucosa /g), mentre que els segueix el diafragma (27,00 μ mols/g) i, en últim lloc, el soleus (20,00 μ mols/g). Aquests resultats estan d'acord amb la bibliografia (295), ja que està descrit que el plantaris (IIB) conté una proporció més alta de glicogen que el soleus. Quantitativament els resultats són també concordants (soleus: 23,4 μ mols/g; gastrocnemius: 24,8 μ mols/g i plantaris: 35,0 μ mols/g).

En quant als continguts enzimàtics, s'ha treballat extensament en aquest tema (vegeu Introducció) i les dades no són sempre concordants. Hi ha un acord general en que les fibres IIB contenen més enzims glicolítics, excepte d'hexoquinasa, que les oxidatives, mentre que aquestes tenen un contingut més alt dels enzims del cicle de Krebs. En el nostre estudi hem mesurat les activitats fosfofructoquinasa, fosfoglucomutasa i glicògeno-fosforilasa, totes elles relacionades amb el metabolisme de la glucosa o el glicogen. La glucosa 1,6-bisfosfat, a més, és activador de la fosfoglucomutasa i la fosfofructoquinasa. Els resultats obtinguts estan, bàsicament d'acord amb els descrits: l'activitat fosfofructoquinasa és molt més alta en els

músculs glicolítics que en el soleus. Aquest és també el que conté menys activitat fosforilasa, amb gran diferència respecte als demás músculs i també d'acord amb el seu contingut de glicogen. Hi ha una relació molt estricta entre el contingut de glicogen i activitat fosforilasa, ja que els músculs que contenen més glicogen (E.D.L., gastrocnemius) també posseeixen una activitat fosforilasa més alta, mentre que el diafragma té una activitat fosforilasa intermitja. L'activitat està d'acord amb les dades recollides a la bibliografia (taula II de la Introducció). La fosfoglucomutasa té una activitat alta en tots els músculs i, d'acord amb el seu paper d'enzim no regulador, no hi han diferències entre els diferents tipus de músculs, encara que el soleus tendeix a tenir una activitat una mica més baixa.

S'han determinat les activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i fosfofructoquinasa-2, responsables del metabolisme de la glucosa 1,6-bisfosfat i la fructosa 2,6-bisfosfat. Les dades recollides per nosaltres indiquen que, respecte l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, no hi ha relació amb la composició de fibres del múscul. En quant a la fosfofructoquinasa-2, tampoc hi han variacions significatives, encara que el soleus és el que té uns nivells més baixos. L'activitat trobada és més baixa que la descrita per Kuwajima i Uyeda (280), encara que aquests autors també troben una activitat molt baixa en relació amb l'existent a altres teixits.

4.3. ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA

Durant la contracció, el grau d'estimulació de la glicòlisi depèn de la freqüència d'estimulació/contracció i de la presència d'oxigen, dues condicions que es relacionen. Es poden observar dues situacions extremes: una estimulació a 5 Hz, que es pot considerar pròxima a la fisiològica i una estimulació a 25 Hz, que provoca una contracció tetànica, que condueix ràpidament a un estat de fatiga.

Minatogawa i Hue (92) han descrit recentment que els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat no varien significativament en el múscul en contracció, de manera que ens vem plantejar si la glucosa 1,6-bisfosfat podia tenir algun paper en aquest procés. L'interès radicava també en que Wakelam i col. (174) havien descrit que l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic s'activava per calci-calmodulina i el procés de la contracció és iniciat per un brusc increment de les concentracions de calci citoplasmàtic.

Es va escollir el gastrocnemius per efectuar aquest estudi a causa de que és un múscul relativament gran i que permet aleshores la determinació de tots els metabòlits a partir de la mateixa mostra, evitant així la variació deguda a l'ús de diferents animals. La composició de fibres d'aquest múscul és mixte, doncs la part superficial posseeix majoritàriament fibres tipus IIb i la part profunda fibres tipus IIa. Com a tal, no és doncs un múscul pur ja que en el present estudi no es va fer cap diferenciació entre les dues

zones.

Les dades obtingudes per nosaltres són força concordants amb les obtingudes per Minatogawa i Hue (92) en el que respecta a nivells i variacions de glicogen, lactat, ATP, fructosa 1,6-bisfosfat, glucosa 6-fosfat i fructosa 2,6-bisfosfat. Dades semblants han estat descrites per altres autors (312,313). Es produeix un increment notable en la producció de lactat simultània a una disminució del glicogen, indicant que el lactat s'elimina, però, parcialment per la sang (5,8 μ mols glucosa/min·g i 4,5 μ mols lactat acumulat/min·g). L'ATP no modifica la seva concentració de manera significativa com ja havien descrit altres autors, a causa del funcionament simultani de la mioquinasa i la creatina quinasa. Es produeix un increment notable dels substrats glicolítics, com la glucosa 6-fosfat. La fructosa 1,6-bisfosfat segueix un patró de variació bifàsic ja descrit per altres (92,313) i que s'ha suggerit que era degut a l'existència d'un pas transitòriament limitant en el metabolisme de la fructosa 1,6-bisfosfat. S'ha proposat que aquest pas podia ésser la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa, degut a una disminució relativa dels nivells de fosfat fins que la hidròlisi de la fosfocreatina els restaurés.

Els canvis en la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat descrits per altres autors són contradictoris: Hue i col. (91) han descrit que es produïa una disminució després de l'estimulació a 10 Hz durant 10 minuts i que inclús aquest

tractament abolia l'increment de fructosa 2,6-bisfosfat provocat per l'epinefrina. Minatogawa i Hue (92), treballant amb E.D.L. no han detectat canvis significatius quan s'estimulava el múscul a 0,5, 5 o 25 Hz de freqüència, en canvi, en gastrocnemius, els mateixos autors observaven un increment transitori quan s'estimulava a 5 Hz, però no quan s'estimulava a 25 Hz. Els autors suposaven que aquest increment transitori a freqüències baixes podia ésser important com a estimulador de la fosfofructoquinasa, ja que en aquestes condicions l'acúmul de fructosa 1,6-bisfosfat no és gaire gran. Nosaltres hem trobat un increment transitori en condicions d'estimulació tetànica, mentre que a baixa freqüència no hi han canvis significatius. Es difícil dir la raó d'aquesta discordància.

En quant a la variació en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, l'única dada descrita a la bibliografia ha estat aportada recentment per Bauer i col. (183) en múscul psoas de conill perfundit i estimulat durant 10 minuts. En aquestes condicions es produeix una lleugera disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, en contraposició amb els nostres resultats, on hem trobat un acúmul de tres vegades en els nivells del metabòlit, tant a 5 Hz com a 25 Hz durant un temps de 2 i 1 minut, respectivament. La raó d'aquesta discrepància pot ésser que en 10 minuts ja s'ha esgotat la capacitat del múscul per a realitzar la glicòlisi anaeròbia, fet que vé recolzat pel fet que els nivells de glucosa 1-fosfat i de glucosa 6-fosfat descrits pels autors en aquestes condicions són inferiors als basals, quan està àmpliament

descriu que es produeix un gran increment d'aquests dos metabòlits a l'inici de la contracció. La fructosa 2,6-bisfosfat no varia tampoc en aquest tractament.

El mecanisme pel qual es produeix aquest increment de glucosa 1,6-bisfosfat no és clar, encara que possiblement sigui degut a un increment en la disponibilitat de substrats. En principi, estaria en desacord amb l'estimulació per calci de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa descrita per Wakelam i col. (174), ja que la contracció va acompanyada per un increment molt notable dels nivells de calci citoplasmàtic que és el que fa possible, per una banda, l'acoblament actina-miosina i, per l'altre, l'activació de la fosforilasa quinasa que produirà l'activació de la fosforilasa i la degradació del glicogen. En el nostre estudi sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa no hem pogut reproduir aquest efecte del calci, com es discutirà més endavant.

En quant al paper fisiològic d'aquest increment de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat, hem de dir que concorda amb els fenòmens que tenen lloc en el múscul ja que aquest metabòlit és activador de la fosfoglucomutasa i la fosfofructoquinasa i per tant, estimula la glicòlisi, mentre que és un inhibidor de l'hexoquinasa. Discutirem el possible paper sobre cada un d'aquests enzims.

4.3.1. Fosfofructoquinasa

Està àmpliament acceptat que l'increment en el flux glicolític que té lloc durant la contracció muscular va acompanyat per una activació de la fosfofructoquinasa, encara que el mecanisme no és del tot clar. La fosfofructoquinasa és un enzim capaç d'ésser modulats per nombrosos efectors (59): moduladors al·lostèrics, substrats i productes, de manera dependent del pH. A més, la fosfofructoquinasa, tant hepàtica com muscular, és capaç d'ésser fosforilada i això comporta una certa inactivació de l'enzim. El comportament cinètic i la sensibilitat a efectors al·lostèrics està influït per l'estat d'agregació i la concentració de l'enzim. També s'ha demostrat que la calmodulina pot induir una inactivació/reactivació de l'enzim en canviar l'estat d'agregació i que això depèn de les condicions metabòliques (84,85).

Els sucres bisfosforilats, glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat i fructosa 1,6-bisfosfat, són activadors de la fosfofructoquinasa muscular i els tres competeixen per a unir-se al mateix centre (2,76). Tradicionalment s'ha pensat que la regulació de la fosfofructoquinasa en la contracció venia donada principalment per l'augment de fructosa 1,6-bisfosfat, AMP i fosfat i per la disminució d'ATP. També s'ha parlat de l'increment de la concentració d'ió amoni i de la disminució de la creatina fosfat. En quant als nucleòtids, ja s'ha parlat de que la disminució d'ATP és poc important, i, a més,

sembla ésser que les concentracions d'AMP i ADP lliures són molt més baixes que les concentracions totals mesurades, degut a que l'ADP s'uneix fortament a l'actina, com ja s'ha esmentat a la Introducció (312).

Els nivells de fructosa 1,6-bisfosfat incrementen notablement amb l'activitat muscular, però gran part d'aquest metabòlit està unit a proteïnes, particularment a l'aldolasa (63,76), com es desprèn del fet que la concentració de fructosa 1,6-bisfosfat mesurada és 100 vegades superior a l'esperada de l'equilibri amb les trioses fosfat. Segons Tornheim i Lowenstein (63), el 90% de la fructosa 1,6-bisfosfat podria estar unida a proteïnes, de manera que la concentració real en el múscul en repòs podia ésser només de 5 μ M, enlloc dels 60 μ M descrits a la bibliografia.

De la mateixa manera, el paper de la fructosa 2,6-bisfosfat és obscur, doncs, a més de la discrepància en les dades aportades sobre la variació que es produeix durant la contracció, Foe i col. (2) han senyalat que la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat en el múscul es correspon només al 8% de la concentració de subunitats de fosfofructoquinasa i que, per tant, tindria un paper irrelevant encara que estigués totalment unida a la fosfofructoquinasa. A més, en presència de concentracions fisiològiques d'ATP i citrat, la K per la fructosa 2,6-bisfosfat incrementa fins valors 0,5 superiors als existents en teixits (76). Boscá i col. (35) han descrit que, en contrast amb l'enzim de fetge, la fosfofructoquinasa muscular no és activada significativament

per fructosa 2,6-bisfosfat a concentracions fisiològiques d'enzim, substrats i efectors. Per altra banda, s'ha senyalat que, a causa de que el flux glicolític en repòs és molt baix, qualsevol efecte pot tenir importància encara que sigui petit. En múscul d'insectes voladors, Storey (250) ha proposat que la fructosa 2,6-bisfosfat pot tenir un paper clau en l'estimulació de la fosfofructoquinasa en l'inici del vol. En aquest procés es produeix també un notable increment en les concentracions de fructosa 1,6-bisfosfat.

D'aquesta manera, l'increment en la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat durant la contracció descrita en el present treball pot ésser d'importància fisiològica en l'activació de la fosfofructoquinasa. Aquest increment es produeix de forma paral·lela a la producció de lactat, en contrast amb els de fructosa 1,6-bisfosfat i fructosa 2,6-bisfosfat, que mostren un patró bifàsic. Si les concentracions reals de les fructoses fosfat són realment més baixes que les descrites, és molt possible que la fosfofructoquinasa no es trobi saturada i que l'augment de la glucosa 1,6-bisfosfat constitueixi un factor d'activació addicional. La concentració de glucosa 1,6-bisfosfat és un ordre de magnitud superior a la concentració de fosfoglucomutasa en relació molar (44), de manera que és d'esperar que gran part es trobi lliure. La concentració de fructosa 2,6-bisfosfat necessària per aconseguir una activació meitat de la màxima de la fosfofructoquinasa muscular és 10 vegades més baixa que la corresponent concentració de fructosa 1,6-bisfosfat i 50 vegades la de

glucosa 1,6-bisfosfat ($K_a: 0,15 \mu\text{M}$, $1,3 \mu\text{M}$ i $7,5 \mu\text{M}$, respectivament)(2,77).

Finalment, s'ha de considerar la possibilitat de que l'increment de glucosa 1,6-bisfosfat durant la contracció pugui activar la fosfofructoquinasa a través d'una influència en l'estat d'agregació. Mayr (84,85) ha senyalat que en el múscul inactiu es reuneixen totes les condicions necessàries per produir una dissociació i inactivació de la fosfofructoquinasa, és a dir, un pH alt i concentracions de fructosa 1,6-bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat i glucosa 1,6-bisfosfat baixes (saturació parcial dels centres d'unió) i també d'ADP i AMP. En aquestes condicions, el tetràmer actiu de fosfofructoquinasa passaria a una forma dimèrica inactiva, que pot formar grans polímers inactius en presència de calci-calmodulina. En el múscul actiu es troben les condicions contràries: pH baix i concentracions d'hexoses bisfosforilades, AMP i ADP altes.

4.3.2. Fosfoglucomutasa

Malgrat que alguns autors han atribuït a la fosfoglucomutasa un paper regulador (vegeu Introducció) no sembla que constitueixi en cap moment un pas limitant del flux. Nombrosos metabòlits es comporten com a inhibidors de la fosfoglucomutasa, bé sigui per competir amb algun dels seus substrats o per un efecte aniònic (23). Aquests metabòlits incrementen notablement la seva concentració durant el procés de contracció, especialment la fructosa 1,6-

bisfosfat que pot arribar a una concentració quasi de 1 mM i, malgrat que sembla ésser que la concentració real és molt més baixa que la mesurada, es va establir la hipòtesi de que podia convertir a la fosfoglucomutasa en limitant. L'augment de la glucosa 1,6-bisfosfat que té lloc en el procés de contracció podria, doncs, revertir aquesta inhibició.

L'estudi cinètic va demostrar que realment la glucosa 1,6-bisfosfat és capaç de revertir en gran part l'efecte inhibitor d'aquests metabòlits. Ara bé, es pot situar l'increment de glucosa 1,6-bisfosfat d'una concentració de 30 μ M en situació basal a 80 μ M durant la contracció (assumint un 50% d'aigua intracel.lular (63)). La diferència d'activitat a aquestes dues concentracions es podria situar, segons els resultats obtinguts, en un 56 i 74% de l'activitat màxima.

L'activitat fosfoglucomutasa en extracte es va calcular entre 200-240 U/g, mentre que el fluxe glicolític màxim ha estat avaluat com 25 μ mols hexosa monofosfat/min·g considerant la producció de lactat (35). Una activitat de 200 U/g vol dir que la fosfoglucomutasa és capaç de transformar 200 μ mols glucosa 1-fosfat/min·g, mentre que el 56 i 74% d'activitat, correspon a una capacitat de 108 i 148 μ mols glucosa 1-fosfat/min·g, de manera que no sembla que en cap moment pugui estar la fosfoglucomutasa limitant, suposant inclús que la concentració de fructosa 1,6-bisfosfat arribi a l'ordre de 1 mM.

Aquest fet ve recolzat per la dada aportada per Aragón i col. (313) de que, durant l'estimulació a 25 Hz es produeix un marcat increment de glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat, de manera que la relació de concentracions és manté constant i pròxima a la constant d'equilibri de la reacció de la fosfoglucomutasa, que és 17.

4.3.3. Hexoquinasa

A causa de a la gran inhibició exercida per la glucosa 6-fosfat sobre l'hexoquinasa, s'ha suggerit fins i tot (129) que pot no funcionar "in situ", encara que altres autors (122) indiquen que aquest no és el cas.

Es calcula que l'activitat hexoquinasa II en el múscul està entre 1,3-4 U/g teixit. En presència de concentracions fisiològiques d'ATP-magnesi (3 mM), glucosa (1,9 mM), magnesi (1 mM), fosfat (10 mM), glucosa 6-fosfat (0,3 mM) i ADP-magnesi (1 mM), l'enzim reté aproximadament un 20% de l'activitat, és a dir, és fisiològicament funcional (122). Aquestes concentracions, però, son probablement més altes que les reals. En canvi, si els nivells de fosfat i glucosa 6-fosfat s'eleven a 15 mM i 4 mM respectivament, és a dir, en condicions similars a les que es poden trobar durant la contracció muscular tetànica, l'enzim està inhibit un 96% i, possiblement, no sigui funcional "in vivo".

El principal objectiu de la glicòlisi i glicogenòlisi en el múscul és la producció d'ATP. En aquestes

condicions, els nivells de glucosa 6-fosfat i fosfat són elevats. La glucosa 6-fosfat, el substrat de la glicòlisi, inhibeix l'hexoquinasa, mentre que el fosfat, el substrat de la glicògeno-fosforilasa i de la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa i activador de la fosfofructoquinasa, també inhibeix l'hexoquinasa del múscul. Es a dir, en condicions en que l'ATP és necessari per la contracció, aquest es dedica majoritàriament a aquesta finalitat, sense que sigui malgastat en la reacció de l'hexoquinasa, que representaria una part important de l'ATP produït en condicions de glicòlisi anaeròbia.

En aquestes condicions, sembla ésser que l'augment de la glucosa 6-fosfat és suficient per explicar la inhibició de l'hexoquinasa. L'increment de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat, però, podria sumar-se a aquest efecte inhibidor especialment tenint en compte la marcada disminució de pH que té lloc durant la contracció (304). Ja s'ha comentat a la Introducció que, mentre l'efecte inhibidor de la glucosa 6-fosfat no és afectat pel pH del medi, la glucosa 1,6-bisfosfat és molt millor inhibidor a pH inferior a 7,0 (123).

4.4. ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA

Les dades existents a la bibliografia sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa són les descrites per Beitner i col.laboradors, els quals han identificat una activitat que varia en diferents situacions fisiològiques o patològiques o sota un estímul hormonal, de manera simultània a variacions en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat. A partir d'aquests resultats, els autors han atribuït a aquesta fosfatasa la regulació dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat. Segons ells, es tracta d'una fosfatasa inhibida per l'AMP cíclic i les hormones que actuen a través de variacions en el nivell d'aquest nucleòtid, mentre que és activada per el GMP cíclic i les hormones (vasopressina, bradiquinina i serotonina) que es suposa que actuen a través del calci. Els autors han proposat un sistema de regulació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa segons el qual aquest enzim és activat per GMP cíclic, calci i fosfolipasa A₂, encara que basant-se en dades indirectes. Aquestes dades han estat parcialment recolzades per Wakelam i Pette (185) que, en cultius de cèl.lules musculars, han descrit un augment de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat després del tractament amb epinefrina, mentre que es produeix una disminució quan es tracten amb epinefrina més propranolol, vasopressina o l'ionòfor A23187. Aquests autors no determinen l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en aquestes cèl.lules, però ells mateixos han descrit, l'any 1982, que l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic de rata és activable per calci-calmodulina (174).

Malgrat tots aquests fets i a la importància que aquestes hipòtesis donen a la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, no hi ha hagut cap intent de purificació ni de caracterització parcial d'aquest enzim, des de l'any 1980 en que Beitner i col. (172) van començar a aportar dades. Wakelam i col.laboradors han fet els seus estudis sobre l'activació per calci i calmodulina en extracte i tampoc han realitzat cap intent de purificació de l'enzim.

Com es pot veure, doncs, les dades existents sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic són escases i no han estat verificades per altres grups. En quant al que es refereix a altres teixits, el cas més interessant és el del cervell, on Guha i Rose (159) han identificat i purificat parcialment una glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa específica, de pH òptim neutre i que és activable per IMP, però no per calci ni per cap dels altres efectors descrits en el cas del múscul. Es tracta d'un enzim relacionat des del punt de vista mecanístic amb la fosfoglucomutasa i la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa, ambdós enzims estudiats per el mateix grup d'autors, que és també un dels que ha estudiat amb profunditat el sistema d'enzims responsables del metabolisme del 2,3-bisfosfoglicerat.

Apart d'aquestes dades, tan sols existeixen algunes dels anys 1966-1967 (140,157,158), sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de fetge, on obtenen unes preparacions de glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, de pH òptim àcid i especificitat de substrat bastant àmplia.

Els resultats aportats per nosaltres en aquest treball no concorden amb els existents a la bibliografia. L'ordre d'activitat existent en múscul de rata és similar al descrit per Wakelam, però bastant més alt que el trobat per Beitner, com ja s'ha dit prèviament. Els nivells d'activitat descrits en fetge i cervell (157,160) són també del mateix ordre que els mesurats per nosaltres en aquests teixits.

Quant a la distribució subcel·lular, els nostres resultats mostren que en múscul esquelètic, la major part de l'activitat es troba en el citosol. En cervell de ratolí (160) el 70% de l'activitat es troba a les fraccions particulades que contenen nuclis, membranes, mitocòndries i lisosomes, mentre que el reste es troba en el citosol, i aquesta és l'única que és activada per IMP. En homogenats de fetge de bou Hashimoto i Yoshikawa (157) descriuen dues preparacions, una citoplasmàtica i l'altre microsomal, encara que en el citosol es troba la major part de l'activitat, mentre que Ueda i col. (140) troben una activitat molt més rica en la fracció microsomal.

Després de la cromatografia en DE-cel·lulosa, l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic de porc elueix en quatre pics a 20, 100, 300 i 500 mM (Tris-acetat pH 7,5). Tots aquests pics hidrolitzen altres compostos fosforilats a més de la glucosa 1,6-bisfosfat. El pic I conté tota l'activitat fosfoglucomutasa i el 6% de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa específica. El pic II conté la major part de la sintasa i la major part de

l'activitat fosfatasa inespecífica. L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es recupera principalment en el pic III, que també té activitat fosfatasa sobre fructosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat (en relació 100/180/420/160). Aquest pic està lliure d'activitat fosfoglucomutasa i glucosa 1,6-bisfosfat sintasa.

La diferent estabilitat tèrmica i el perfil de pH suggereixen que l'activitat sobre els diferents substrats del pic III pot correspondre a diferents entitats enzimàtiques. Tots els intents fets per purificar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa han fallat degut a la poca activitat existent, a la gran inestabilitat de l'enzim i a que, en les diverses cromatografia assajades, l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa semblava repartir-se en diversos pics sense que existís mai un pic majoritari que concentrés la major part de l'activitat. Entre els intents que es van fer estava la cromatografia de gel filtració, la hidrofòbica i la d'afinitat.

L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa del pic III té un pH òptim de 7,0. Es activada per cations divalents, de manera que el magnesi és el més eficient, seguit per el manganès. La K_m per la glucosa 1,6-bisfosfat és 800 μM en presència de magnesi 4 mM. El calci o l'EGTA no afecten la seva activitat enzimàtica en absolut i l'IMP tampoc exerceix cap efecte significatiu.

Encara que aquesta activitat glucosa 1,6-bisfosfat

fosfatasa no ha estat purificada, es pot concloure que probablement es tracta d'un enzim diferent del parcialment purificat a partir de citosol de cervell de ratolí per Guha i Rose (160). Ambdós enzims són activats pel magnesi, i, amb menys eficiència, pel manganès i no són afectats per el calci. En canvi, mentre que l'enzim de cervell és activat per l'IMP (i menys efectivament per el GMP), la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic no és afectada per aquest nucleòtid. El pH òptim és similar ($\approx 7,0$), però la Km de l'enzim de cervell per la glucosa 1,6-bisfosfat ($150 \mu\text{M}$ i $20 \mu\text{M}$ en absència i presència d'IMP) és molt més baixa que la de l'enzim de múscul ($800 \mu\text{M}$). La glucosa 1-fosfat i la glucosa 6-fosfat, que són bons substrats per la preparació de múscul, són inhibidors, però no substrats, de l'enzim de cervell. La mannososa 1,6-bisfosfat és un inhibidor competitiu i un substrat alternatiu per l'enzim de cervell, mentre que la fructosa 1,6-bisfosfat és un inhibidor poc eficient. A més, l'enzim de cervell té afinitat per la Sepharose acoblada al blau dextrà, que és utilitzat en la purificació, mentre que la de múscul no en té. En canvi, el perfil de DE-cel.lulosa i la separació de la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa és similar.

L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa parcialment purificada de múscul de porc (pic III) és també diferent de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de citosol de fetge de bou (157,158). Aquest enzim no és afectat pel calci i és inhibit per fluorur i clorur, com l'enzim de múscul, però no és activada per magnesi. La Km ($770-920 \mu\text{M}$) és del

mateix ordre, però té un pH òptim àcid (4,4). En quant a l'especificitat de substrat, a més de la glucosa 1,6-bisfosfat, l'enzim de fetge pot hidrolitzar els derivats mono i bisfosforilats de la fructosa, mannososa i ribosa i, sobretot, el fosfoenolpiruvat i el p-nitrofenilfosfat, mentre que no pot utilitzar com a substrats la glucosa 1-fosfat i la glucosa 6-fosfat.

L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de fetge de bou descrita per Ueda i col. (140) no ha estat prou ben caracteritzada per poder ésser comparada amb l'estudiada en el present treball ja que les úniques dades aportades són la distribució subcel.lular, la K_m (0,1 mM) i la resistència al tractament tèrmic i la sonicació, que la diferencien de la fosfatasa àcida inespecífica i de la glucosa 6-fosfat fosfatasa. Aquest enzim perd el 50% de l'activitat quan és escalfat a 50°C durant 10 minuts i és també lleugerament inactivada per la sonicació. L'enzim de múscul és inactivat un 15% quan és escalfat a 60°C durant 1 minut.

En comparació amb l'enzim de múscul de porc, la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul de rata descrita per Wakelam i Pette (174) posseeix una K_m baixa (20 μ M) i és activada per calci. Aquest efecte és abolit per la trifluoperazina, un inhibidor de l'acció de la calmodulina, i és restaurat per la calmodulina, per la qual cosa s'ha postulat que es tracta d'un enzim regulat per calci-calmodulina. No sembla ésser el cas de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul de porc (pic III).

A causa de la dificultat de treballar en múscul de porc i a que els experiments "in vivo" es feien en múscul de rata, es va fer un estudi de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en aquest animal. A més a més, els estudis en porc s'havien fet mitjançant el mètode d'Itaya per determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, un mètode senzill i bastant sensible però amb el que havíem treballat a una concentració de substrat de 1 mM. Si es baixava la concentració de substrat per fer-la similar a la utilitzada per altres autors, el mètode ja no tenia prou sensibilitat. A més, es tractava d'un mètode poc específic ja que es determina el fosfat alliberat i, per tant, si es produeix una hidròlisi dels productes de reacció (glucosa 1-fosfat o glucosa 6-fosfat) també és quantificat. Per tant, vem adoptar el mètode espectrofotomètric, basat en la determinació de la glucosa 1,6-bisfosfat desapareguda durant la incubació. Aquest és el mètode utilitzat per el grup de Beitner i en els treballs de Wakelam, encara que adaptat al fluorímetre. El mètode espectrofotomètric permet detectar concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat molt baixes i, a més, és molt específic, però té els problemes propis de qualsevol mètode que quantifiqui la desaparició del substrat (variació en els blancs, etc). Va resultar especialment útil en estudis realitzats en extracte ja que no era necessari dialitzar les mostres, procés que s'havia de fer obligatoriament en el cas del mètode d'Itaya.

La cromatografia en DE-cel.lulosa d'extractes procedents de múscul de rata va donar un resultat molt

similar a l'obtingut en múscul de porc, tant si es seguia l'activitat a concentració de substrat alta (1 mM) com baixa (0,1 mM). També es va provar l'efecte de l'IMP per tal de saber si apareixia un nou pic inaparent en absència del nucleòtid, però aquest no va ésser el cas. S'ha de senyalar que l'activitat fosfatasa de citosol de cervell és pràcticament inexistent si no hi ha IMP.

En vista de que els resultats de la purificació no eren bons, es va procedir a realitzar una sèrie d'experiments en extracte, destinats a veure si l'activació per calci, IMP o algun altre efector desconegut eren reproduïbles en múscul de rata.

En mesurar l'activitat en extracte no dialitzats, es va poder observar que, després d'una precipitació amb sulfat amònic al 80% o després d'una diàlisi exhaustiva, es recuperava molt poca activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en comparació amb l'extracte original. Aquest problema també el descriuen Guha i Rose (159) en estudiar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de cervell de ratolí, i és el que els va posar sobre la pista per descobrir l'activació per IMP. Vem, doncs, establir un sistema d'assaig sobre el qual poder fer aquest tipus de proves: el precipitat de sulfat amònic (80%) es resuspensia fins a un volum que corresponia al de l'extracte original i que mostrava una activitat molt baixa. Sobre aquest s'addicionava el pretès activador i es comparava la seva activitat amb la de l'extracte original. D'aquesta manera, el precipitat de

sulfat amònic contenia de segur l'enzim responsable de la hidròlisi de la glucosa 1,6-bisfosfat. Sobre aquest sistema es va assajar l'efecte del calci-calmodulina (en presència i absència de trifluoperazina), de l'IMP i del β -glicerolfosfat (activador de la fructosa 2,6-bisfosfat fosfatasa de fetge). Cap d'aquests compostos va exercir cap tipus d'efecte sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, en contraposició a les dades aportades per altres autors.

No està clara l'explicació que hi pot haver per la discrepància amb el grup de Wakelam sobre l'activació per calmodulina ja que es tracta del mateix teixit, el mateix animal i el tipus d'assaig utilitzat és similar. En relació amb això es van fer proves amb calci sol, acompanyat de calmodulina, amb trifluoperazina, amb EGTA i EDTA, i totes van resultar negatives. Quant a la manca d'activació per IMP pot ésser fàcilment explicable per la diferència de teixit ja que, entre altres coses, la funció de la glucosa 1,6-bisfosfat sembla ésser diferent en ambdós teixits. Així, en el cervell, l'IMP es produeix preferentment en situacions d'isquèmia i la disminució de glucosa 1,6-bisfosfat que té lloc en aquestes condicions porta a un petit increment de la glucosa 6-fosfat metabolitzable i a un ritme glicolític més baix propi d'aquesta situació. En el múscul es produeix un important increment en la concentració de IMP durant la contracció muscular, tal com descriuen Aragón i col. (313). Si la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa fos activable per aquest compost, es produiria una disminució de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat, cosa contrària a

l'increment que té lloc, tal com es descriu en el present treball, i contrària també a les necessitats de la cèl.lula, en la que el flux glicolític està molt augmentat.

Malgrat aquests resultats, quan al precipitat de sulfat amònic se li afegia una alíquota del mateix extracte que havia estat bullit a 100°C, es produïa un increment de l'activitat que recuperava pràcticament l'original de l'extracte sense dialitzar. El problema a resoldre va ésser aleshores la identificació d'aquest activador. El procés de caracterització va ésser semblant al que Guha i Rose havien portat a terme amb l'IMP i al que va portar al descobriment de la fructosa 2,6-bisfosfat (234): tractament àcid i bàsic per estudiar l'estabilitat del compost, tractament amb charcoal per esbrinar si era un nucleòtid, amb una resina aniònica per determinar si estava carregat elèctricament i amb fosfatasa alcalina per saber si contenia grups fosfat hidrolitzables.

Els resultats van mostrar que l'activador era un nucleòtid o nucleòsid, ja que s'enganxava al carbó actiu, encara que la fosfatasa alcalina no semblava modificar el seu efecte. Les proves fetes amb nucleòtids "in vitro" van mostrar que aquells que tenien un nucli de guanina eren els que més activaven (GTP, GDP, GMP, GMP cíclic i també la guanosina) mentre que els que tenien un nucli d'adenina activaven parcialment. Semblava doncs necessària l'existència d'una base púrica. Es de destacar que l'IMP no té cap efecte, encara que la hipoxantina és també una base púrica. Cap

d'aquests nucleòtids és capaç de restaurar totalment l'efecte de l'extracte bullit i això, juntament amb el fet que es necessiten concentracions altes d'aquests compostos per exercir l'efecte, indica que és possible que es necessiti algun altre factor desconegut per a que l'efecte activador es manifesti totalment. Es de senyalar que la fructosa 2,6-bisfosfat fosfatasa de fetge de rata, encara que possiblement no tingui gaires similituds amb la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul, és activada per trifosfonucleòtids, especialment per el GTP i l'ITP (269). Tal vegada l'activació descrita per Beitner i col. (172) quan incubaven diafragmes de rata amb dibutiril GMP cíclic es devia a un efecte directe, ja que les concentracions de nucleòtid emprades eren molt altes (2 mM).

El resultat d'aquests estudis està, doncs, en desacord amb els aportats per els grups de Wakelam i Beitner i, per tant, posem en qüestió les seves hipòtesis sobre l'acció reguladora de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, basades, per altra banda, en dades indirectes.

Apart d'aquestes activitats fosfatasa més o menys ben caracteritzades, s'ha descrit que la fosfoglucomutasa és capaç d'hidrolitzar la glucosa 1,6-bisfosfat a través d'una reacció colateral (39). El seu mecanisme de reacció té lloc a través de la formació d'un fosfoenzim, a partir de la transferència d'un grup fosfat des de la glucosa 1,6-bisfosfat al centre actiu de l'enzim. Si el fosfoenzim s'hidrolitza i el fosfat és cedit a l'aigua, el resultat és

una activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Ray i col. (139) han senyalat que la fosfoglucomutasa pot funcionar aleshores com una glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa poc efectiva, però molt específica i d'alta afinitat ($K_m \approx 1 \mu M$). Altres autors han senyalat, però, que aquesta reacció és massa lenta per explicar la degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat en teixits (29,140). També s'ha suggerit que la fosfoglucomutasa pot catalitzar la degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat mitjançant la reacció reversa de la seva activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa a partir de la fructosa 1,6-bisfosfat, però possiblement també es tracta d'una activitat massa baixa per a tenir un paper fisiològic (44,146).

En múscul hi han descrits pocs resultats i, com que l'activitat fosfoglucomutasa és força elevada (240 U/g teixit), es va fer un estudi sobre la seva activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Treballant amb enzim purificat procedent de múscul de conill es va assajar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en absència i presència d'un activador, la xilosa 1-fosfat. Aquesta molècula exerceix el seu efecte perquè ocupa en el centre actiu una posició similar a la que ocuparia la glucosa 1-fosfat, però sense l'hidroximetil en C₆, de manera que és incapaç d'acceptar el grup fosforil, que és aleshores transferit a l'aigua. S'havia descrit que l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa de fetge en absència de xilosa 1-fosfat era indetectable (43) i que en el cas del múscul era encara més baixa (29). Malgrat això, en el nostre cas va ésser fàcilment

detectable utilitzant el mètode radioactiu dissenyat per nosaltres.

La relació d'activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa / glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa va ésser de $1/15/10^6$, que suposa una relació glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa de $1/70000$. Ray i col. (39) han descrit una relació $1/2 \cdot 10^5 / 3 \cdot 10^{10}$, però treballaven amb el fosfoenzim aïllat, mentre que en el nostre cas treballàvem amb l'enzim comercial, el qual està només parcialment fosforilat, i l'incubàvem amb el substrat glucosa 1,6-bisfosfat, sense aïllar el fosfoenzim. Aquestes poden ésser les causes de les diferències trobades. La relació glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa descrita per Ray i col.laboradors és $1/150000$, del mateix ordre que la trobada en aquest treball. Hirose i col. (43) han descrit, en fosfoglucomutasa purificada de fetge, una relació glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa de $1/154000$, ja que no detecten activitat en absència de xilosa 1-fosfat. Utilitzaven un mètode basat en la determinació del fosfat alliberat, que possiblement no tenia prou sensibilitat.

Hem calculat en extracte de múscul de rata una activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de 0,502 mU/ml, mentre que en presència de xilosa 1-fosfat, és de 0,937 mU/ml. L'activitat fosfoglucomutasa d'aquest mateix extracte era de 57 U/ml. Si assumim que la relació glucosa 1,6-

bisfosfat fosfatasa / fosfoglucomutasa és la mateixa que en múscul de conill (1/10⁶) l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa deguda a la fosfoglucomutasa seria de 0,057 mU/ml, és a dir, aproximadament un 10% de l'activitat total. Podem considerar ara l'activació per xilosa 1-fosfat: assumim també una activació de 15 vegades, de manera que l'activitat fosfatasa deguda a la fosfoglucomutasa seria de 0,855 mU/ml. Sumades a les 0,502 mU/ml basals, donarien un total de 1,300 mU/ml, bastant similar a les 0,937 obtingudes en presència de xilosa 1-fosfat.

En quant a l'efecte del vanadat sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa, cal dir que es tracta d'un potent inhibidor d'aquells enzims que funcionen a través d'un fosfoenzim intermediari, entre ells la fosfoglucomutasa i també algunes fosfatases, com l'àcida, l'alcalina i les ATPases (361). Segons els nostres resultats, el vanadat no té efecte sobre l'activitat fosfatasa de la fosfoglucomutasa, i això suggereix que l'anió no interfereix realment amb la formació del fosfoenzim, sinò en un canvi de conformació posterior del centre actiu, necessari perquè es manifesti l'activitat mutasa i també l'activitat sintasa, però no l'activitat fosfatasa. Aquest canvi de conformació ha estat suggerit per Ma i Ray (27) en el seu model de "intercanvi", segons el qual es formen successivament dos complexos Ed·glucosa 1,6-bisfosfat en el cicle catalític, que impliquen diferents interaccions entre l'anell de glucosa i l'enzim.

L'assaig radioactiu ha resultat de gran utilitat en aquest tipus d'estudi, degut a la seva sensibilitat i a que no és afectat per el vanadat. El disseny d'aquesta tècnica va sorgir de la necessitat d'un mètode sensible i fiable per a determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, característiques que no eren reunides per el mètode d'Itaya o l'espectrefotomètric, encara que cadascun d'aquests tenia els seus propis avantatges.

Es tracta d'un mètode que no estava descrit a la literatura, per la qual cosa va ésser necessari dissenyar cada una de les fases: síntesi i purificació del substrat ¹⁴[U C]-glucosa 1,6-bisfosfat, i separació i quantificació de substrat i productes després de la incubació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. La síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat per acció de la fosfofructoquinasa estava ja descrita (144,145). Vem preferir utilitzar l'isòtop ¹⁴C per raons d'infraestructura del laboratori i perquè, ja que desconeixiem el fosfat que era hidrolitzat per la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, era més adequat tenir una molècula marcada uniformement. La separació d'hexoses mono i bisfosfat mitjançant cromatografia en Dowex AG-1-X8 ha estat ampliament descrita i utilitzada, però en el nostre cas va ésser necessari incorporar l'elució amb bicarbonat amònic per tal de poder obtenir finalment una preparació de glucosa 1,6-bisfosfat lliure de sals.

Pel que fa a la separació de substrat i productes després de la incubació per determinar l'activitat fosfatasa,

es va escollir una cromatografia de bescanvi iònic en paper degut a la seva elevada resolució i senzillesa d'utilització. La separació dels derivats fosforilats de la glucosa no està gaire descrita a la bibliografia, encara que sí la d'altres compostos d'estructura similar, per la qual cosa va ésser necessari fer una sèrie de proves encaminades a l'optimització del mètode.

Es interessant establir una comparació entre les vies de degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat i dels altres metabòlits bisfosforilats: 2,3-bisfosfoglicerat i fructosa 2,6-bisfosfat.

El metabolisme del 2,3-bisfosfoglicerat és dut a terme principalment per dos enzims multifuncionals, la fosfoglicerat mutasa i la 2,3-bisfosfoglicerat sintasa-fosfatasa, relacionats entre ells des del punt de vista mecanístic ja que posseeixen activitat mutasa, sintasa i fosfatasa. La similitud entre aquests enzims i la fosfoglucomutasa i la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa específica és gran. La relació d'activitats fosfatasa / sintasa / mutasa de la fosfoglicerat mutasa de múscul esquelètic és 1/2,2/16600, és a dir, que té una activitat fosfatasa molt més elevada que la fosfoglucomutasa. L'anomenada sintasa-fosfatasa té una relació d'activitats 1/110/2800, mentre que l'activitat fosfatasa de la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa és indetectable. Les Km de l'activitat fosfatasa d'aquests dos enzims són 300 μ M i 60 μ M respectivament i el pH òptim és àcid (5,0-5,2). L'activitat

fosfatasa és estimulable pel 2-fosfoglicolat, que, per tant, té un paper similar a la xilosa 1-fosfat en el cas de la fosfoglucomutasa (362).

A més d'aquests dos enzims, ben caracteritzats, en múscul esquelètic s'han identificat dues activitats fosfatasa que són similars en part a l'activitat fosfatasa descrita per nosaltres. No són estimulables per el 2-fosfoglicolat, són força inestables i no s'han purificat totalment. Les Km són relativament elevades (0,45 i 0,65 mM) i el pH òptim és de 6,0 en els dos casos (362).

En el cas del 2,3-bisfosfoglicerat, es creu que la degradació del metabòlit en teixits va a càrrec de la mateixa fosfoglicerat mutasa, degut a la seva activitat fosfatasa intrínseca elevada. En eritròcits, en canvi, on l'activitat sintasa-fosfatasa és alta, pot estar a càrrec d'aquest enzim (362).

En el cas de la glucosa 1,6-bisfosfat, la situació no és gens clara ja que la fosfoglucomutasa té una activitat fosfatasa molt baixa i és inverosímil que jugui un paper molt important. L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa identificada per nosaltres (pic III), encara que té un pH òptim neutre, té una Km elevada i per tant és possible que tampoc tingui un paper essencial. Pot existir un altre enzim, possiblement activat per nucleòtids amb nucli de guanina, que no hem arribat a caracteritzar, que pot ésser el responsable de la degradació del metabòlit en condicions normals.

Pel que fa a la fructosa 2,6-bisfosfat, l'enzim responsable de la seva síntesi i degradació, ja que es tracta d'un únic enzim amb les dues activitats (272), està ben caracteritzat en fetge, però no en altres teixits. El fet que sigui un enzim bifuncional l'assimila als enzims multifuncionals del metabolisme del 2,3-bisfosfoglicerat i de la glucosa 1,6-bisfosfat, encara que no sembla que les activitats quinasa i fosfatasa estiguin localitzades en el mateix centre actiu. L'activitat fructosa 2,6-bisfosfat fosfatasa (269) té una Km per la fructosa 2,6-bisfosfat molt baixa (0,1 μ M) i un pH òptim àcid (5,5-6,0). Es inhibida per la fructosa 6-fosfat, el substrat de la quinasa, i activada per el glicerol 3-fosfat, el glicerol 2-fosfat i la dihidroxiacetona fosfat. Sembla que el glicerol 3-fosfat és un anàleg de la porció C₄-C₆ de la fructosa 6-fosfat i pot competir amb ella, de manera que elimina el seu efecte inhibidor i forma un complex amb l'enzim d'activitat hidrolítica elevada. El GTP, ITP i ATP (en aquest ordre) són també activadors de la fructosa 2,6-bisfosfat fosfatasa, ja que incrementen la seva velocitat màxima. En aquest cas no és un efecte similar al de la xilosa 1-fosfat ja que es precisa magnesi, cosa que indica que el complex amb el metall és el verdader activador. A més, l'efecte només és visible a pH lleugerament àcid.

4.5. ACTIVITAT ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA

Durant la purificació de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic de porc es va trobar que la major part de l'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa eluia juntament amb el pic d'activitat sobre la glucosa 1,6-bisfosfat en la cromatografia de DE-cel·lulosa. En un pas posterior, la cromatografia d'afinitat en Sepharose acoblada a glucosamina 6-fosfat, s'identificava un gran pic d'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa, que pràcticament no tenia activitat sobre glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 1,6-bisfosfat o glucosa 6-fosfat. El fet que mai s'hagués descrit en teixits de mamífer la presència d'una fosfatasa que actués a pH neutre sobre la glucosa 1-fosfat ens va portar a purificar i caracteritzar aquest enzim.

El procediment de purificació dissenyat permet la separació d'aquesta fosfatasa de la fosfoglucomutasa i d'altres fosfatases, de manera que s'obté una preparació altament purificada. L'enzim és específic per les aldohexoses 1-fosfat, ja que, a més de la glucosa 1-fosfat, és capaç d'hidrolitzar només a la galactosa 1-fosfat i, amb menys eficiència, a la mannosa 1-fosfat, d'entre una àmplia gama de compostos fosforilats que inclou sucres, nucleòtids, aminoàcids i p-nitrofenilfosfat. No és una activitat colateral de la fosfoglucomutasa, galactoquinasa, glicògeno-fosforilasa o proteïno-fosfatasa, ja que la preparació purificada està lliure d'aquestes activitats.

Aquesta aldohexosa l-fosfat fosfatasa té algunes propietats comuns amb la glucosa l-fosfat fosfatasa trobada en sang de cuc de seda (322), que també mostra una alta especificitat de substrat, ja que, d'una sèrie d'esters naturals, hidrolitza només la glucosa l-fosfat i la galactosa l-fosfat, encara que el p-nitrofenilfosfat és també un substrat eficaç. Ambdós enzims, el de porc i el de cuc de seda, són inhibits per fluorurs i afectats de manera similar per els productes de reacció: inhibits per el fosfat però no afectats per glucosa i galactosa. En canvi, els dos enzims difereixen en el pH òptim i el requeriment de cations divalents. Mentre que l'enzim de porc té un pH òptim neutre i requereix magnesi, la fosfatasa de cuc de seda té un pH òptim àcid (4,0-4,5) i no és afectada pels cations.

L'aldohexosa l-fosfat fosfatasa es diferencia també de la glucosa 6-fosfat fosfatasa i de la fosfatasa àcida. Al revés que la aldohexosa l-fosfat fosfatasa, la glucosa 6-fosfat fosfatasa és inhibida per cations divalents, incloent el magnesi, el zinc i el calci i per nucleòsids di i trifosfat (34). Les fosfatases àcides no requereixen magnesi i són inhibides per calci, tartrat o nucleòtids d'adenina, segons l'isoenzim de que es tracti (320). La glucosa l-fosfat és mal substrat per la fosfatasa àcida (10% de l'activitat sobre p-nitrofenilfosfat).

El paper fisiològic de l'aldohexosa l-fosfat fosfatasa és incert. La seva K_m per la glucosa l-fosfat (0,7 mM) és molt més alta que la concentració de glucosa l-fosfat

en múscul (50 μM). A més, la fosfoglucomutasa, que està present en múscul de porc a concentracions molt més altes que l'aldohexosa 1-fosfat fosfatasa, té una K_m per la glucosa 1-fosfat més baixa (10 μM) (9). Per tant, és segur que en una situació normal la glucosa 1-fosfat és metabolitzada prèvia conversió a glucosa 6-fosfat mitjançant la fosfoglucomutasa.

Malgrat això, l'aldohexosa 1-fosfat fosfatasa pot tenir un paper important quan s'acumula galactosa 1-fosfat en teixits, com és el cas de pacients galactosèmics (327) o animals que ingereixen dietes altes en galactosa (335). S'ha demostrat que, en aquestes circumstàncies, la galactosa 1-fosfat és convertida a galactitol a través d'una ruta alternativa que implica el pas a galactosa lliure i la reducció d'aquesta a galactitol, per acció d'una aldosa reductasa (324). El galactitol s'elimina aleshores per l'orina. Els nivells de galactosa 1-fosfat estan augmentats en eritròcits, fetge i ronyó dels pacients galactosèmics (327,332). En cervell, cristal·lí i múscul esquelètic es troben concentracions altes de galactitol (330,331,333). S'ha postulat que és l'acumul de galactosa 1-fosfat és el que origina, almenys en alguns teixits, les lesions característiques de la malaltia, degut a l'elevat nombre d'enzims que poden ésser inhibits per concentracions altes d'aquest metabòlit (vegeu Introducció).

Per tant, l'aldohexosa 1-fosfat fosfatasa de múscul esquelètic pot tenir un paper en l'inici de la ruta metabòlica que porta a la síntesi del galactitol, que després

serà excretat. Encara que el valor de la K_m d'aquest enzim per la galactosa 1-fosfat és alta (0,8 mM), és molt més baixa que la K_m de l'aldosa reductasa per la galactosa (12-20 mM) i del mateix ordre que la K_m de la galactoquinasa per la galactosa (0,6 mM). La galactosa 1-fosfat pot ésser substrat per la fosfoglucomutasa (21) però la K_m que presenta és del mateix ordre (>0,2 mM).

De fet, en cervell de pollastres alimentats amb dietes altes en galactosa, Kozak i Wells (335) han identificat la presència d'una galactosa 1-fosfat fosfatasa, que explica el perquè en aquest teixit es troben concentracions altes de galactosa, però no de galactosa 1-fosfat. No es fa, però, una caracterització que permeti comparar-la amb la descrita en el present treball. Els autors postulen que podria, juntament amb la galactoquinasa, formar un cicle fútil que contribuiria a explicar els nivells baixos d'ATP que es troben en aquestes condicions.

La presència d'una fosfatasa ha estat suggerida també per Mayes i Miller (334) en fibroblasts procedents de malalts galactosèmics, en els quals es troba un acúmulo de galactosa 1-fosfat si creixen en un medi ric en galactosa. Aquest acúmulo és transitori, de manera que els nivells disminueixen encara que segueixin exposats al mateix medi. Els autors suggereixen també un cicle de fosforilació / defosforilació similar al proposat en cervell de pollastre. L'activitat fosfatasa implicada tampoc ha estat caracteritzada, i no podem establir cap comparació amb els nostres resultats.

5. CONCLUSIONS

- 1.- S'ha estudiat la variació dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, hexoses monofosforilades, glicogen i activitats enzimàtiques relacionades amb la glucosa 1,6-bisfosfat en el teixit muscular de rata sotmesa a diferents graus de dejuni. Els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat disminueixen progressivament fins arribar a un 25% dels inicials a les 72 hores de dejuni. Les activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i sintasa no varien significativament durant aquest procés.

- 2.- S'ha estudiat la variació dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i de diversos metabòlits glicolítics, fructosa 1,6-bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat, ATP, glucosa 6-fosfat, lactat i glicogen, en el múscul gastrocnemius de rata estimulat a dues freqüències: 5 Hz i 25 Hz. Glicogen, lactat, ATP i glucosa 6-fosfat segueixen les variacions ja descrites a la bibliografia. Les variacions de les hexoses fosforilades són les següents: la fructosa 2,6-bisfosfat no varia significativament excepte els primers 10 segons a 25 Hz, la fructosa 1,6-bisfosfat té un patró característic segons el qual s'eleva transitòriament, sobretot en contracció tetànica. La glucosa 1,6-bisfosfat s'eleva fins arribar al triple del seu nivell basal, a ambdues freqüències de contracció.

- 3.- Es proposa un paper per a la glucosa 1,6-bisfosfat com a activador de la fosfofructoquinasa muscular en aquest procés, especialment a partir dels 10 segons. No sembla que la glucosa 1,6-bisfosfat tingui un paper important com a desinhibidor de la fosfoglucomutasa.
- 4.- S'han determinat els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat i glucosa 1,6-bisfosfat en diversos tipus de múscul esquelètic de rata en relació amb la seva composició de fibres. Existeix una relació entre abundància de fibres IIb i concentració de fructosa 2,6-bisfosfat i glucosa 1,6-bisfosfat, ja que l'extensor llarg dels dits (90% fibres IIb) és el que té una concentració més elevada d'ambdós metabòlits, mentre que el soleus (85% fibres I) és el que té la concentració més baixa. La correspondència entre composició de fibres i concentració del metabòlit és més estricta en el cas de la glucosa 1,6-bisfosfat.
- 5.- S'ha determinat en aquests músculs la concentració de glicogen, fosfofructoquinasa, glicògeno-fosforilasa i fosfoglucomutasa. Hi ha també una relació entre caracter glicolític i abundància de glicogen, fosfofructoquinasa i fosforilasa. L'activitat fosfoglucomutasa és similar en els quatre tipus de músculs, independentment de la seva composició de fibres. Les activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i fosfofructoquinasa-2 són baixes i no

semblen estar relacionades amb el tipus muscular.

6.- S'ha dissenyat i posat a punt una tècnica per determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa basat en la utilització de $[U^{14}C]$ -glucosa 1,6-bisfosfat. Per a fer-ho, s'han hagut d'optimitzar les següents fases: síntesi de $[U^{14}C]$ -glucosa 1,6-bisfosfat mitjançant una reacció colateral de la fosfofructoquinasa, purificació de la $[U^{14}C]$ -glucosa 1,6-bisfosfat sintetitzada per cromatografia de bescanvi iònic en Dowex AG-1-X8 i separació de substrat i productes després de la incubació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa mitjançant cromatografia en paper de bescanvi iònic Whatman DE-81.

7.- Les modificacions principals de les tècniques descrites per cada una d'aquestes fases són:

- síntesi: incorporació d'un sistema de regeneració d'ATP basat en la reacció catalitzada per la mioquinasa.

- purificació: elució del Dowex AG-1-X8 mitjançant un gradient discontinu de bicarbonat amònic.

- separació per cromatografia en paper: la fase mòbil amb millor resolució va resultar ésser etanol / àcid fòrmic / aigua en relació 40/15/45.

8.- El rendiment de cada pas era: síntesi \approx 60%, cromatografia en Dowex AG-1-X8 \approx 85-95%.

- 9.- S'ha estudiat l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en diferents teixits de porc. L'activitat que presenten és (mU / g teixit \pm S.E.M.): múscul esquelètic 31,7 - 4,6, fetge 75,7 - 7,44, cervell 15,4 - 2,1 i múscul cardíac 16,9 - 4,4.
- 10.- La cromatografia de bescanvi iònic en DE-cel.lulosa fa possible separar el principal pic d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (pic III) de la fosfoglucomutasa i, en gran part, de la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa dependent d'1,3-bisfosfoglicerat.
- 11.- S'ha caracteritzat el pic que contenia la major part de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (pic III). Les seves característiques funcionals són: a) àmplia especificitat de substrat (hidrolitza, a més de glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat i fructosa 1,6-bisfosfat, però no el p-nitrofenilfosfat), b) pH òptim neutre (7,0-7,2), c) requeriment d'un catió divalent (magnesi millor que manganès, mentre que calci, zinc i cobalt no tenen efecte), d) és fortament inhibida per el fluorur i també per el clorur, a concentracions més altes, e) la K_m per la glucosa 1,6-bisfosfat és 800 μ M. Es, doncs, un enzim diferent de les fosfatases inespecífiques, però que no s'assimila a la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa aïllada de cervell per Guha i Rose (160).

12.- Es va estudiar el perfil d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa després d'una cromatografia en DE-cel.lulosa d'extractes procedents de fetge, cervell i cor de porc. En comparar amb el perfil característic de múscul esquelètic, va resultar que cervell i cor tenien un perfil similar, tant d'activitat fosfatasa com de fosfoglucomutasa i glucosa 1,6-bisfosfat sintasa. El fetge, al contrari, es diferenciava perquè l'activitat fosfatasa amb afinitat per la columna representava una fracció molt petita de la total.

13.- S'ha estudiat l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa intrínseca de la fosfoglucomutasa purificada de múscul esquelètic de conill i d'extracte de múscul de rata. S'ha comprovat l'efecte activador de la xilosa 1-fosfat sobre aquesta activitat. La relació d'activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa / glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa trobada ha estat $\frac{1}{15/10^6}$, que suposa una relació glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activada / fosfoglucomutasa de 1/70000.

14.- El vanadat no té cap efecte sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa ni sobre la seva activació per xilosa 1-fosfat. Aquesta dada recolza la hipòtesi de l'intercanvi exposada per altres autors per explicar el mecanisme de reacció

detallat de la fosfoglucomutasa. El vanadat tampoc afecta en absolut l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en extracte de múscul de rata.

15.- S'ha identificat un activador termoestable de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa present en l'extracte bullit de múscul de rata. Aquest efecte no era degut ni al calci-calmodulina ni a l'IMP, descrits per altres autors com a activadors de l'enzim.

16.- La caracterització de l'activador ha donat els següents resultats: estabilitat al tractament àcid o bàsic, fixació al carbó actiu, afinitat per l'intercanviador aniònic Dowex AG-1-X8 i estabilitat enfront la fosfatasa alcalina. Aquestes proves indiquen que es tracta d'un nucleòsid, estable al tractament àcid i bàsic i no afectat per la fosfatasa alcalina.

17.- Els nucleòtids que van resultar més efectius com a activadors de la fosfatasa van ésser els que contenien guanina, mentre que els d'adenina ho eren parcialment. El reste no tenia cap efecte.

18.- El resultat dels estudis fets sobre l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic de porc i rata està en desacord amb els descrits pels grups de Beitner i Wakelam que, sense cap dada

concreta que avaluï la seva hipòtesi, atribueixen a la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa un paper preponderant en el control del metabolisme de la glucosa 1,6-bisfosfat en múscul. Tampoc sembla haver similitud amb l'enzim parcialment purificat i caracteritzat de cervell de ratolí.

19.- S'han obtingut preparacions altament purificades d'una aldohexosa 1-fosfat fosfatasa específica a partir de múscul esquelètic de porc. Aquest enzim, no descrit a la bibliografia, és capaç d'hidrolitzar només els següents compostos: glucosa 1-fosfat, galactosa 1-fosfat i mannanosa 1-fosfat. L'enzim s'ha purificat 3300 cops i l'activitat específica obtinguda és de 1120 mU/mg.

20.- L'aldohexosa 1-fosfat fosfatasa té les següents propietats estructurals i funcionals: a) pes molecular de 54 Kd, b) pH òptim de 7,0-7,2 per glucosa 1-fosfat i galactosa 1-fosfat i de 7,4 per mannanosa 1-fosfat, c) requeriment d'un catió divalent, de manera que el magnesi és més efectiu que el manganès, c) inhibició per fluorur, clorur, fosfat ($K_i \approx 1,5$ mM), però no per vanadat, d) constants cinètiques: K_m G 1-P $\approx 0,7$ mM, K_m Gal 1-P $\approx 0,8$ mM, K_m M 1-P $\approx 1,25$ mM.

21.- Es proposa que aquesta aldohexosa 1-fosfat fosfatasa pot estar implicada en processos on es produeix un

acúmulo de galactosa 1-fosfat, com succeix en els malalts galactosèmics o en animals alimentats amb dietes riques en galactosa.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- HERS, H-G. i VAN SCHAFTINGEN, E. (1982) *Biochem. J.* 206, 1-12.
- 2.- FOE, L.G.; LATSHAW, S.P. i KEMP, R.G. (1983) *Biochemistry* 22, 4601-4606.
- 3.- BEITNER, R. (1979) *Trends in Biochem. Sci.* 4, 228-230.
- 4.- BEITNER, R. (1984) *Int. J. Biochem.* 16, 579-585.
- 5.- GREENWALD, I. (1925) *J. Biol. Chem.* 63, 339-349.
- 6.- GRISOLIA, S. (1968) en "Homologous Enzymes and Biochemical Evolution", pp. 167-198 (Thoai and Roche, eds.) Gordon & Breach Science Pub. Inc., London.
- 7.- SHETTZ, M.P. i CASALY, J. (1981) *Scand. J. Lab. Invest.* 41, 117-122.
- 8.- CHIBA, H. i SASAKI, R. (1978) *Cuur. Top. Cell. Regul.* 14, 75-116.
- 9.- RAY, W.J. jr. i PECK, E.J. jr. (1972) en "The Enzymes" 3^a ed., Vol. VI, pp. 407-480 (P.D. Boyer, ed.) Academic Press Inc., NY.
- 10.- DAWSON, D.M. i MITCHELL, A. (1969) *Biochemistry* 8, 609-614.
- 11.- LELOIR, L.F.; TRUCCO, R.E.; CARDINI, C.E.; PALADINI, A.C. I CAPUTTO, C. (1948) *Arch. Biochem. Biophys.* 19, 339-340.
- 12.- CAPUTTO, R.; LELOIR, L.F.; TRUCCO, R.E.; CARDINI, C.E. i PALADINI, A.C. (1948) *Arch. Biochem.* 18, 201-203.
- 13.- CARDINI, C.E.; PALADINI, A.C.; LELOIR. L.F. i TRUCCO, R.E. (1949) *Arch. Biochem.* 22, 87-99.
- 14.- LELOIR, L.F. i PALADINI, A.C. (1957) *Methods in Enzymol.* Vol. III, pp. 143-147. (Academic Press Inc, New York).

- 15.- KENDAL, P. i STICKLAND, L.H. (1938) *Biochem. J.* 32, 572-576.
- 16.- SUTHERLAND, E.W.; COHN, M.; POSTERNAK, T. i CORI, C.F. (1949) *J. Biol. Chem.* 180, 1285-1291.
- 17.- NAJJAR, V.A. i PULLMAN, M.E. (1954) *Science* 119, 631-633.
- 18.- JOSHI, J.G. i HANDLER, P. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3343-3350.
- 19.- RAY, W.J. jr. i ROSCELLI, G.A. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 1228-1236.
- 20.- RAY, W.J. jr. i ROSCELLI, G.A. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3935-3940.
- 21.- LOWRY, O.H. i PASSONNEAU, J.V. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 910-916.
- 22.- ALPERS, J.B. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1698-1704.
- 23.- BARTRONS, R.; CARRERAS, M.; CLIMENT, F. i CARRERAS, J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 842, 52-55.
- 24.- MULHAUSEN, H. i MENDICINO, J. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4038-4046.
- 25.- GALLOWAY, C.M.; DUGGER, W.A. i BLACK, C.C. jr. (1985) *Plant Physiol.* 79, 920-922.
- 26.- RAY, W.J. jr.; MILDVAN, A.S. i LONG, J.W. (1973) *Biochemistry* 12, 3724-3732.
- 27.- MA, C. i RAY, W.J. jr. (1980) *Biochemistry*, 19, 751-759.
- 28.- LOWE, G. i POTTER, B.V.L. (1981) *Biochem. J.* 199, 693-698.
- 29.- JAMIL, H. i CLARKE, J.B. (1985) *Biochem. J.* 230, 791-795.

- 30.- ANDERSON, L. i KELLEY, J.J. (1959) J. Am. Chem. Soc. 81, 2275.
- 31.- HANABUSA, K.; DOUGHERTY, H.G.; DEL RIO, C; HASHIMOTO, T. i HANDLER P. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3930-3936.
- 32.- SASAKI, R.; UTSUMI, S.; SUGIMOTO, E. i CHIBA, H. (1976) Eur. J. Biochem. 66, 523-533.
- 33.- CARRERAS, J.; BARTRONS, R.; BOSCH, J. i PONS, G. (1981) Comp. Biochem. Physiol. 70B, 477-485.
- 34.- NORDLIE, R.C. (1971) en "The Enzymes", 3^a ed., Vol. IV, pp.543-610 (P.D. Boyer, ed.) Academic Press Inc., NY.
- 35.- BOSCA, L.; ARAGON, J.J. i SOLS, A. (1985) J. Biol. Chem. 260, 2100-2107.
- 36.- HASHIMOTO, T. i HANDLER, P. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3940-3948.
- 37.- RAY, W.J. jr. i LONG, J.W. (1976) Biochemistry 15, 3990-3993.
- 38.- RAY, W.J. jr. i LONG, J.W. (1976) Biochemistry 15, 3993-4006.
- 39.- RAY, W.J. jr.; LONG, J.W. i OWENS, J.D. (1976) Biochemistry 15, 4006-4017.
- 40.- RAY, W.J. jr. i LONG, J.W. (1976) Biochemistry 15, 4018-4025.
- 41.- ROSE, Z.B. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 140, 508-512.
- 42.- FROMM, H.J. i RUDOLPH, F.B. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2104-2111.
- 43.- HIROSE, M.; UEDA, M. i CHIBA, H. (1976) Agr. Biol. Chem. 40, 2433-2439.
- 44.- PASSONNEAU, J.V.; LOWRY, O.H.; SCHULTZ, D.W. i BROWN, J.G. (1969) J. Biol. Chem. 244, 902-909.

- 45.- HIROSE, M.; SUGIMOTO, E. i CHIBA, H. (1972) *Agr. Biol. Chem.* 36, 2157-2162.
- 46.- LEVEY, G.S. i ALPERS, J.B. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4153-4157.
- 47.- ALPERS, J.B. i LAM, G.K.H. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 200-204.
- 48.- KIRSCHENLOHR, H.L. i HOFER, H.W. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 220, 637-644.
- 49.- COLCA, J.R.; KOTAGAL, N.; LACY, P.E.; BROOKS, C.L.; NORLING, L.; LANDT, M. i McDANIEL, M.L. (1984) *Biochem. J.* 220, 529-537.
- 50.- NEWSHOLME, E.A. i LEECH, A.R. (1983) en "Biochemistry for the Medical Sciences", pp. 37-44 (Ed. Wiley & Sons Ltd., Chichester).
- 51.- PECK, E.J. jr i RAY, W.J. jr (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1160-1167.
- 52.- JOSHI, J.G.; HOOPER, J.; KUWAKI, T.; SAKURADA, T.; SWANSON, J.R. i HANDLER, P. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 1482-1487.
- 53.- HASHIMOTO, T.; SASAKI, H. i YOSHIKAWA, H. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 368-371.
- 54.- BEITNER, R. i HABERMAN, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334, 237-241.
- 55.- DUCKWORTH, H.W. i SANWAL, B.D. (1972) *Biochemistry* 11, 3182-3188.
- 56.- DUCKWORTH, H.W.; BARBER, B.H. i SANWAL, B.D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1431-1435.
- 57.- RAY, W.J. jr.; SZYMANKI, E.S. i NG, L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 434-442.

- 58.- BEITNER, R.; HABERMAN, S. i LIVNI, L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 397, 355-369.
- 59.- SOLS, A.; CASTAÑO, J.G.; ARAGON, J.J.; DOMENECH, C.; LAZO, P.A. i NIETO, A. en "Metabolic Interconversion of Enzymes 1980", pp. 111-123. H. Holzer, Ed. (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg).
- 60.- KEMP, R.G. i FOE, L.G. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 57, 147-154.
- 61.- FOE, L.G i KEMP, R.G. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 726-730.
- 62.- VORA, S.; OSKAM, R. i STAAL, G.E.J. (1985) *Biochem. J.* 229, 333-341.
- 63.- TORNHEIM, K. i LOWENSTEIN, J.M. (1975) *J. Biol. Chem.* 251, 7322-7328.
- 64.- KEMP, R.G. (1969) *Biochemistry* 8, 3162-3168.
- 65.- OGAWA, Y. i ATKINSON, D.E. (1985) *Biochemistry* 24, 954-958.
- 66.- KEMP, R.G. i KREBS, E.G. (1967) *Biochemistry* 6, 423-434.
- 67.- COLOMBO, G.; TATE, P.W.; GIROTTI, A.W. i KEMP, R.G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9404-9412.
- 68.- FRIEDEN, C.; GILBERT, H.R. i BOCK, P.E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5644-5647.
- 69.- PETTIGREW, D.W. i FRIEDEN, C. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1887-1895.
- 70.- KEMP, R.G.; TSAI, M.Y. i COLOMBO, G. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 942-948.
- 71.- PETTIGREW, D.W. i FRIEDEN, C. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1896-1901.

- 72.- HOFER, H.W. i PETTE, D. (1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1378-1392.
- 73.- KRAZANOWSKY, J. i MATSHINSKY, F.M. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 816-823.
- 74.- ROSE, I.A. i WARMS, J.V.B. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 1333-1340.
- 75.- KITAJIMA, S. i UYEDA, K. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7352-7357.
- 76.- TORNHEIM, K. (1985) J. Biol. Chem. 260, 7985-7989.
- 77.- UYEDA, K.; FURUYA, E. i LUBY, L.J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8394-8399.
- 78.- VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H.G. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 319-323.
- 79.- REINHART, G.D. i LARDY, H.A. (1980) Biochemistry 19, 1484-1490.
- 80.- REINHART, G.D. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10827-10830.
- 81.- REINHART, G.D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10576-10578.
- 82.- BEITNER, R.; HABERMAN, S. i CYCOWITZ, T. (1977) Biochim. Biophys. Acta 482, 330-340.
- 83.- MAYR, G.W. i HEILMEYER, L.M.G. jr. (1983) FEBS Lett. 159, 51-57.
- 84.- MAYR, G.W. (1984) Eur. J. Biochem. 143, 513-520.
- 85.- MAYR, G.W. (1984) Eur. J. Biochem. 143, 521-529.
- 86.- PATTEN, G.S. i CLARK, M.G. (1983) Biochem, J. 216, 717-725.
- 87.- PATTEN, G.S.; FILSELL, O.H. i CLARK, M.G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9480-9486.
- 88.- BEITNER, R. i KALANT, N. (1971) J. Biol. Chem. 246, 500-503.

- 89.- KALANT, N. i BEITNER, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 246, 504-507.
- 90.- MANSOUR, T.E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6059-6066.
- 91.- HUE, L.; BLACKMORE, P.F.; SHIKAMA, H.; ROBINSON-STEINER, A. i EXTON, J.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 4308-4313.
- 92.- MINATOGAWA, Y. i HUE, L. (1984) *Biochem. J.* 223, 73-79.
- 93.- LING, K.H.; MARCUS, F. i LARDY, H.A. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1893-1899.
- 94.- PARMEGIANNI, A.; LUFT, J.H.; LOVE, D.S. i KREBS, E.G. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4625-4637.
- 95.- BRAND, I.A. i SÖLING, H.D. (1975) *FEBS Lett.* 57, 163-168.
- 96.- HOFER, H.W. i FURST, M. (1976) *FEBS Lett.* 58, 118-122.
- 97.- HUSSEY, C.R.; LIDDLE, P.F.; ARDRON, D. i KELLET, G.L. (1977) *Eur. J. Biochem.* 80, 497-506.
- 98.- RIQUELME, P.T.; HOSEY, M.M.; MARCUS, F. i KEMP, R.G. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 1480-1489.
- 99.- UYEDA, K.; MIYATAKE, A.; LUBY, L.J. i RICHARDS, E.G. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8319-8327.
- 100.- KEMP, R.G.; FOE, L.G.; LATSHAW, S.P.; POORMAN, R.A. i HEINRIKSON, R.L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7282-7286.
- 101.- HOFER, H.W.; SCHLATTER, S. i GRAEFE, M. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 892-897.
- 102.- RIQUELME, P.T. i KEMP, R.G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4367-4371.
- 103.- SORENSEN-ZIGANKE, B. i HOFER, H.W. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 204-208.
- 104.- KITAJIMA, S.; SAKAKIBARA, R. i UYEDA, K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13292-13298.

- 105.- FOE, L.G. i KEMP, R.G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 6368-6372.
- 106.- HOFER, H.W. i SORENSEN-ZIGANKE, B. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 199-203.
- 107.- BAZAES, S.E.; FOE, L.G. i KEMP, R.G. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 218, 483-487.
- 108.- PILKIS, S.J.; CHRISMAN, T.; BURGESS, B.; McGRANE, M.M.; COLOSIA, S.; PILKIS, J.; CLAUS, T.H. i EL-MAGHRABI, M.R. (1983) Adv. Enzym. Regul. 21, 147-173.
- 109.- CLAUS, T.H.; SCHLUMPF, J.R.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J. i PILKIS, S.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6501-6505.
- 110.- BRAND, I.A. i SÖLING, H.D. (1982) Eur. J. Biochem. 122, 175-181.
- 111.- SÖLING, H.D.; KUDUZ, J. i BRAND, I.A. (1981) FEBS Lett. 130, 309-313.
- 112.- COLOWICK, S. P. (1974) in "The Enzymes", vol IX, pp 1-52 (3rd Ed. Paul Boyer Ed) Academic Press NY.
- 113.- GONZALEZ, C.; URETA, T.; SANCHEZ, R. i NIEMEYER, M. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 347-351.
- 114.- GERBER, G.; DREISSLER, H.; HEINRICH, R. i RAPOPORT, S.M. (1974) Eur. J. Biochem. 45, 39-52.
- 115.- LUECK, J.D. i FROMM, H.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1341-1347.
- 116.- BESSMAN, S.P. i GEIGER, P.J. (1980) Curr. Top. Cell. Regul. 16, 55-86.
- 117.- SPRENGERS, E.D.; KOENDERMAN, A.H.L. i STAAL, G.E.J. (1983) Biochim. Biophys. Acta 755, 112-118.

- 118.- LAZO, P.A.; SOLS, A. i WILSON, J.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7548-7551.
- 119.- CRANE, R.K. i SOLS, A. (1954) J. Biol. Chem. 210, 597-606.
- 120.- KOSOW, D.P.; OSKI, F.A.; WARMS, J.V.B. i ROSE, I.A. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 157, 114-124.
- 121.- KATZEM, H.M. i SCHIMKE, R.T. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1218-1222.
- 122.- KATZEN, H.M.; SODERMAN, D.D. i WILEY, C.E. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4081-4096.
- 123.- ROSE, I.A. i WARMS, J.V.B. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 171, 678-681.
- 124.- ROSE, I.A.; WARMS, J.V.B. i KOSOW, D.P. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 729-735.
- 125.- RIJKSEN, G. i STAAL, G.E.J. (1977) FEBS Lett. 80, 61-65.
- 126.- BEITNER, R. i LILLING, G. (1984) Int. J. Biochem. 16, 991-996.
- 127.- LOWRY, O.H.; PASSONNEAU, J.V.; HASSELBERGER, F.X. i SCHULZ, P.W. (1964) J. Biol. Chem. 139, 18-30.
- 128.- KNULL, H.R.; TAYLOR, W.F. i WELLS, W.W. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5415-5418.
- 129.- ÖZAND, P.; NARAHARA, H.T. i CORI, C.F. (1962) J. Biol. Chem. 237, 3037-3042.
- 130.- BEITNER, R. i NORDENBERG, J. (1979) Biochim. Biophys. Acta 583, 266-269.
- 131.- BEITNER, R. i NAOR, Z. (1972) Biochim. Biophys. Acta. 268, 761-766.

- 132.- BEITNER, R.; LILLING, G.; FRUCH, H.; BEN-PORAT, H. i SOFER, Y. (1983) *Biochem. Med.* 30, 369-380.
- 133.- SABULARSE, D.C. i ANDERSON, R.L. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 1423-1429.
- 134.- SABULARSE, D.C. i ANDERSON, R.L. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 848-855.
- 135.- KOSTER, J.F.; SLEE, R.G.; STAAL, G.E.J. i VAN BERKEL, T.J.C. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 258, 763-768.
- 136.- BADWEY, J.A. i WESTHEAD, E.W. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 275-281.
- 137.- MARCUS, C.J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2963-2966.
- 138.- LELOIR, L.F.; TRUCCO, R.E.; CARDINI, C.E.; PALADINI, A.C. i CAPUTTO, R. (1949) *Arch. Biochem.* 24, 65-74.
- 139.- SIDBURY, J.B. jr.; ROSENBERG, L.L. i NAJJAR, V.A. (1956) *J. Biol. Chem.* 222, 89-96.
- 140.- UEDA, M.; HIROSE, M. i CHIBA, H. (1976) *Agr. Biol. Chem.* 40, 2441-2448.
- 141.- CLIMENT, F.; CARRERAS, M. i CARRERAS, J. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* 81 B, 737-742.
- 142.- PALADINI, A.C.; CAPUTTO, R.; LELOIR, L.F.; TRUCCO, R.E. i CARDINI, C.E. (1949) *Arch. Biochem.* 23, 55-66.
- 143.- LELOIR, L.F. i TRUCCO, R.E. (1955) *Methods in Enzymol.* Vol. I pp. 354-356, (Colowick, s.p. & Kaplan, N.O. Eds.) Academic Press, NY.
- 144.- EYER, P. i PETTE, D. (1967) *Life. Sci.* 6, 191-196.
- 145.- EYER, P.; HOFER, H.W.; KRYSTEK, E. i PETTE, D. (1971) *Eur. J. Biochem.* 20, 153-159.
- 146.- GERBER, G.; WINCZUK, E. i RAPOPORT, S. (1973) *Acta Biol. Med. Germ.* 30, 759-771.

- 147.- UEDA, M.; HIROSE, M.; SASAKI, R. i CHIBA, H. (1978) J. Biochem. 83, 1721-1730.
- 148.- ROSE, I.A.; WARMS, J.V.B. i KAKLIJ, G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3466-3470.
- 149.- NINFALI, P.; ACCORSI, A.; PALMA, F.; FAZI, A.; PIATTI, E.; CHIARANTINI, L. i FORNAINI, G. (1984) Biochimie 66, 617-623.
- 150.- ACCORSI, A.; FAZI, A.; NINFALI, E.; PIATTI, E.; PALMA, F. i FORNAINI, G. (1984) Bull. Mol. Biol. Med. 9, 131-145.
- 151.- ACCORSI, A.; FAZI, A.; NINFALI, P.; PIATTI, E.; PALMA, F.; PIACENTINI, M. i FORNAINI, G. (1985) Comp. Biochem. Physiol. 80B, 839-842.
- 152.- ACCORSI, A.; FAZI, A.; PIATTI, E.; PALMA, F.; BOSSU, M. i FORNAINI, G. (1982) Bull. Mol. Biol. Med. 7, 85-96.
- 153.- WONG, L. J. i ROSE, I. A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5431-5439.
- 154.- ROSE, I.A.; WARMS, J.V.B. i LONG, L.J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4262-4268.
- 155.- CARRERAS, M.; CARRERAS, J. i CLIMENT, F. (1984) Resúmenes del XI Congreso de la S.E.B. (Puerto de la Cruz, Tenerife) p 207.
- 156.- PONS, G.; BARTRONS, R. i CARRERAS, J. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 658-663.
- 157.- HASHIMOTO, T. i YOSHIKAWA, H. (1966) J. Biochem. 59, 427-429.
- 158.- HASHIMOTO, T. i YOSHIKAWA, H. (1967) J. Biochem. 61, 760-767.
- 159.- GUHA, S.K. i ROSE, Z.B. (1982) J. Biol. Chem. 257, 6634-6637.

- 160.- GUHA, S.K. i ROSE, Z.B. (1983) *Biochemistry* 22, 1356-1361.
- 161.- YIP, V.; CARTER, J.G.; DICK, E.; ROSE, Z.B. i LOWRY, O.H. (1985) *J. Neurochem.* 44, 1741-1746.
- 162.- RAY, W.J.Jr.; SZYMANKI, E.S. i NG, L. (1978) *Biochem. Biophys. Acta.* 522, 434-442.
- 163.- ROSE, I.A.; WARMS, J.V.B. i KAKLIJ, G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4262-4268.
- 164.- HASHIMOTO, T.; JOSHI, J.G.; DEL RIO, C. i HANDLER, P. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 1671-1679.
- 165.- BEITNER, R.; NORDENBERG, J. i COHEN, T.J. (1979) *FEBS Letters* 104, 244-248.
- 166.- BEITNER, R. i COHEN, T.J. (1979) *IRCS Med. Sci.* 7, 24.
- 167.- NORDENBERG, J.; HEFFETZ, D.; COHEN, T.J. i BEITNER, R. (1981) *Int. J. Biochem.* 13, 317-321.
- 168.- BEITNER, R.; NORDENBERG, J.; COHEN, T.J. i BEERY, E. (1980) *Int. J. Biochem.* 11, 467-472.
- 169.- FRUCHT, H.; KAPLANSKY, M. i BEITNER, R. (1984) *Biochem. Med* 31, 122-129.
- 170.- FRUCHT, H.; LILLING, G. i BEITNER, R. (1984) *Int. J. Biochem.* 16, 397-402.
- 171.- BEITNER, R.; KAPLANSKY, M. i FRUCHT, H. (1985) *Int. J. Biochem.* 17, 545-550.
- 172.- BEITNER, R. i COHEN, T.J. (1980) *FEBS Letters* 115, 197-200.
- 173.- WAKELAM, J.O. i PETTE, D. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* 11, 71.
- 174.- WAKELAM, M.J.O.; EMMERICH, M. i PETTE, D. (1982) *Biochem. J.* 208, 517-519.

- 175.- BEITNER, R.; FRUCHT, H. i KAPLANSKY, N. (1984) IRCS Med. Sci. 12, 63-64.
- 176.- BEITNER, R. i FRUCHT, H. (1983) IRCS Med. Sci. 11, 935, 936.
- 177.- LILLING, G.; FRUCHT, H.; BEN-PORAT, H. i BEITNER, R. (1983) IRCS Med. Sci. 11, 130-131.
- 178.- UI, M. (1965) Am. J. Physiol. 209. 353-358.
- 179.- UI, M. (1965) Am. J. Physiol. 209, 359-364.
- 180.- DIETZ, M.R.; CHIASSON, J.L.; SODERLING, T.R. i EXTON, J.H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2301-2307.
- 181.- BEITNER, R.; HABERMAN, S. i NORDENBERG, J. (1978) Molec. Cell. Endocr. 10, 135-147.
- 182.- JOHNSON, G.B. (1974) Science 184, 28-37.
- 183.- BAUER, H.P.; BIRKEL, G. i HOFER, H.W. (1986) Int. J. Biochem. 18, 73-77.
- 184.- BIRKEL, G.; BAUER, H.P. i HOFER, H.W. (1986) Int. J. Biochem. 18, 79-83.
- 185.- WAKELAM, M.J.O. i PETTE, D. (1982) Biochem. J. 204, 765-769.
- 186.- VAN DER BOSCH, J.; SCHUDT, C. i PETTE, D. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 326-332.
- 187.- FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z.; EVINGER-HODGES, M.J.; FALEN, S.L.; LAU, R.L.; REGAN, J.F. i VERTEL, B.M. (1984) In Vitro, 20, 942-958.
- 188.- SCHUDT, C. i PETTE, D. (1978) Adv. Enzyme. Regul. 16, 121-139.
- 189.- PARENT, J.B.; TALLMAN, J.F.; HENNEBERRY, R.C. i FISHMAN, P.H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7782-7786.

- 190.- HEMS, D.A.; WHITTON, P.D. i MA, G.Y. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 411, 155-164.
- 191.- BERRIDGE, M.J. (1980) *Trends Pharmacol. Sci.* 1, 419-424.
- 192.- BEITNER, R.; FRUCHT, H. i KAPLANSKY, M. (1983) *Int. J. Biochem.* 15, 935-940.
- 193.- KAPLANSKY, M. i BEITNER, R. (1984) *IRCS Med. Sci.* 12, 174-175.
- 194.- PATTE, B.M.; OLIVER, K.L. i ENGEL, W.K. (1974) *Arch. Neurol.* 31, 347-349.
- 195.- MURPHY, D.L.; MENDELL, J.R. i ENGEL, W.K. (1973) *Arch. Neurol.* 28, 239-242.
- 196.- HUDECKI, M.S.; POLLINA, C.M.; BHARGAVA, A.K. i HUDECKI, R.S. (1980) *Arch. Neurol.* 37, 545-550.
- 197.- GOLDBERG, N.D. i HADDOX, M.K. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 823-896.
- 198.- GAUYLE, E.S.; PAGEL, J.; MONTI, J.A. i CHRISTIAN, S.T. (1978) *Life Sci.* 23, 159-166.
- 199.- CHEUNG, W.Y. (1982) *Fed. Proc.* 41, 2253-2257.
- 200.- EZRAILSON, E.G.; ENTMAN, M.L. i GARBER, A.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 12494-12498.
- 201.- KELLERMEYER, R.W. i GRAHAM, R.C. (1968) *New. Engl. J. Med.* 279, 859-866.
- 202.- MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D. i GLIROUD, J.A. (1983) *Gen. Pharmac.* 14, 209-229.
- 203.- MANIUSZKO-JAKONIUK, J.; WISNIEWSKY, K. i ROPELEWSKA, J. (1976) *Biochem. Pharmacol.* 25, 2593-2598.
- 204.- CHEUNG, W.Y. (1980) *Science* 207, 19-27.
- 205.- BEITNER, R. i HABERMAN, S. (1978) *Diabetologia* 15,40.

- 206.- BEERY, E.; KLEIN, S.; NORDENBERG, J. i BEITNER, R. (1980) *Biochem. Int.* 1, 526-531.
- 207.- FUJIMOTO, M. i OKABAYASHI, T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1332-1336.
- 208.- KWOCK, C.T. i AUSTIN, L. (1978) *Biochem. J.* 176, 15-22.
- 209.- KAMEYAMA, T. i ETLINGER, J.D. (1979) *Nature*, 344-346.
- 210.- APPEL, S.H. i ROSES, A.D. (1983) in "The Metabolic Basis of Inherited Disease" p. 1470-1496 (Mc Graw-Hill).
- 211.- GOLDSPIK, D.F. i GOLDSPIK, G. (1977) *Biochem. J.* 162, 191-194.
- 212.- BEITNER, R.; HABERMAN, S.; NORDENBERG, J. i COHEN, T.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 542, 537-541.
- 213.- BEITNER, R. i NORDENBERG, J. (1979) *FEBS Letters* 98, 199-202.
- 214.- BEITNER, R. i NORDENBERG, J. (1979) *IRCS med. Sci.* 7, 136.
- 215.- BEITNER, R.; COHEN, T.J.; NORDENBERG, J. i HABERMAN, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 586, 266-277.
- 216.- BEITNER, R.; NORDENBERG, J. i COHEN, T.J. (1979) *Int. J. Biochem.* 10, 603-608.
- 217.- BEITNER, R.; SOFER, Y. i CHEN-ZION, M. (1984) *Biochem. Med.* 32, 57-66.
- 218.- NORDENBERG, J.; KAPLANSKY, M. i BEITNER, R. (1980) *IRCS Med. Sci.* 8, 880.
- 219.- CLAUSEN, T. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 150, 66-71.
- 220.- NORDENBERG, J.; KAPLANSKY, M.; BEERY, E.; KLEIN, S. i BEITNER, R. (1982) *Biochem. Pharmac.* 31, 1025-1031.
- 221.- SINGER, I. i ROTENBERG, D. (1973) *N. Engl. J. Med.* 289, 254-259.

- 222.- NORDENBERG, J.; KLEIN, S.; BEERY, E.; KAPLANSKY, M. i BEITNER, R. (1981) *Int. J. Biochem.* 13, 1005-1009.
- 223.- GIL, J.; CARRERAS, J. i BARTRONS, R. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (en premsa).
- 224.- LOWRY, O.H.; BERGER, S.J.; CARTER, J.G.; CHI, M.M-Y.; MANCHESTER, J.K.; KNOR, J. i PUSATERI, M.E. (1983) *J. Neurochem* 41, 994-1010.
- 225.- ROSE, I.A. i WARMS, J.V.B. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1030-1036.
- 226.- BEITNER, R.; KLEIN, S. i NORDENBERG, J. (1982) *Int. J. Biochem.* 14, 195-199.
- 227.- SENER, A.; MALAISSE-LAGAE, F. i MALAISSE, W.J. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 1033-1040.
- 228.- GIROIX, M.H.; DUFRANE, S.P.; MALAISSE-LAGAE, F.; SENER, A. i MALAISSE, W.J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 543-548.
- 229.- GIROIX, M.H.; SENER, A.; PIPELEERS, D.G. i MALAISSE, W.J. (1984) *Biochem. J.* 223, 447-453.
- 230.- SENER, A.; GIROIX, M.H. i MALAISSE, W.J. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 223-226.
- 231.- SCHIMASSEK, H. i MITZKAT, H.J. (1963) *Biochem. Z.* 337, 510-518.
- 232.- ENGSTROM, L. (1978) *Curr. Top. Cell Regul.* 13, 29-51.
- 233.- VAN SCHAFTINGEN, E.; HUE, L. i HERS, H-G. (1980) *Biochem. J.* 192, 887-895.
- 234.- VAN SCHAFTINGEN, E.; HUE, L. i HERS, H-G. (1980) *Biochem. J.* 192, 897-901.
- 235.- VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 319-323.

- 236.- HESBAIN-FRISQUE, A.M.; VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 325-327.
- 237.- CLAUS, T.H.; SCHLUMPF, J.R.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J. i PILKIS, S.J. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 359-366.
- 238.- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J. i CLAUS, T.H. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 215, 379-389.
- 239.- CLAUS, T.H.; EL-MAGHRABI, M.T.; REGEN D.M.; STEWART, H.B.; McGRANE, M.; KOUNTZ, P.D.; NYFELER, F.; PILKIS, J. i PILKIS, S.J. (1984) Curr. Top. Cell Regul. 23, 57-86.
- 240.- RICHARDS, C.S. i UYEDA, K. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1535-1540.
- 241.- UYEDA, K.; FURYA, E. i SHERRY, A.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8679-8684.
- 242.- VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 319-323.
- 243.- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J.; CLAUS, T.H. I CUMMING, D.A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3171-3174.
- 244.- HEYLEN, A.; VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1982) FEBS Lett. 143, 141-143.
- 245.- MUNIYAPPA, K.; LEIBACH, F.H. i MENDICINO, J. (1983) Life Sci. 32, 271-278.
- 246.- BOSCA, L.; ARAGON, J.J. i SOLS, A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 486-491.
- 247.- JAMAL. A.; KELLET, G.L. i ROBERTSON, J.P. (1984) Biochem. J. 218, 459-464.
- 248.- LEDERER, B. i HERS, H-G. (1984) Biochem. J. 217, 709-714.

- 249.- MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F.; SENER, A.; VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1981) FEBS Lett. 125, 217-219.
- 250.- STOREY, K.B. (1983) FEBS Lett. 161, 265-268.
- 251.- REINHART, G.D. i LARDY, H.A. (1980) Biochemistry 19, 1477-1484.
- 252.- BARTRONS, R.; VAN SCHAFTINGEN, E.; VISSERS, S. i HERS, H-G. (1982) FEBS Lett. 143, 137-140.
- 253.- VAN SCHAFTINGEN, E.; LEDERER, B.; BARTRONS, R. i HERS, H-G. (1982) Eur. J. Biochem. 129, 191-195.
- 254.- VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1983) FEBS Lett. 164, 195-200.
- 255.- VAN SCHAFTINGEN, E. (1984) en "Methods in Enzymatic Analysis" vol. 6, pp 335-341 (Ed. H.U. Bergmeyer) Verlag-Chemie. Weinheim.
- 256.- TEJWANI, G.A. (1983) Adv. Enzymol. Rel. Areas Molec. Biol. 54, 121-194.
- 257.- BUCHANAN, B.B.; WOLOSUIK, R.A. i SCHURMAN, P. (1979) Trends Biochem. Sci. 4, 93-96.
- 258.- VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2861-2863.
- 259.- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J. i CLAUS, T.H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3619-3622.
- 260.- MORIKOFER-ZWEZ, S.; STOECKLIN, F.B. i WALTER, P. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 104-111.
- 261.- BOSCA, L.; CHALLISS, R.A.J. i NEWSHOLME, E.A. (1985) Biochim. Biophys. Acta 828, 151-154.
- 262.- CLAUS, T.H.; SCHLUMPF, J.; EL-MAGHRABI, M.R.; McGRANE, M. i PILKIS, S.J. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 716-723.

- 263.- GANCEDO, J.M.; MAZON, M.J. i GANCEDO, C. (1983) J. Biol. Chem. 258, 5998-5999.
- 264.- VAN SCHAFTINGEN, E.; OPPERDOES, F.R. i HERS, H-G. (1985) Eur. J. Biochem. 153, 403-406.
- 265.- EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H.; PILKIS, J. i PILKIS, S.J. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1071-1077.
- 266.- FURUYA, E. i UYEDA, K. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7109-7112.
- 267.- HUE, L.; BLACKMORE, P.F. i EXTON, J.H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8900-8903.
- 268.- VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1078-1084.
- 269.- VAN SCHAFTINGEN, E.; DAVIES, D.R. i HERS, H-G. (1982) Eur. J. Biochem. 124, 143-149.
- 270.- EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H.; PILKIS, J.; FOX, E. i PILKIS, S.J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7603-7607.
- 271.- BARTRONS, R.; HUE, L.; VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1983) Biochem. J. 214, 829-837.
- 272.- PILKIS, S.J.; CHRISMAN, T.; BURGESS, B.; McGRANE, M.; COLOSIA, A.; PILKIS, J.; CLAUS, T.H. i EL-MAGHRABI, M.R. (1983) Adv. Enzym. Regul. 21, 147-173.
- 273.- EL-MAGHRABI, M.R.; FOX, E.; PILKIS, J. i PILKIS, S.J. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 794-802.
- 274.- MIESKES, G. i SOLING, H.D. (1985) Biochem. J. 225, 665-670.
- 275.- VAN SCHAFTINGEN, E. i HERS, H-G. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1078-1084.
- 276.- LALOUX, M.; VAN SCHAFTINGEN, E.; FRANÇOIS, J. i HERS, H-G. (1985) Eur. J. Biochem. 148, 155-159.

- 277.- KRETSCHMER, M. i HOFMANN, E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 793-796.
- 278.- EL-MAGHRABI, M.R.; PATE, T.M. i PILKIS, S.J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 749-756.
- 279.- MURRAY, K.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; KOUNTZ, P.D.; LUKAS, T.J.; SODERLING, T.R. i PILKIS, S.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7673-7681.
- 280.- KUWAJIMA, M. i UYEDA, K. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 84-88.
- 281.- RIDER, M.H.; FORET, D. i HUE, L. (1985) *Biochem. J.* 231, 193-196.
- 282.- MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F. i SENER, A. (1982) *Diabetes* 31, 90-93.
- 283.- CLAUS, T.H.; NYFELER, F.; MUENKEL, M.A.; BURNS, M.G. i PILKIS, S.J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 655-661.
- 284.- HERS, H-G. i HUE, L. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 617-653.
- 285.- NEELY, P.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, S.J. i CLAUS, T.H. (1981) *Diabetes* 30, 1062-1064.
- 286.- HUE, L. (1982) *Biochem J.* 206, 359-365.
- 287.- DALL'AGLIO, E.; REAVEN, G.M. i AZHAR, S. (1986) *Endocrinology* 118, 108-111.
- 288.- SOCHOR, M.; GONZALEZ, A.M. i McLEAN, P. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 110-116.
- 289.- RIDER, M.H. i HUE, L. (1984) *FEBS Lett.* 176, 484-488.
- 290.- NARABAYASHI, H.; LAWSON, J.W.R. i UYEDA, K. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 9750-9758.
- 291.- RIDER, M.H. i HUE, L. (1985) *Biochem. J.* 225, 421-428.

- 292.- BOSCA, L.; ROUSSEAU, G.G. i HUE, L. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci USA 82, 6440-6444.
- 293.- NEWSHOLME, E.A. i LEECH, A.R. (1983) en "Biochemistry for the Medical Sciences" pp 210-218 (Wiley and Sons Ltd. Ed., Chichester)
- 294.- SMITH, R.L. i LAWRENCE, J.C.Jr. (1985) J. Biol. Chem. 260, 273-278.
- 295.- McLANE, J.A. i HOLLOSZY, J.O. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6548-6553.
- 296.- WINDER, W.W.; BALDWIN, K.M. i HOLLOSZY, J.O. (1974) Eur. J. Biochem. 47, 461-467.
- 297.- BLOMSTRAND, E.; CHALLISS, R.A.J.; COONEY, G.J. i NEWSHOLMWE, E.A. (1983) Bioscience Reports 3, 1149-1153.
- 298.- NEWSHOLME, E.A.; SUGDEN, P.H. i WILLIAMS, T. (1977) Biochem. J. 166, 123-129.
- 299.- HUDLICKA, O.; AITMAN, T.; HEILIG, A.; LEBERER, E.; TYLER, K.R. i PETTE, D. (1984) Pflügers Arch. 402, 306-311.
- 300.- SOAR, P.K.; DAVIES, C.T.M.; FENTEM, P.H. i NEWSHOLME, P.A. (1983) Bioscience Reports 3, 831-835.
- 301.- NEWSHOLME, E.A. i START, C. (1973) en "Regulation in Metabolism" pp 91-92 (Wiley and Sons Ltd. Ed., London)
- 302.- CHASIOTIS, D.; BRANDT, R.; HARRIS, R.C. i HULTMAN, E. (1983) Am. J. Physiol. 245, E166-E170.
- 303.- EDWARDS, R.H.T.; HARRIS, R.C. i HULTMAN, E. (1972) J. Physiol. 220, 335-352.
- 304.- SUTTON, J.R.; JONES, N.L. i TOEWS, C.J. (1981) Clinical Science 61, 331-338.
- 305.- REHUNEN, S.; NAVERI, H.; KUOPPASALMI, K. i HARKONEN, M. (1982) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 42, 499-506.

- 306.- NEELY, J.R. i MORGAN, H.E. (1974) *Ann. Rev. Physiol.* 36, 411-459.
- 307.- WILSON, D.F.; NISHIKI, K. i ERECINSKA, M. (1981) *Trends Biochem. Sci.* gener 1981, 16-19.
- 308.- BAILEY, I.A. i SEYMOUR, A.L. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* 11, 278-279.
- 309.- KUGELBERG, E. i EDSTROM, L. (1968) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 31, 415-423.
- 310.- EDSTROM, L. i KUGELBERG, E. (1968) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 31, 424-433.
- 311.- KARPATKIN, S.; HELMREICH, E. i CORI, C.F. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3139-3145.
- 312.- NEWSHOLME, E.A. (1979) *Diabetes* 28, suppl. 1, 1-7.
- 313.- GOODMAN, M.N. i LOWENSTEIN, J.M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5054-5060.
- 314.- ARAGON, J.J.; TORNHEIM, K. i LOWENSTEIN, J.M. (1980) *FEBS Letters* 117, K56-K64.
- 315.- WILKIE, D.R. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* 11, 244-246.
- 316.- CHALLISS, R.A.J.; ARCH, J.R.S.; CRABTREE, B. i NEWSHOLME, E.A. (1984) *Biochem. J.* 223, 849-853.
- 317.- NEWSHOLME, E.A. (1984) *Medicine Sport Sci.* 17, 1-8.
- 318.- CHALLISS, R.A.J.; ARCH, J.R.S. i NEWSHOLME, E.A. (1985) *Biochem. J.* 231, 217-220.
- 319.- BARAKAT, H.A.; KASPEREK, G.J.; DOHM, G.L.; TAPSCOTT, E.B. i SNIDER, R.D. (1982) *Biochem. J.* 208, 419-424.
- 320.- GOODLAD, G.A.J. i MILLS, G.T. (1957) *Biochem. J.* 66, 354-357.
- 321.- HOLLANDER, V.P. (1971) en "The Enzymes" vol. 4, pp 449-498. (Paul Boyer Ed. New York)

- 322.- FERNLEY, H.N. (1971) en "The Enzymes" vol. 4, pp 417-447. (Paul Boyer Ed. New York)
- 323.- FALKNER, P. (1955) Biochem. J. 60, 590-596.
- 324.- TURNER, D.H. i TURNER, J.F. (1960) Biochem. J. 74, 486-491.
- 325.- SEGAL, S. (1983) en "The Metabolic Basis of Inherited Disease" pp 167-193. (Mc Graw-Hill Ed.)
- 326.- HERS, H-G. (1960) Biochim. Biophys. Acta 37, 120-126.
- 327.- HAYMAN, S. i KINOSHITA, J.H. (1965) J. Biol. Chem. 240, 877-882.
- 328.- DONNELL, G.N.; BERGREN, W.R.; PERRY, G. i KOCH, R. (1963) Pediatrics 31, 802-810.
- 329.- CUATRECASAS, P. i SEGAL, S. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2382-2388.
- 330.- BERTOLI, D. i SEGAL, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4023-4029.
- 331.- WELLS, W.W.; PITTMAN, T.A.; WELLS, H.J. i EGAN, T.J. (1965) J. Biol. Chem. 240, 1002-1004.
- 332.- QUAN-MA, R.; WELLS, H.J.; WELLS, W.W.; SHERMAN, F.E. i EGAN, T.J. (1966) Amer. J. Dis. Child. 112, 477-478.
- 333.- SCHWARZ, V. (1960) Arch. Dis. Child. 35, 428-432.
- 334.- WELLS, H.J. i SEGAL, S. (1969) FEBS Lett. 5, 121-123.
- 335.- HAYES, J.S. i MILLER, L.R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 313, 9-16.
- 336.- KOZAK, L.P. i WELLS, W.W. (1971) J. Neurochem. 18, 2217-2228.
- 337.- ITAYA, K. i UI, M. (1966) Clin. Chim. Acta 14, 361-366.
- 338.- BESSEY, O.A. (1946) J. Biol. Chem. 164, 321-324.

- 339.- BERGMAYER, H.U.; GAWEHN, K. i GRASSL, M. (1974) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 499-500. (H.U. Bergmeyer Ed. Academic Press, Inc. NY)
- 340.- GILBOE, D.P.; LARSON, K.L. i NUTTAL, F.G. (1972) Anal. Biochem. 47, 20-27.
- 341.- KURZ, G. i WALLENFELS, K. (1974) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 1279-1282. (H.U. Bergmeyer Ed. Academic Press, Inc. NY)
- 342.- GUTMANN, I. i WAHLEFELD, A.W. (1974) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 1464-1468. (H.U. Bergmeyer Ed. Academic Press, Inc. NY)
- 343.- MICHAL, G. i BEUTLER, H.O. (1974) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 1312-1319. (H.U. Bergmeyer Ed. Academic Press, Inc. NY)
- 344.- LAMPRECHT, W. i TRAUTSCHOLD, I. (1974) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 2102-2110. (H.U. Bergmeyer Ed. Academic Press, Inc. NY)
- 345.- MICHAL, G. (1984) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 191-198 (H.U. Bergmeyer Ed. Verlag-Chemie. Weinheim)
- 346.- BERGMAYER, H.U. i MICHAL, G. (1974) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 1233-1237 (H.U. Bergmeyer Ed. Academic Press, Inc. NY)
- 347.- CARROLL, N.V.; LONGLEY, R.W. i ROSE, J.H. (1956) J. Biol. Chem. 193, 583-593.
- 348.- RODWELL, V. (1956) J. Biol. Chem. 221, 909-913.
- 349.- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. i RANDALL, P.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 350.- BENSADOWN, A. i WEINSTEIN, D. (1976) Anal. Biochem. 70, 241-250.

- 351.- WALKER, E.J. i DOW, J.W. (1982) Biochem. J. 203, 361-369.
- 352.- SMITH, A.L. (1967) en "Methods in Enzymol." 10, 81-86.
- 353.- HEBEL, R. i STROMBERG, M.W. (1976) en "Anatomy of the Laboratoy Rat" pp 18-42. (Ed. Williams & Wilkins Company)
- 354.- LAEMMLI, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
- 355.- OHSAVA, K. i EBATA, I. (1983) Anal. Bichem. 135, 409-415.
- 356.- GUDER, W.G. i WALHLEFELD, A.W. (1983) en "Methods of Enzymatic Analysis" pp 12-13. (U.H. Bermeyer Ed. Verlag-Chemie. Weinheim)
- 357.- BENSON, A.A. (1957) en "Methods in Enzymol." vol. III, pp 110-121.
- 358.- STAHL, E. (1969) en "Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook" pp 807-831. (Ed. E. Stahl. Springer-Verlag. Berlin).
- 359.- CARDINI, C.E. i LELOIR, L.F. (1957) en "Methods in Enzymol." vol. III, pp 835-840.
- 360.- SEGEL, I.H. (1975) en "Enzyme Kinetics" pp 108-110. (Ed. John Wiley & Sons, NY)
- 361.- CLIMENT, F.; BARTRONS, R.; PONS, G. i CARRERAS, J. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 570-576.
- 362.- PONS, G. (1983) Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.