



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Coeficientes de control para las enzimas fosfoglucomutasa y glicógeno sintasa en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos de *Caudiverbera caudiverbera*.

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Diego René Quiroga Roger

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Universidad de Chile

Profesores Guía:

Dra. Ana Preller y Dr. Tito Ureta
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:

Dra. Ana María Kettlun
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos los seres vivos que me han ayudado en el estudio de mi carrera y en el desarrollo de mi memoria. En primer lugar, a mi familia, mis amigos, a mi polola Silvia Paris y a mis perros, pilares fundamentales en mi formación como persona. También quisiera agradecer de manera muy especial a los profesores Dra. Ana Preller y Dr. Tito Ureta por darme la confianza de trabajar junto a ellos en su investigación y en su laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Además de ayudarme en lo netamente profesional, sentí mucho cariño en el trato día a día junto a ellos. También quisiera agradecer a la profesora Dra. Victoria Guixé, pues también me aconsejó y me ayudó mucho en el desarrollo de mi tesis. No puedo dejar de mencionar a TODA la gente que he conocido en el laboratorio, con los cuales he pasado momentos muy gratos y han sido parte de mi feliz entorno laboral. Agradezco la amistad y la disposición a ayudarme en todo a todos los miembros de Lab's crew. GRACIAS TOTALES !

ABREVIATURAS

APS:	Persulfato de amonio
DEAE-celulosa:	Dietilaminoetil-celulosa
DTT:	Ditiotreitol
glc-1-P:	Glucosa-1-fosfato
glc-6-P:	Glucosa-6-fosfato
glc-1,6-bisP:	Glucosa-1,6-bisfosfato
GS:	Glicógeno sintasa
HK:	Hexoquinasa
MCA:	Análisis de control metabólico
NAD:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADP:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
PGM:	Fosfoglucomutasa
POPOP:	1,4 bis [2-(5-feniloxazolil)] benceno
PPO:	2,5-difeniloxazol
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
UDP-glucosa:	Uridin-difosfoglucosa
UDPG-PPasa:	Uridin-difosfoglucosa-pirofosforilasa

INDICE GENERAL

	pág.
Agradecimientos	i
Abreviaturas	ii
Indice General	iii
Indice de Materias	iv
Indice de Tablas	vi
Indice de Figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	xi

INDICE DE MATERIAS

	pág.
I Introducción	1
II Hipótesis de trabajo y objetivos	8
2.1 Hipótesis	8
2.2 Objetivo general	8
2.3 Objetivos específicos	8
III Materiales y métodos	9
3.1 Reactivos usados	9
3.2 Animales de experimentación	9
3.3 Obtención de oocitos	9
3.4 Microinyección de enzimas y sustratos	10
3.5 Preparación de las soluciones radiactivas para inyectar	10
3.6 Microinyección de PGM en oocitos	10
3.7 Medición de la actividad de la PGM <i>in vitro</i>	11
3.8 Medición de la actividad de la GS <i>in vitro</i>	12
3.9 Cuantificación del CO ₂	13
3.10 Aislamiento del glicógeno	13
3.11 Purificación parcial de la GS de músculo de rana	13
3.12 Medición de la actividad de la HK <i>in vitro</i>	14
3.13 Medición de la actividad de la UDPG-PPasa <i>in vitro</i>	15
3.14 Determinación de proteínas	15
IV Resultados	16
A. Fosfoglucomutasa	16
4.1 Medición de la actividad de la PGM	16
4.2 Características cinéticas de la PGM	17
4.3 Determinación de la actividad endógena de la PGM	19
4.4 Actividades endógenas de las enzimas que forman parte de la vía directa	

de síntesis de glicógeno, en los oocitos de rana	19
4.5 Control de pureza de la PGM a inyectar	21
4.6 Control ejercido por la PGM sobre el flujo por la vía directa de síntesis de glicógeno	22
B. Glicógeno Sintasa	25
4.7 Actividad de la GS de oocitos	25
4.8 Control de pureza de la GS a inyectar	26
4.9 Purificación parcial de GS de músculo de rana	27
4.9.1 Obtención del pellet rico en GS	27
4.9.2 Cromatografía en DEAE –celulosa de GS de músculo de rana	29
4.9.3 Detección de HK, PGM y UDPG-PPasa en las fracciones obtenidas de la cromatografía en DEAE-celulosa	30
4.9.4 Cromatografía en Sephacryl S-200 de GS de músculo de rana	32
V Discusión	36
VI Conclusiones	46
VII Referencias	48

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Niveles endógenos de las enzimas de la vía directa de la síntesis de glicógeno en oocitos de rana	20
Tabla 2. Actividad de PGM medida después de inyectar la enzima en oocitos	24
Tabla 3. Comparación entre las actividades de la GS de músculo y de oocito de rana	28
Tabla 4. Purificación de la enzima GS de músculo de rana	34

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Determinación del coeficiente de control de flujo	3
Figura 2. Reacción catalizada por la PGM	5
Figura 3. Reacción catalizada por la GS	6
Figura 4. Actividad de la PGM en función de la concentración de enzima	16
Figura 5. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la PGM	17
Figura 6. Efecto del pH sobre la actividad de la PGM.....	18
Figura 7. Estabilidad de la PGM en el tiempo	18
Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 11,5 % en condiciones desnaturalantes de PGM comercial	21
Figura 9. Coeficientes de control para la PGM	23
Figura 10. Actividad de la GS en función del número de oocitos	25
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 % en condiciones desnaturalantes de GS comercial	26
Figura 12. Curva de progreso para la GS.....	27
Figura 13. Cromatografía en DEAE-celulosa de GS de músculo de rana	29

Figura 14.	Cromatografía en DEAE-celulosa: elución de HK, PGM y UDPG-PPasa	30
Figura 15.	Cromatografía en Sephacryl S-200 de GS de músculo de rana	32
Figura 16.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 % en condiciones desnaturalantes de las etapas de purificación de GS de músculo de rana	35

Coefficientes de control para las enzimas fosfoglucomutasa y glicógeno sintasa en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos de *Caudiverbera caudiverbera*

RESUMEN

En la vía directa de la síntesis de glicógeno en oocitos de rana participan cuatro enzimas que son la hexoquinasa (HK), la fosfoglucomutasa (PGM), la UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPG-PPasa) y la glicógeno sintasa (GS). La fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2) cataliza la conversión reversible de glucosa-6-fosfato (glc-6-P) en glucosa-1-fosfato (glc-1-P). Por otro lado, la glicógeno sintasa (EC 2.4.1.11) cataliza la incorporación de glucosa en glicógeno, transfiriendo un residuo glucosilo desde UDP-glucosa a un extremo no reductor del glicógeno. El análisis del control metabólico (MCA) proporciona un enfoque particular para estudiar la regulación del metabolismo, ya que permite cuantificar el efecto que ejerce una enzima sobre el flujo de una vía metabólica, en términos de su coeficiente de control de flujo. En este trabajo se aplicaron los postulados del análisis del control metabólico para estudiar el control que ejercen la PGM y la GS sobre el flujo de la vía directa de la síntesis de glicógeno.

La actividad de la PGM se midió espectrofotométricamente cuantificando el NADH producido al acoplar la reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa a la producción de glc-6-P. La actividad endógena de PGM en oocitos resultó ser igual a $41 \pm 3,1$ mU por oocito, medida entre los meses de septiembre y enero, y de $9,4 \pm 0,93$ mU por oocito, medida entre los meses de abril y agosto. Su actividad máxima es a pH 7,5. La cinética para el sustrato glc-1-P es hiperbólica, con una K_m de 0,16 mM.

Para determinar el control que ejerce la PGM sobre el flujo metabólico de la vía directa de la síntesis de glicógeno, se aumentó la actividad intracelular de la PGM por medio de microinyección de enzima exógena a oocitos de *Caudiverbera caudiverbera* en estadio VI de desarrollo. El coeficiente de control medido para la PGM resultó ser igual a 0,19. Este valor indica que la PGM ejercería un bajo control sobre el flujo metabólico de la vía directa.

La actividad de la GS se midió usando un radioensayo que cuantifica la incorporación de glucosa marcada en glicógeno a partir de UDP-glucosa radiactiva. La actividad endógena de la GS en oocitos resultó ser igual a $0,7 \pm 0,03$ mU por oocito, independiente de la época del año en que se mide.

No se logró determinar el control que ejerce la GS sobre el flujo metabólico de la vía directa de síntesis de glicógeno. Ello debido a que, por una parte, no hay disponibilidad de la enzima comercial en el mercado. Por otro lado, tampoco fue posible tener la cantidad de enzima requerida al intentar purificarla a partir de músculo de rana. La purificación consistía en tres etapas, que incluían la obtención de un pellet rico en glicógeno, y dos cromatografías en DEAE-celulosa y Sephacryl S-200. La enzima se purificó 684 veces, pero no se logró concentrar lo suficiente como para poder ser microinyectada dentro del oocito y determinar así el coeficiente de control para la GS.

Control coefficients for the enzymes phosphoglucomutase and glycogen synthase in the direct pathway for glycogen synthesis in *Caudiverbera caudiverbera* oocytes

ABSTRACT

In amphibian oocytes, the direct pathway for glycogen synthesis includes four enzymes which are hexokinase (HK), phosphoglucomutase (PGM), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) and glycogen synthase (GS). Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2) catalyzes the reversible conversion of glucose-6-phosphate (glc-6-P) into glucose-1-phosphate (glc-1-P). Glycogen synthase (EC 2.4.1.11) catalyzes the addition of a glucose residue to the non-reducing end of glycogen, using UDP-glucose as the substrate. Metabolic Control Analysis (MCA) provides a singular vision to the study of metabolic control. It allows quantification of the effect that a particular enzyme exerts upon the flux through the pathway in terms of the flux control coefficient. In this work we have applied MCA in order to study the control that PGM and GS exert over the flux in the direct pathway for glycogen synthesis.

PGM activity was spectrophotometrically measured by quantifying NADH produced, in a coupled reaction catalyzed by glucose-6-P dehydrogenase. The endogenous PGM activity measured in the oocytes between september and january was 41 ± 3.1 mU per oocyte, while between april and august it was 9.4 ± 0.93 mU per oocyte. The maximal activity was found at pH 7.5. The kinetic for glc-1-P was hyperbolic, with a $K_{m \text{ app}}$ of 0.16 mM.

In order to determine the control that PGM exerts over the metabolic flux in the direct pathway for glycogen synthesis, we increased PGM activity by microinjecting exogenous enzyme into *Caudiverbera caudiverbera* stage VI oocytes. A control coefficient value of 0.19 was found for PGM. This value indicates that PGM exerts a low control over the metabolic flux in the direct pathway for glycogen synthesis.

GS activity was measured using a radioactive assay that quantifies the incorporation of glucose into glycogen, using radiolabelled UDP-glucose as the substrate. The endogenous activity found for GS in the oocytes was about 0.7 ± 0.03 mU per oocyte, irrespective of the season of the year. To determine the control that GS exerts over the metabolic flux in the direct pathway for glycogen synthesis, and due to the lack of a pure commercial enzyme, we intended to purify the

enzyme from frog's muscle. The purification procedure involved three steps, beginning with the obtention of a glycogen-rich pellet, and continuing with a DEAE-cellulose and Sephacryl S-200 chromatographies. We obtained an enzyme that was purified 684 times, but efforts to concentrate the enzyme to obtain the amount required for microinjection were unsuccessful.

INTRODUCCIÓN

El glicógeno es un polímero ramificado de residuos de glucosa que funciona como una reserva de este azúcar. Cuando se necesita energía, el glicógeno es degradado a moléculas de glucosa (Ferrer et al., 2003; Higuera et al., 2003).

Los oocitos de rana presentan varias ventajas para estudiar la síntesis del glicógeno *in vivo*, ya que son células grandes (tienen 2 mm de diámetro y 3 μ l de volumen) y blandas, lo que permite una fácil microinyección de compuestos. Además, se ha visto que utilizan la glucosa principalmente para la síntesis de glicógeno (95 %), y sólo en una pequeña proporción (5 %), para la vía de las pentosas-fosfato (Ureta et al., 2001). Existen dos vías para la síntesis del polisacárido, la vía directa y la indirecta, y ambas operan simultáneamente en los oocitos de rana (Kessi et al., 1996). La vía directa opera preferencialmente cuando existe una alta concentración de glucosa; en cambio la indirecta predomina a bajas concentraciones de esta hexosa. El oocito utiliza la vía directa cuando se han inyectado 3 o más nmoles de glucosa, siendo la concentración intracelular calculada ≥ 1 mM. Esta vía está compuesta por los siguientes intermediarios: glucosa-6-P (glc-6-P), glucosa-1-P (glc-1-P) y UDP-glucosa (UDPG). La vía indirecta actúa preferencialmente cuando se ha inyectado 0,5 o menos nmol de glucosa, siendo la concentración intracelular calculada $\leq 0,2$ mM, y comprende una primera etapa en la cual la glucosa se metaboliza a lactato, continuando después con la resíntesis de hexosas-P por gluconeogénesis. Se ha sugerido que las etapas de la vía directa ocurren en compartimentos metabólicos distintos al de la vía indirecta (Ureta et al., 2001).

El Análisis del Control Metabólico (MCA) es una aproximación teórica que permite estudiar el control que ejerce una enzima en particular sobre el flujo de una vía metabólica, definiéndose al flujo como la cantidad de producto final generado en una unidad de tiempo (Meléndez-Hevia et al., 1987). Este enfoque difiere del clásico, que postulaba que el control del flujo de una vía dependía tan solo de una enzima, llamada enzima marcapaso. El Análisis del Control Metabólico propone que:

- i) El control del flujo metabólico puede ser compartido entre todas las enzimas que forman parte de una vía metabólica.

- ii) Varias enzimas pueden ejercer un control significativo del flujo.
- iii) La distribución del control del flujo puede variar al producirse algún cambio en el estado metabólico de la célula o por cambios en las condiciones experimentales.

Las vías metabólicas se definen entonces como secuencias de reacciones en las que el control es sistémico y en donde las modificaciones del estado celular llevan a respuestas sistémicas, sin que existan etapas limitantes que controlen la velocidad del flujo de una vía en particular. El análisis del control metabólico considera a los sistemas metabólicos como un todo, donde un cambio en la actividad o en la concentración de una enzima o de cualquier intermediario será transmitido a través de todo el sistema. Para determinar cuán importante es cada enzima en el control del flujo de una vía metabólica, se calcula el coeficiente de control para cada una de las enzimas que forman parte de esa vía (Kacser y Porteous, 1987; Meléndez-Hevia et al., 1987).

El coeficiente de control representa la contribución de la actividad enzimática al control del flujo:

$$C_e^J = \frac{(\delta J / J)}{(\delta e / e)}$$

C_e^J es el coeficiente de control, J es el flujo en estudio y e es la actividad de la enzima en particular. La actividad de una enzima puede ser modificada cambiando el número de moléculas de enzima (cantidad de la enzima), o cambiando la actividad catalítica de ésta. La ecuación puede reordenarse de la siguiente manera:

$$C_e^J = \frac{\delta J}{\delta e} \times \frac{e}{J}$$

El coeficiente de control se puede definir como la tangente a la curva de flujo ($\delta J / \delta e$) multiplicado por el factor e / J . Esta definición es matemáticamente idéntica a :

$$C_e^J = \frac{\delta \log J}{\delta \log e}$$

Según esta última expresión, el coeficiente de control es la pendiente de la tangente en un gráfico de log del flujo versus log de la cantidad de enzima, tal como se puede apreciar en la figura 1. Usar logaritmo natural o logaritmo en base 10 da lo mismo, siempre que se utilice el mismo tipo de logaritmo en ambos ejes.

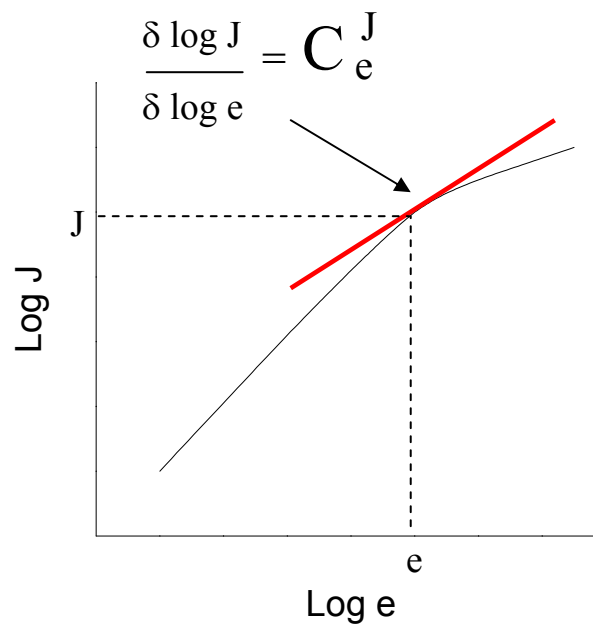


Figura 1. Determinación del coeficiente de control de flujo. El coeficiente de control de flujo se define como la pendiente de la tangente en un gráfico de log de J (flujo) versus log de e (cantidad de enzima).

El valor de cualquier coeficiente de control no es una propiedad individual de una enzima *per se*; depende de las actividades de todas las otras enzimas en la vía metabólica, y de sus coeficientes de control. La suma de todos los coeficientes de control, para cualquier flujo de una vía metabólica en estado estacionario, debe dar un valor límite igual a 1,0 (Kacser y Porteous, 1987; Meléndez-Hevia et al., 1987). Si una enzima tiene un coeficiente de control cercano a 1,0, significa que esa enzima ejerce un gran control sobre la velocidad del flujo de una vía metabólica específica. Por el contrario, si el valor del coeficiente de control es cercano a 0,

quiere decir que esa enzima en particular no ejerce control sobre la velocidad del flujo de esa vía.

Las mediciones de coeficientes de control se realizan generalmente por adición de enzimas purificadas a homogeneizados de tejido y posterior cuantificación del cambio de flujo de la vía medido por la velocidad de producción de algún metabolito final (Meléndez-Hevia et al., 1987). En estudios preliminares hechos en el laboratorio (Dra. Ana Preller) se ha medido el coeficiente de control de la hexoquinasa para la vía directa de síntesis de glicógeno, en oocitos estadio VI de *Caudiverbera caudiverbera*. El valor encontrado fue cercano a 0,5. Esto indica que la hexoquinasa ejercería el mayor control sobre el flujo de esta vía metabólica, teniendo que distribuirse el restante control (0,5) entre las demás enzimas. Existe otro trabajo realizado en oocitos de *Xenopus laevis* donde se midió el coeficiente de control del flujo para la hexoquinasa, encontrándose un valor de 0,7 (Ureta et al., 2000).

En este trabajo se intentó determinar el coeficiente de control de flujo para las enzimas fosfoglucomutasa (PGM) y la glicógeno sintasa (GS).

La fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2) es una fosfotransferasa que cataliza la transferencia de fosfato entre los carbonos 1 y 6 de la glucosa, interconvirtiendo la glucosa-1-P (glc-1-P) en glucosa-6-P (glc-6-P), y viceversa, a través de un intermediario, la glucosa-1,6-bisfosfato (glc-1,6-bisP). La reacción comienza con la enzima fosforilada en un residuo de serina. En una primera etapa, la PGM dona su grupo fosfato al carbono 6 de la glc-1-P, produciendo glc-1,6-bisP. En la segunda etapa, el grupo fosfato ubicado en el carbono 1 de la glc-1,6-bisP es transferido a la enzima, restableciéndose la fosfoenzima y produciendo glc-6-P. La PGM es monomérica, tiene un peso molecular cercano a los 60 kDa y ocupa magnesio como cofactor (Daugherty et al., 1975).

Diversos estudios han mostrado que la PGM es inhibida por ATP y por citrato, y que es activada por glc-1,6-bisP, alcanzando su máxima actividad sólo en presencia de esta última (Beitner et al., 1982). La enzima también cataliza (pero más lentamente) la interconversión de isómeros 1-fosfato y 6-fosfato de muchas otras alfa-D-hexosas, y la interconversión de alfa-D-ribosa 1-fosfato y 5-fosfato.

Si bien es cierto que la glc-1,6-bisP tiene un rol activador sobre la PGM, también se ha visto que esta molécula actúa como un potente inhibidor de la hexoquinasa (HK), incluso de una

manera más acentuada que la glc-6-P, conocida como el inhibidor clásico de esta última enzima (Beitner et al., 1982).

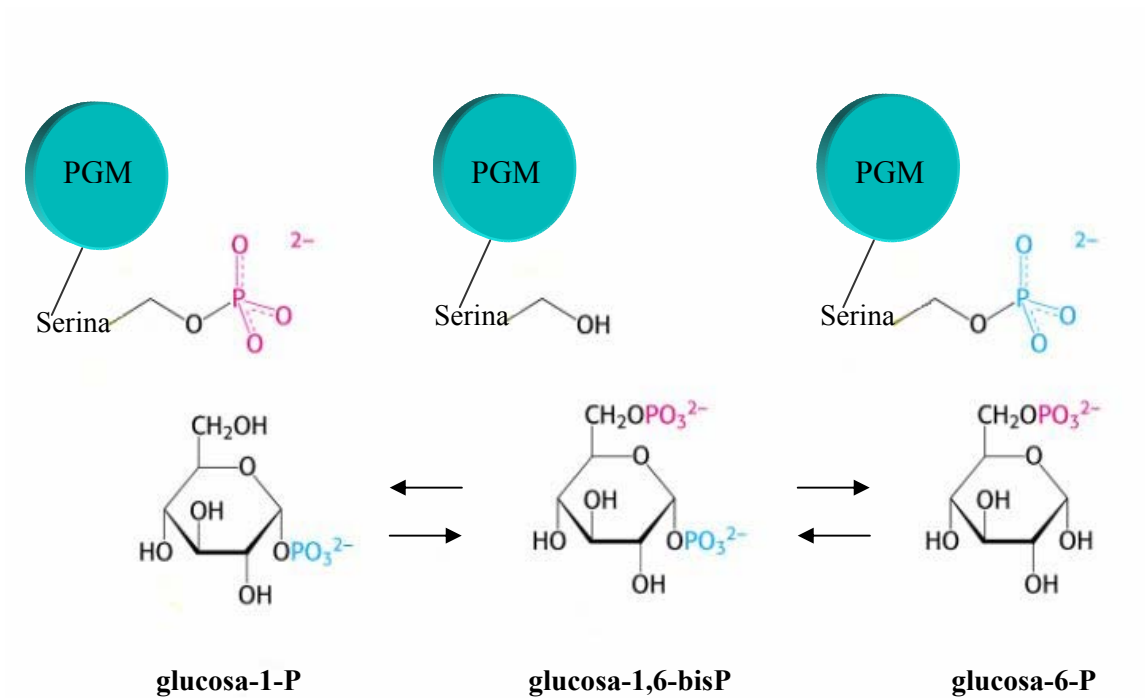


Figura 2. Reacción catalizada por la fosfoglucomutasa.

La glicógeno sintasa (EC 2.4.1.11) cataliza la incorporación de glucosa en glicógeno, transfiriendo un residuo glucosilo desde UDP-glucosa a un extremo no reductor del glicógeno (Ferrer et al., 2003). Dependiendo de la especie, esta enzima puede ser un dímero o un tetramero. El peso molecular del monómero puede fluctuar entre 80 y 90 kDa (base de datos sobre enzimas BRENDA [en línea] <<http://www.brenda.uni-koeln.de/>>).

La actividad de esta enzima está regulada covalentemente por un mecanismo de fosforilación-desfosforilación, existiendo dos formas enzimáticas: una fosforilada o D (dependiente), que es activa sólo en presencia de glc-6-P, y una forma desfosforilada o I (independiente), que no depende de la presencia de glc-6-P para ser activa (Mersmann y Segal, 1967). Además de la regulación covalente por proteínas quinasas y fosfatasas, la GS es regulad

alostéricamente por la glc-6-P. Una vez que la glc-6-P se une a la GS, se produciría un cambio conformacional en la enzima, lo que la transformaría en un mejor sustrato para las fosfatasas, las que podrían activar covalentemente a la GS (Ferrer et al., 2003) Asimismo, se ha visto que la glc-6-P es capaz de estimular a la proteína fosfatasa 1, la que desfosforilaría a la GS haciéndola activa (Cadefau et al., 1997). Sin embargo, esta no sería la única función de la glc-6-P sobre la GS, ya que se ha visto que en homogeneizados celulares de hepatocitos de rata, la glc-6-P y además la glucosa, tendrían un rol muy importante en la relocalización de la GS, desde el citoplasma a la fracción particulada de la célula, lo cual influiría en la actividad enzimática (Fernández-Novell et al., 1992).

Originalmente se creía que la GS, al ser una enzima tan regulada, ejercería un gran control sobre el flujo metabólico de la síntesis de glicógeno. Sin embargo, los últimos estudios realizados han mostrado que la enzima tiene un rol muy pequeño en el control del flujo (Schafer et al., 2004).

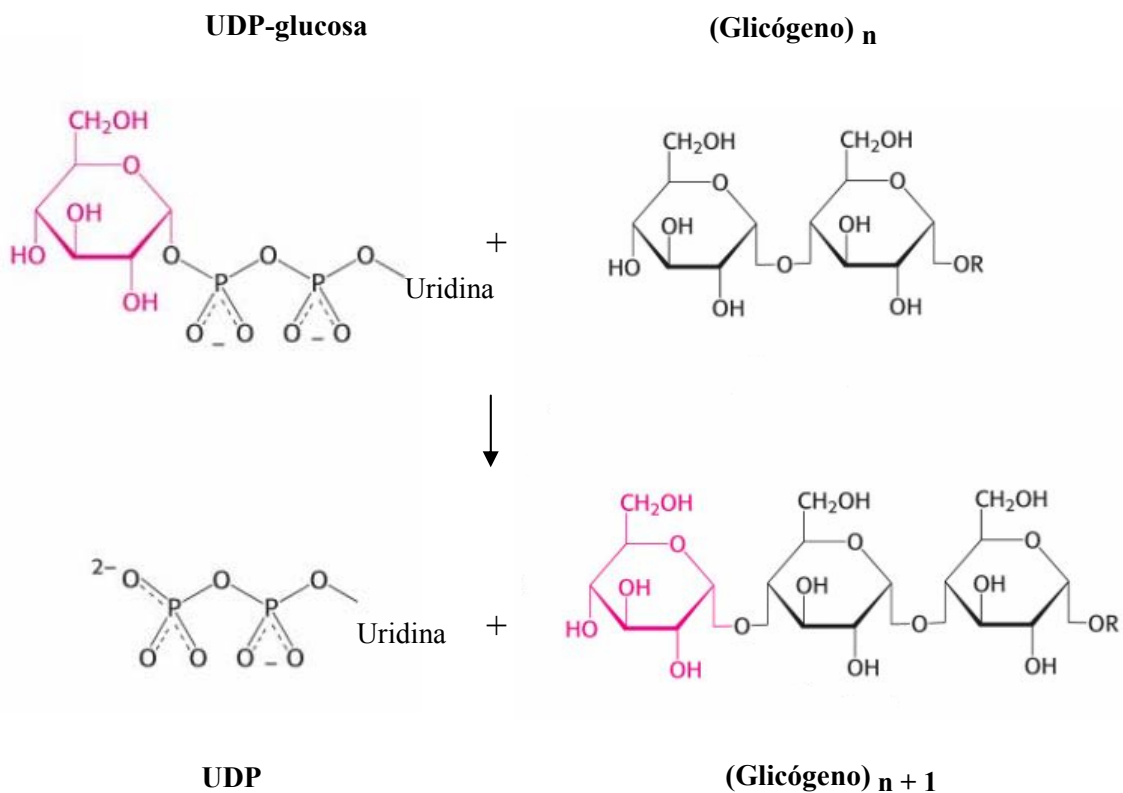


Figura 3. Reacción catalizada por la glicógeno sintasa.

Como se mencionó anteriormente, la HK tiene un coeficiente de control no menor que 0,5. Además, se ha determinado en nuestro laboratorio un coeficiente de 0,1 para la UDPG-PPasa. Ello implica que el 0,4 restante debe repartirse entre la PGM y la GS. Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo no atribuye a estas enzimas un rol importante en el control del flujo para la síntesis de glicógeno.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La PGM y la GS ejercen un bajo o nulo control sobre el flujo en la síntesis del glicógeno por la vía directa.

2.2 Objetivo general

Determinar qué grado de control ejercen sobre el flujo por la vía directa de síntesis de glicógeno, las enzimas PGM y la GS, usando como modelo experimental a los oocitos estadio VI de rana *Caudiverbera caudiverbera*.

2.3 Objetivos específicos

- 1) Medir las actividades endógenas de las enzimas PGM y GS presentes en oocitos estadio VI de rana *Caudiverbera caudiverbera*.

- 2) Caracterizar parcialmente la PGM, pues la enzima no ha sido estudiada en oocitos.

- 3) Medir los coeficientes de control de flujo metabólico para las enzimas PGM y GS, implicadas en la síntesis del glicógeno en oocitos estadio VI de rana *Caudiverbera caudiverbera*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos usados

De Sigma Chemical Co. se obtuvieron los siguientes reactivos: NAD^+ , NADP^+ , glc-1,6-bisP, glc-6-P, glc-1-P, glucosa-6-P deshidrogenasa (de *Leuconostoc mesenteroides*), UDP-glucosa, UDPG-PPasa (de *Saccharomyces cerevisiae*), ATP, DTT, GS (de músculo de conejo) PPO, POPOP, glicógeno de músculo de conejo, BSA, estándares de peso molecular e Imidazol.

De Amersham Biosciences se obtuvo: UDP-[6- ^3H]glucosa.

De Life Sciences Products, INC. se obtuvo: [U- ^{14}C]glucosa.

De Winkler LTDA. se obtuvieron: TRIS, NaCl y KCl.

De GIBCO BRL. se obtuvieron: EDTA, acrilamida, bisacrilamida, APS y TEMED.

De MERCK: NaF, MgCl_2 y MgSO_4 .

De J.T.Baker Chemical Co.: KHCO_3 .

De TCL: alcohol al 96%.

De ROCHE: PGM (de músculo de conejo).

De Whatman: DEAE-celulosa.

De GBI (General Biochemicals): SDS.

3.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ranas chilenas *Caudiverbera caudiverbera*, mantenidas en estanques con agua potable, las que fueron alimentadas 2 veces a la semana con hígado de pollo o de vacuno.

3.3 Obtención de oocitos

Se usaron oocitos estadio VI (Dumont, 1972) de rana chilena *Caudiverbera caudiverbera*, los que se obtuvieron a partir de los ovarios que se extrajeron del animal, mediante un corte costal (Gurdon, 1974). Luego de extraer los ovarios, estos fueron puestos en solución salina de Barth (NaCl 88 mM, CaCl_2 0,41 mM, KCl 1 mM, NaHCO_3 2,4 mM, Mg_2SO_4 0,82 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,33 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7,6) a temperatura ambiente. A continuación se procedió a separar los oocitos usando pinzas, seleccionando células de tamaño y forma similar, dejándolos en una placa de vidrio con solución Barth.

3.4 Microinyección de enzimas y sustratos

Se utilizó un aparato de microinyección por presión de nitrógeno modelo Narishige IM-200 y agujas de vidrio previamente calibradas. Las microinyecciones se hicieron usando una lupa marca Nikon tipo 102 y siempre en la zona ecuatorial del oocito.

3.5 Preparación de las soluciones radiactivas para inyectar

Los sustratos radiactivos fueron previamente evaporados utilizando un equipo de centrifugación al vacío marca UniEquip, y posteriormente resuspendidos en un volumen de sustrato frío que permitiera alcanzar las concentraciones deseadas.

3.6 Microinyección de PGM en oocitos

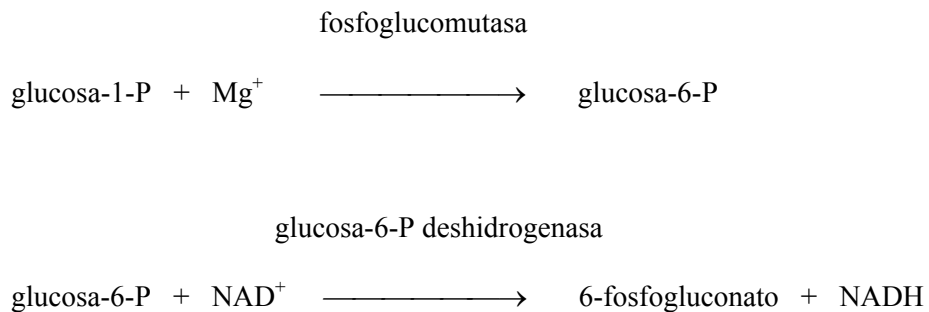
Se tomaron 150 μ l de PGM comercial Roche precipitada en sulfato de amonio y se colocaron en un tubo eppendorf. La muestra se centrifugó a 4° durante 10 min a 14.000 rpm en una centrifuga eppendorf modelo 5415 C, y se obtuvo un pellet que contenía la enzima concentrada. En seguida, se descartó el sobrenadante con pipeta y papel filtro. Luego, el pellet se resuspendió en 150 μ l de solución Barth, con el fin de lavar la enzima y quitarle el sulfato de amonio remanente. En seguida, se procedió a concentrar la enzima hasta un volumen cercano a los 20 μ l. Finalmente, la solución enzimática se diluyó con solución Barth, para obtener así las concentraciones de PGM requeridas para la microinyección. En cada experimento se microinyectaban grupos de 10 oocitos con cantidades crecientes de la enzima. Como controles se usaron oocitos no perturbados (sin microinyectar) y oocitos inyectados sólo con solución salina de Barth. Después de inyectar la enzima, los oocitos se dejaban 1 h en solución Barth para permitir la difusión intracelular de la PGM inyectada, y posteriormente se microinyectaban con 6 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa, con el fin de que operara preferentemente la vía directa de síntesis de glicógeno (Ureta et al., 2001). Después de incubar 20 min bajo una atmósfera de O₂ con agitación continua y capturando el CO₂ desprendido, se procedió a aislar el glicógeno.

Se hicieron experimentos en paralelo con el fin de asegurar que la enzima inyectada permanecía activa dentro de los oocitos durante el tiempo que duraban los experimentos. Con este objeto, se usaron grupos de 10 oocitos, de los cuales un grupo fue de oocitos no perturbados (control 1), otro grupo fue de oocitos inyectados con Barth (control 2), y los grupos restantes fueron los grupos de oocitos microinyectados con diferentes concentraciones de PGM. Cada microinyección tenía un volumen de 50 nl. Después de la inyección, cada grupo de 10 oocitos se

dejó una hora a temperatura ambiente en Barth. En seguida, los distintos grupos de 10 oocitos se homogeneizaron en tubos eppendorf que contenían 120 µl de solución Barth, con un vástago de vidrio, teniendo la precaución de mantener en frío cada tubo. Cada tubo se centrifugó durante 20 min a 14.000 rpm en una centrifuga eppendorf modelo 5415 C. Finalmente se procedió a tomar una alicuota del sobrenadante y se midió la actividad enzimática.

3.7 Medición de la actividad de la PGM *in vitro*

Una cierta cantidad de oocitos se homogeneizaron en un Potter Elvehjem usando amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8,0 en una proporción 1 : 3 (v/v) (volumen de oocito-volumen de amortiguador). Se consideró que cada oocito tenía un volumen de 3 µl, según lo que aparece en trabajos previos de Ureta et al., (2001). Luego se centrifugó la muestra durante 1 h a 40.000 rpm en una ultracentrifuga Beckman modelo L5-50 B rotor Ti 50. Se obtuvo un líquido sobrenadante en el cual se determinó la actividad enzimática, midiendo el cambio de absorbancia que se produce a 340 nm, al acoplar la reacción llevada a cabo por la PGM a la reacción de deshidrogenación de la glc-6-P, de acuerdo al siguiente esquema:



La velocidad de formación del NADH se registraba en un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8453 a 24°. El medio de reacción tenía un volumen final de 1 ml, y contaba con los siguientes reactivos (concentraciones finales): imidazol 30 mM pH 7,5, MgCl₂ 3,3 mM, NAD⁺ 0,85 mM, EDTA 0,9 mM, glc-1,6-bisP 0,015 mM, glucosa-6-P deshidrogenasa 0,33 U, glc-1-P 1,5 mM (Davies et al., 2003). La reacción se iniciaba al agregar glc-1-P. Una unidad de PGM (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de glc-6-P en 1 min a 24°.

3.8 Medición de la actividad de la GS de oocitos *in vitro*

Una vez que se obtuvieron los oocitos, estos se homogeneizaron en un Potter Elvehjem usando amortiguador A, en una proporción 1 : 2,5 (p/v). Este amortiguador contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,8, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, sacarosa 100 mM, y NaF 100 mM (concentraciones finales). Luego se centrifugó la muestra durante 15 min a 10.000 rpm en una centrifuga Sorvall modelo RC-5 rotor 5534. Finalmente se obtuvo un líquido sobrenadante, en el cual se determinó la actividad enzimática.

La actividad de la enzima se midió usando un radioensayo que cuantifica la incorporación de glucosa marcada en glicógeno a partir de UDP-glucosa radiactiva. Una unidad de GS (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 μ mol de glucosa a glicógeno en 1 min a 32°. El ensayo se llevó a cabo según lo descrito por Báez et al., (2003). Se agregaron 50 μ l del líquido sobrenadante del homogeneizado de oocitos a tubos eppendorf que contenían en un volumen de 25 μ l los siguientes reactivos (concentraciones finales): Tris 30 mM pH 7,8, EDTA 3 mM, DTT 0,6 mM, NaF 60 mM, UDP-[6-³H]glucosa 3 mM (50.000 a 100.000 cpm) y glc-6-P 3 mM. Al terminar el tiempo de incubación (10 min a 32°), se agregó a cada tubo 500 μ l de KOH 30% y luego se incubaron por 30 min a 100°. Posteriormente, el contenido de cada tubo se vertió a tubos de vidrio y se adicionaron 100 μ l de Na₂SO₄ 2%, 40 μ l de glicógeno (5 mg/ml) y 2 ml de etanol 96% para que precipitara el glicógeno durante toda la noche. Al día siguiente, los tubos fueron centrifugados a 5.000 rpm por 2,5 min en una centrifuga Sorvall modelo RC-5 rotor 5534. El pellet resultante fue resuspendido en 2 ml de agua y reprecipitado por 8 hrs con 6 ml de etanol 96%. Finalmente, los tubos se centrifugaron nuevamente a 5.000 rpm por 2,5 min obteniéndose un nuevo pellet, el que se resuspendió con 1,2 ml de agua. Para medir la radiactividad, se tomaron alícuotas de 1 ml, las cuales se colocaron en viales y se mezclaron con 5,5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad incorporada en glicógeno se midió en un contador de centelleo Packard modelo 1600 TR.

Para medir la actividad enzimática de uno o más oocitos, se utilizó el mismo protocolo anterior con algunas modificaciones. En tubos eppendorf que contenían un volumen de 50 μ l de la mezcla de ensayo, se homogeneizaron los oocitos (1, 2, 3 y 4 oocitos por tubo) usando un vástago de vidrio. De aquí en adelante se repitió el protocolo descrito anteriormente.

3.9 Cuantificación de CO₂

Grupos de 5 oocitos se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en tubos sellados con un flujo continuo de oxígeno. Cada tubo tenía 120 µl de solución Barth. El CO₂ que se liberó se recolectó en viales que tenían 600 µl de NaOH 0,3 N – Tritón X-100. A estos viales se les agregaron 4 ml de líquido de centelleo y 300 µl de agua, y se pusieron en contador de centelleo Packard modelo 1600 TR.

3.10 Aislamiento de glicógeno

Para medir la incorporación de glucosa marcada en glicógeno, se trabajó de acuerdo al protocolo que aparece en un trabajo previo (Ureta et al., 2000). Cada uno de los oocitos fue digerido en un tubo eppendorf individual, que tenía 200 µl de KOH 30 %, durante 30 min a 100°. Pasados los 30 min la mezcla incubada se vertió sobre pequeños cuadrados de papel Whatman ET31, previamente numerados, que tienen la cualidad de retener al glicógeno. Se esperó a que cada papel se secase y se dejaron toda la noche en alcohol 66 % a - 20°. Los papeles se lavaron tres veces en alcohol 66 % a temperatura ambiente, agitándolos durante 30 min. Una vez hechos los lavados, los papeles se secaron sobre papel toalla, y luego bajo luz infrarroja. Finalmente, cada papel se colocó en un vial con 4 ml de líquido de centelleo, y cada vial se puso en contador de centelleo Packard modelo 1600 TR.

3.11 Purificación parcial de la GS de músculo de rana.

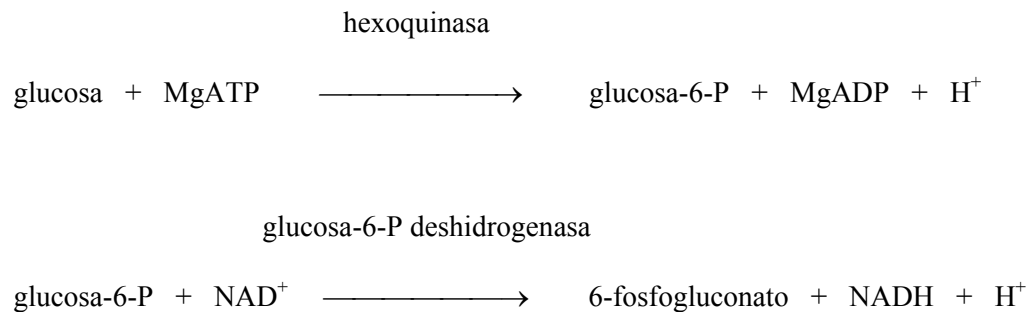
Se partía de 100 gramos de músculo de rana, los cuales se homogeneizaron en amortiguador A usando un aparato omni-mixer, en una proporción 1 : 2,5 (p/v). Luego se centrifugó la muestra durante 20 min a 8.000 rpm en una centrifuga Sorvall modelo RC-5 rotor 5534. Se descartó el pellet y el líquido sobrenadante (S1) se filtró a través de lana de vidrio, y se centrifugó durante 90 min a 40.000 rpm en una centrifuga Sorvall modelo Ultra Pro80 rotor TG-475. Se descartó el líquido sobrenadante (S2) y se separó la capa microsomal que cubre al pellet de glicógeno, que es muy rico en GS. Luego, se resuspendió el pellet de glicógeno en una mínima cantidad de amortiguador B (Tris 50 mM pH 7,6, EDTA 5 mM, DTT 2 mM). En seguida, se realizó la segunda etapa de la purificación, en la que se aplicó la muestra a una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa, previamente equilibrada en amortiguador B. La columna se lavó con un volumen de amortiguador C (amortiguador B + 0,25% de glicógeno).

Luego se lavó con tres volúmenes de amortiguador C + NaCl 0,05 M. Finalmente, la muestra se eluyó usando un gradiente de amortiguador C + NaCl de 0,05 a 1 M.

La tercera etapa de la purificación consistió en pasar la muestra por una columna Sephacryl S-200 para realizar una cromatografía de exclusión molecular. La columna se lavó con 200 ml de un amortiguador D que estaba compuesto por Tris 50 mM pH 7,6, DTT 2 mM, EDTA 5 mM, KCl 100 mM, 1 % de glicerol y 0,25 % de glicógeno. Además se cargó a la columna 100 µl de citocromo C (30 mg/ml) y 10 µl de glucosa-6-P deshidrogenasa, los que se usaron como estándares de peso molecular.

3.12 Medición de la actividad de la HK *in vitro*

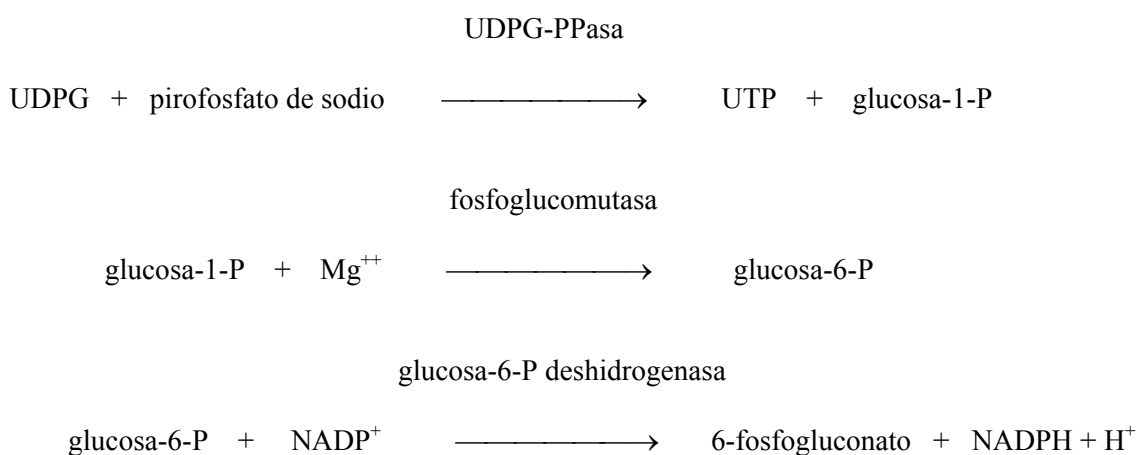
La actividad enzimática se determinó midiendo el cambio de absorbancia que se produce a 340 nm, al acoplar la reacción llevada a cabo por la HK a la reacción de deshidrogenación de la glc-6-P, de acuerdo al siguiente esquema:



La velocidad de formación del NADH se registraba en un espectrofotómetro Unicam UV2-100 a 28°. El medio de reacción tenía un volumen final de 1 ml, y contenía los siguientes reactivos (concentraciones finales): Tris-HCl 80 mM pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 12,6 mM, ATP 5 mM, glucosa 1 mM, EDTA 1,6 mM, NAD⁺ 0,5 mM y 0,5 U de glucosa-6-P deshidrogenasa. La reacción se iniciaba al agregar ATP. Una unidad de HK (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de glc-6-P en 1 min a 28°.

3.13 Medición de la actividad de la UDPG-PPasa *in vitro*

La actividad enzimática se determinó midiendo el cambio de absorbancia que se produce a 340 nm, al acoplar la reacción llevada a cabo por la UDPG-PPasa a las reacciones catalizadas por la PGM y la glucosa-6-P deshidrogenasa (Martz et al., 2002), con algunas modificaciones, de acuerdo al siguiente esquema:



La velocidad de formación del NADPH se registraba en un espectrofotómetro Unicam UV2-100. El medio de reacción tenía un volumen final de 1 ml, y contenía los siguientes reactivos (concentraciones finales): glicilglicina 50 mM pH 8,5, UDP-glucosa 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NADP⁺ 0,6 mM, pirofosfato de sodio 3 mM, glc-1,6-bisP 0,02 mM, 2 U de fosfoglucomutasa y 5 U de glucosa-6-P deshidrogenasa. La reacción se iniciaba al agregar pirofosfato de sodio. Una unidad de UDPG-PPasa (U) se define como la cantidad de enzima requerida para reducir 1 μmol de NADP⁺ en 1 min.

3.14 Determinación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas de los distintos extractos se hizo utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), usando BSA como proteína patrón. Además, en algunos casos, la determinación de proteínas se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 280 nm.

RESULTADOS

A. Fosfoglucomutasa

4.1 Medición de la actividad de la PGM

Se hicieron controles que permitieran validar la utilización del método espectrofotométrico para medir la actividad enzimática en un extracto de oocitos. Además, se verificó si el pH al cual se estaba midiendo la actividad enzimática era el óptimo, y se estudió la estabilidad de la enzima en el tiempo.

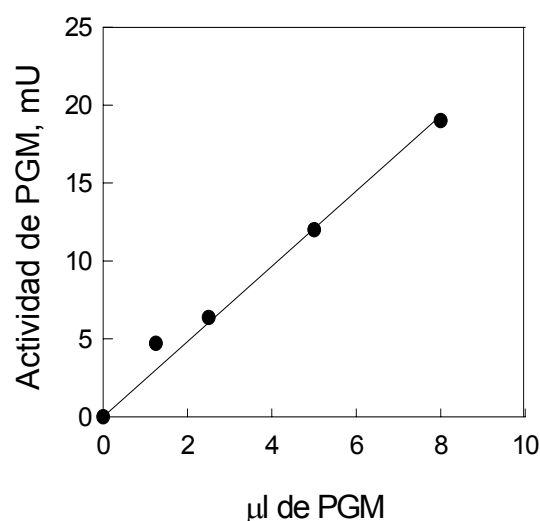


Figura 4. Actividad de la fosfoglucomutasa en función de la concentración de enzima. Para este ensayo se usaron 10 µl del líquido sobrenadante proveniente de un homogeneizado de oocitos, y la actividad se midió espectrofotométricamente tal como se describió en materiales y métodos, usando glc-1,6-bisP 0,015 mM y glc-1-P 1,5 mM a 24°.

La figura 4 muestra la actividad de la PGM medida en función de la concentración de enzima. Se puede observar que hay un aumento lineal de la actividad de la PGM en función de la concentración de enzima en el sobrenadante. A partir de estas mediciones, se pudo comprobar que la medición espectrofotométrica no se veía interferida por compuestos presentes en el

extracto de oocitos. Como controles, se hicieron determinaciones de actividad retirando por separado cada uno de los reactivos necesarios para la medición espectrofotométrica.

4.2 Características cinéticas de la PGM

En la figura 5 se muestra la actividad enzimática en función de la concentración de glc-1-P. La cinética para este sustrato resultó ser hiperbólica con valores para la constante de Michaelis aparente ($K_{m \text{ app}}$) y para la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) iguales a 0,16 mM y 4,3 U/ml, respectivamente. La obtención de este valor de $K_{m \text{ app}}$ permitió asegurar que las futuras mediciones de actividad enzimática se harían con una concentración de sustrato saturante, lo cual indica que se está midiendo la máxima actividad posible.

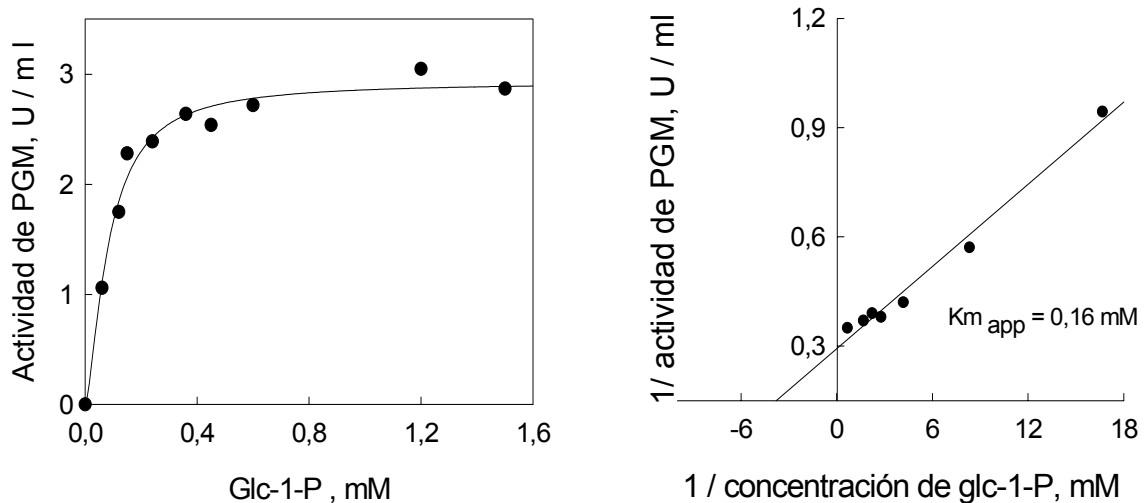


Figura 5. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la fosfoglucomutasa. Para este ensayo se usaron 5 μl del líquido sobrenadante proveniente de un homogeneizado de oocitos, y la actividad se midió espectrofotométricamente tal como se describió en materiales y métodos, variando la concentración de glc-1-P.

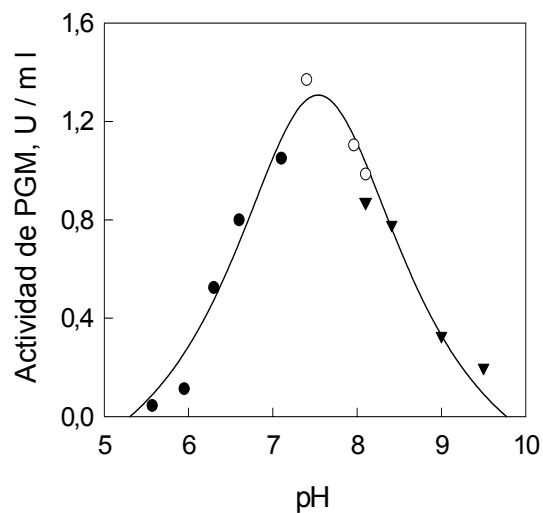


Figura 6. Efecto del pH sobre la actividad de la fosfoglucomutasa. La simbología corresponde a: ● amortiguador MES, ○ amortiguador HEPES, ▼ amortiguador BICINE. Para esta determinación se usaron 5 μ l del extracto en los medios de ensayo, y la actividad se midió espectrofotométricamente tal como se describió en materiales y métodos.

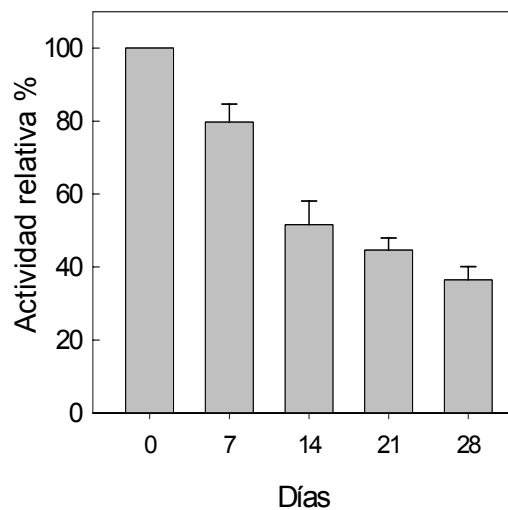


Figura 7. Estabilidad de la fosfoglucomutasa en el tiempo. La actividad enzimática está expresada como promedios de porcentajes de tres mediciones. Los resultados corresponden al valor promedio de cada grupo \pm el error estándar. Para esta determinación se usaron 5 μ l del extracto conservado a -20° en los medios de ensayo, y la actividad se midió espectrofotométricamente tal como se describió en materiales y métodos.

En la figura 6 se aprecia el efecto que ejerce el pH sobre la actividad enzimática de la PGM. Esta medición de actividad enzimática fue llevada a cabo en presencia de tres distintos amortiguadores para los diferentes pH. Como se puede observar, el pH óptimo para la actividad de la PGM fue de 7,5.

En la figura 7 se muestra un estudio de la estabilidad en el tiempo de la actividad de la PGM, en el extracto. Para preservar la actividad enzimática, el sobrenadante de homogeneizado se conservó en frío a -20° , y sólo se descongeló minutos antes de realizar cada medición. Después de una semana, la actividad enzimática disminuyó en 20,3 %, y al cabo de tres semanas se había perdido más de la mitad de la actividad enzimática original.

4.3 Determinación de la actividad endógena de la PGM

La actividad endógena de la PGM se determinó en el líquido sobrenadante obtenido después de centrifugar homogeneizados de oocitos utilizando el método espectrofotométrico descrito en materiales y métodos. Se encontró una actividad endógena igual a $41 \pm 3,1$ mU por oocito, valor promedio correspondiente a seis mediciones realizadas entre los meses de septiembre y enero. Sin embargo, entre los meses de abril y agosto, la actividad endógena de la PGM resultó ser de $9,4 \pm 0,93$ mU por oocito, valor promedio correspondiente a nueve mediciones. Se utilizó esta última determinación para calcular la cantidad de PGM que se debía microinyectar al oocito para determinar el coeficiente de control de la enzima.

4.4 Actividades endógenas de las enzimas que forman parte de la vía directa de síntesis de glicógeno, en los oocitos de rana

Para cada experimento de microinyección de una enzima en particular, se hizo el control de la actividad endógena de esa enzima en los oocitos. Resultaba imprescindible saber cuántas veces se estaba incrementando la actividad endógena, ya que este dato junto con la determinación de la síntesis de glicógeno permitirían calcular el coeficiente de control de flujo, para una enzima en particular. Por lo tanto, en el laboratorio se hicieron mediciones periódicas de las actividades endógenas de HK, PGM, UDPG-PPasa y GS. Sorpresivamente, pudimos observar que la actividad endógena de PGM variaba de acuerdo a la época del año, estableciéndose claramente 2 tendencias; una época en la cual la actividad de esta enzima era alta (verano) y otra en la cual su actividad disminuía cerca de 4 veces (invierno). En la Tabla 1

se muestran las actividades de las cuatro enzimas que participan en la vía directa de síntesis de glicógeno.

Con respecto a la UDPG-PPasa, también se observó que habían variaciones estacionales de actividad enzimática, ya que la actividad endógena medida en verano fue cerca de 2,7 veces mayor que la medida en invierno. Sobre la GS, no se observaron variaciones estacionales en las mediciones de actividad enzimática. Por último, sobre la HK no se puede asegurar si su actividad se conserva durante todo el año o si cambia, debido a que se han realizado pocas determinaciones de actividad endógena.

Tabla 1

Niveles endógenos de las enzimas de la vía directa de la síntesis de glicógeno en oocitos de rana		
Enzima	Actividad (mU/oocito)	Actividad relativa
*Hexoquinasa	0,08	1
Glicógeno Sintasa	0,7 ± 0,03	8,8
*UDPG-PPasa	**4,3 ± 0,65	53,8
	***11,5 ± 2,20	143,8
Fosfoglucomutasa	**9,4 ± 0,93	117,5
	***41 ± 3,10	512,5

* Mediciones hechas por la Dra. Ana Preller (HK) y por el tesista Christian Wilson (UDPG-PPasa)

** Mediciones hechas entre abril y agosto (PGM y UDPG-PPasa)

*** Mediciones hechas entre septiembre y enero (PGM) y entre noviembre y marzo (UDPG-PPasa)

4.5 Control de pureza de la PGM a inyectar

La técnica elegida para poder determinar el coeficiente de control de la PGM para la vía directa de síntesis de glicógeno, fue la microinyección de PGM comercial. Ello con el fin de aumentar la disponibilidad de la enzima en la vía metabólica, y observar su efecto sobre la síntesis de glicógeno, y calcular así el coeficiente de control. Por lo tanto, lo primero que correspondía hacer era un control de pureza de la enzima que se iba a microinyectar. Con este objeto, la enzima fue sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes. En la figura 8 panel izquierdo se observa que en la electroforesis practicada a la enzima de Sigma, además de la banda que correspondía a la de la PGM comercial (PM \approx 60 kDa), aparecieron bandas de proteínas de menor tamaño. Estas bandas podrían ser contaminantes o productos de degradación de la misma PGM. Por esta razón se descartó el uso de esta enzima comercial y se reemplazó por una PGM proveniente de Roche. Una electroforesis de esta última se muestra en la figura 8 panel derecho. Se aprecia sólo una banda de proteína con la masa molecular de la PGM. Esta fue la enzima elegida para los experimentos de microinyección.

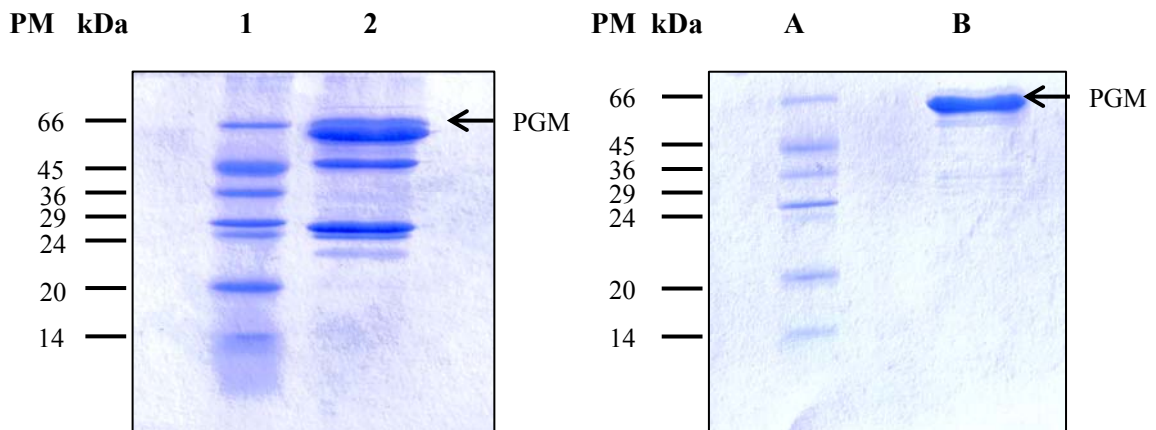


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 11, 5 % en condiciones desnaturalantes de fosfoglucomutasa comercial. Se cargaron 20 μ g de PGM comercial. Panel izquierdo: Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: PGM Sigma. Panel derecho: Carril A: estándares de peso molecular; carril B: PGM Roche. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

4.6 Control ejercido por la PGM sobre el flujo por la vía directa de síntesis de glicógeno

Se determinó la influencia que tiene el aumento intracelular de la actividad de la PGM sobre el flujo por la vía de síntesis de glicógeno en los oocitos. Para ello, se microinyectaron oocitos con concentraciones crecientes de PGM, lo que permitió aumentar hasta 15 veces la actividad endógena de la enzima. Una hora después de la inyección de PGM, los oocitos se inyectaron con 6 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa tal como se describió en materiales y métodos. El volumen de cada inyección fue de 50 nl.

En la figura 9 panel A se puede observar la relación que existe entre el aumento de la actividad de PGM dentro de los oocitos y la síntesis de glicógeno. Como se puede ver, un aumento de la actividad de la PGM de hasta 6 veces el valor endógeno produjo sólo un pequeño incremento del flujo a través de la vía de síntesis de glicógeno. Como control de la especificidad del efecto de PGM se midió el flujo a través de la vía de las pentosas-fosfato. Para ello, se cuantificó el CO₂ producido a expensas de la glucosa microinyectada en las células. En el panel B, se ve que la producción de CO₂ presenta una leve disminución al aumentar la actividad enzimática. En los gráficos insertos en A y en B, se muestran los coeficientes de control obtenidos para la PGM en la vía de síntesis de glicógeno y de las pentosas-fosfato, respectivamente. En el caso de la síntesis de glicógeno, el valor obtenido para el coeficiente de control de la PGM fue 0,19. Este valor está indicando que la enzima ejercería un bajo control sobre el flujo de la vía directa de síntesis de glicógeno. Para la vía de las pentosas-fosfato, el valor del coeficiente de control de la PGM fue igual a -0,09, lo que está indicando que el aumento intracelular de la actividad de PGM no afectaría el flujo por la vía de las pentosas-fosfato.

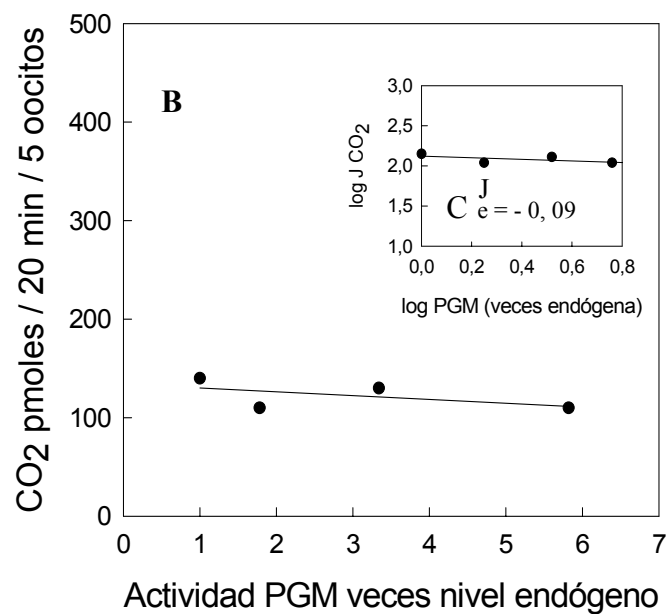
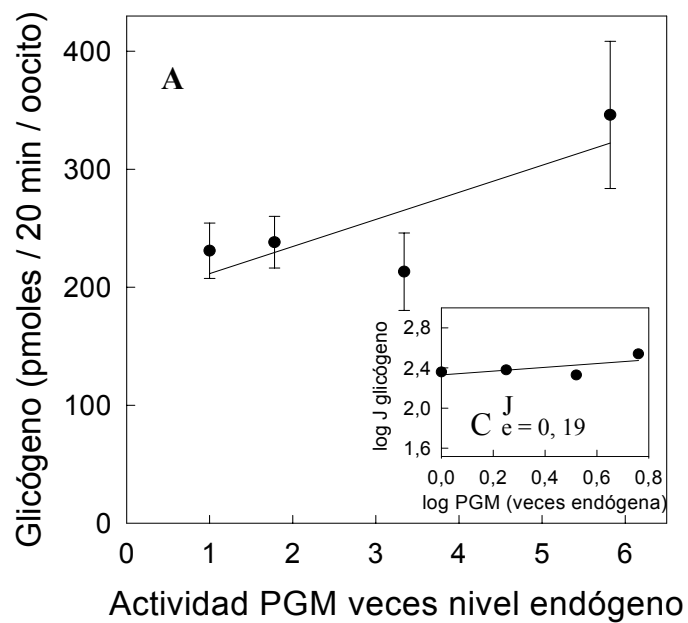


Figura 9. Coeficientes de control para la fosfoglucomutasa. A y B. Grupos de 10 oocitos fueron inyectados con cantidades crecientes de enzima y preincubados durante 1 h a 20°. Posteriormente, las células se inyectaron con 6 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa y se incubaron bajo una atmósfera de O₂ con agitación continua durante 20 min, colectándose el CO₂ producido. Después se aisló el glicógeno y se cuantificó la radiactividad incorporada en glicógeno y CO₂. Los resultados corresponden al valor promedio de cada grupo ± el error estándar. Gráficos insertos. Cálculo de los coeficientes de control a partir de los datos mostrados en A y B.

Con el fin de asegurar que el bajo valor del coeficiente de control medido para la PGM no es consecuencia de una posible inactivación de la enzima dentro del oocito, se hizo un control que consistió en tomar grupos de oocitos microinyectados con las distintas concentraciones de PGM, y medir la actividad enzimática después de 1 hora de haberse realizado la microinyección. Cabe señalar que este control se hizo para cada experimento de determinación de coeficiente de control de flujo. Un resultado típico se muestra en la Tabla 2. De los resultados obtenidos se puede apreciar que la actividad de PGM medida después de 1 hora de microinyección, corresponde en general a la actividad esperada (enzima endógena + enzima inyectada). Esto demuestra que la PGM inyectada dentro del oocito se mantiene activa al momento de realizar el experimento de determinación de coeficiente de control de flujo de PGM.

Tabla 2

Actividad de PGM medida después de inyectar la enzima en oocitos			
Grupos de oocitos	PGM mU inyectadas / oocito	PGM (mU endógena + mU inyectada)	
		Experimental	Teórico esperado
Ooc. no perturbados	0	14, 7	
Ooc. inyectados con Barth	0	16, 2	
Ooc. inyectados con PGM	11, 4	24, 1	26, 9
Ooc. inyectados con PGM	28, 8	36, 9	44, 3
Ooc. inyectados con PGM	38, 4	45, 8	53, 9
Ooc. inyectados con PGM	52, 4	60, 9	67, 9

Para el cálculo de los valores teóricos esperados se parte de la base que la mU endógenas / oocito son 15,5. Este valor corresponde al promedio de las mU medidas en los oocitos no perturbados con las mU medidas en los inyectados con Barth.

B. Glicógeno Sintasa

4.7 Actividad de la GS de oocitos

Se determinó la actividad endógena de la GS de oocitos utilizando dos fracciones distintas. Una medición se llevó a cabo utilizando el líquido sobrenadante de homogeneizado de oocitos, y la otra se realizó en un homogeneizado total de uno, dos y tres oocitos. Para ambas determinaciones se utilizó el protocolo descrito en materiales y métodos. El medio de reacción contenía glc-6-P 3 mM. La figura 10 muestra la actividad enzimática medida en uno, dos y tres oocitos. Como se puede observar, hay una relación lineal entre el aumento del número de oocitos con el aumento de la actividad enzimática. La actividad medida corresponde a 0,7 mU por oocito. Cuando se midió la actividad en el líquido sobrenadante proveniente de un homogeneizado celular, se obtuvo un valor idéntico, que resultó ser igual a $0,7 \pm 0,03$ mU por oocito, valor promedio correspondiente a cinco mediciones. Cabe señalar que además se hicieron determinaciones de actividad de GS en el sobrenadante de homogeneizado de oocitos en ausencia de glc-6-P, obteniendo como resultado una actividad muy baja, igual a $0,2 \pm 0,05$ mU por oocito, valor promedio correspondiente a tres mediciones. Esto se hizo con el objeto de determinar la actividad de ambas formas de la GS, su forma D (dependiente de glc-6-P) y su forma I (independiente de glc-6-P). De acuerdo con los resultados obtenidos, en el líquido sobrenadante de homogeneizado de oocitos el porcentaje de actividad de la forma D de la GS alcanza al 63 %, mientras que la forma I corresponde al 37 %.

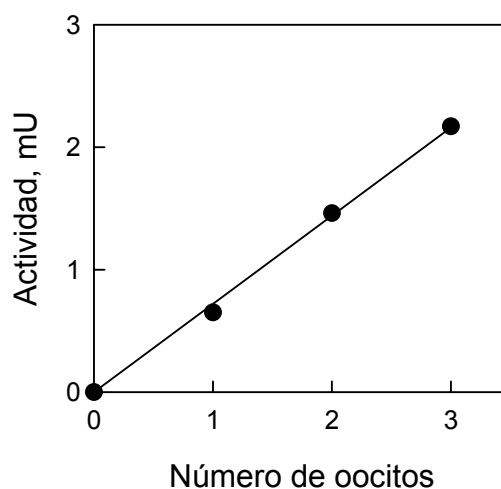


Figura 10. Actividad de la glicógeno sintasa en función del número de oocitos. La actividad de la enzima fue medida a 32° tal como se describe en materiales y métodos, usando un radioensayo que utiliza UDP-glucosa 3 mM y glc-6-P 3 mM.

4.8 Control de pureza de la GS a inyectar

Con el fin de determinar el coeficiente de control de la GS, se buscó microinyectar esta enzima dentro de los oocitos. La única GS comercial disponible en el mercado es de Sigma. Para controlar la pureza de la enzima, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.

En la figura 11 se puede observar que además de la banda correspondiente a la GS (PM \approx 80 kDa), aparecen dos bandas de proteína de menor tamaño, lo que indica que pueden ser contaminantes o productos de degradación de la misma GS. Esto indica que esta enzima no es adecuada para ser microinyectada dentro del oocito, ya que o está contaminada, o está muy degradada.

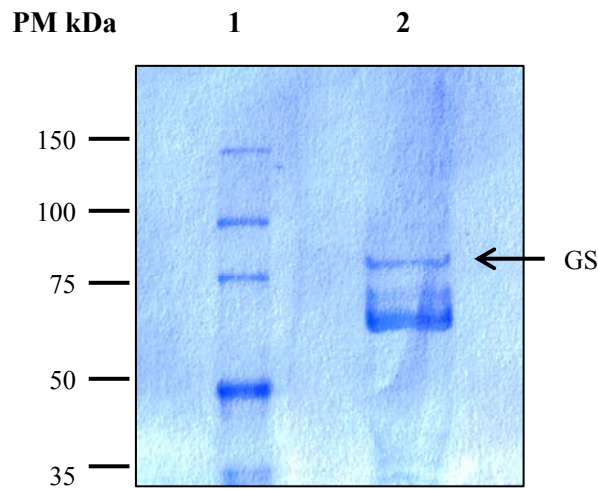


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 % en condiciones desnaturalantes de glicógeno sintasa comercial. Se cargaron 16 μ g de GS comercial. Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: GS Sigma. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

4.9 Purificación parcial de GS de músculo de rana

Con el objetivo de microinyectar GS dentro de los oocitos, y ante la imposibilidad de utilizar la GS comercial para este propósito, se montó un protocolo para purificar esta enzima desde músculo de rana, basado principalmente en el trabajo de Camici et al., (1984).

4.9.1 Obtención del pellet rico en GS

La primera etapa de purificación consistía en obtener un pellet rico en GS. Este pellet se obtuvo tal como se describe en materiales y métodos a partir de un homogeneizado de músculo de rana. Se hicieron ensayos de determinación de actividad enzimática de la GS de pellet de homogeneizado de músculo resuspendido en amortiguador B. Esta determinación de actividad se realizó en función del tiempo y de la concentración, con el fin de cerciorarse de que se estaba midiendo una actividad enzimática en velocidad inicial. Para este ensayo, se utilizó una dilución de 50 veces del pellet resuspendido original, y se usaron tres alícuotas distintas de esa dilución que se incubaron durante tiempos diferentes. Como se puede observar en la figura 12, una correcta medición de actividad enzimática se obtiene usando 5 μ l del pellet resuspendido y diluido, ya que la velocidad de reacción es lineal al menos durante 6 min.

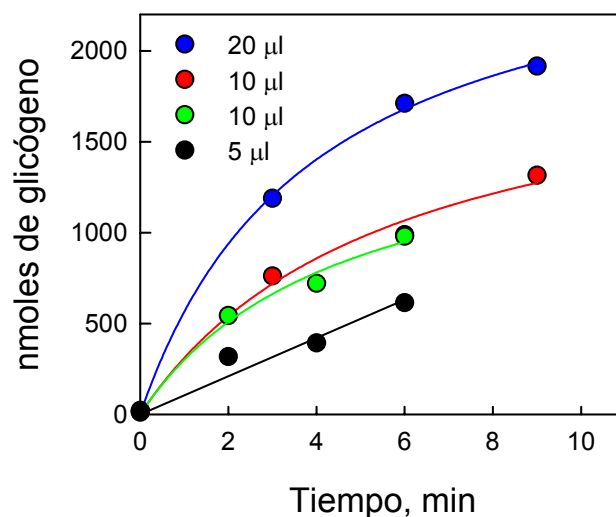


Figura 12. Curva de progreso para la glicógeno sintasa. Se midió la cantidad de producto formado en función del tiempo, con distintas cantidades de enzima. La actividad de la enzima fue medida a 32° tal como se describe en materiales y métodos, usando un radioensayo que utiliza UDP-glucosa 3 mM, glc-6-P 3 mM, y una dilución de 50 veces del pellet resuspendido rico en GS.

Para preservar la actividad enzimática del pellet, éste se conservó en frío a - 20°, y sólo se descongeló minutos antes de realizar cada medición. La actividad del pellet se mantuvo intacta durante muchos meses. Sin embargo, el S1 (sobrenadante 1) y el S2 (sobrenadante 2) provenientes de la homogeneización del músculo de rana perdieron su actividad rápidamente, pese a su conservación a - 20°. Después de 1 semana de congelación, estas fracciones habían perdido más de la mitad de su actividad (datos no mostrados).

En la Tabla 3 se comparó la actividad de GS de oocito con la de músculo de rana. Como se puede apreciar, la actividad de GS en músculo es alrededor de 2,6 veces mayor que la actividad presente en oocitos.

Tabla 3

Comparación entre las actividades de la glicógeno sintasa de músculo y de oocito de rana.

Tejido	Actividad de GS (mU/g/min)	Actividad relativa
Oocito de rana	122, 8	1
Músculo de rana	317, 7	2, 6

4.9.2 Cromatografía en DEAE-celulosa de GS de músculo de rana

Una vez obtenido el pellet rico en GS, éste fue resuspendido en 3,5 ml de amortiguador B. La segunda etapa de la purificación consistió en cargar el pellet resuspendido a una columna de DEAE-celulosa. En la figura 13 se muestra el resultado de esta cromatografía. Se puede apreciar un pico de actividad de GS que eluye a una concentración salina cercana a 0,17 M, el que coincide con el pico que apareció al determinar las proteínas, midiendo la absorbancia a 280 nm.

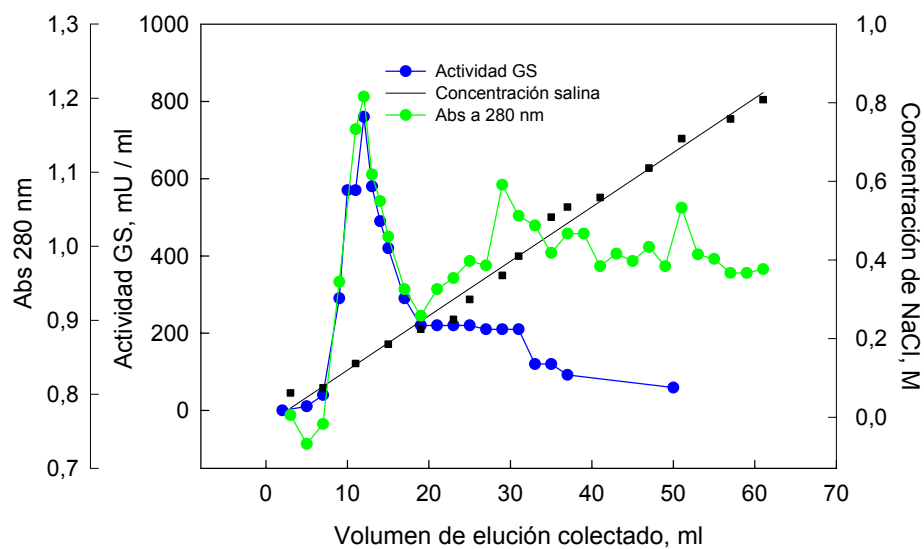


Figura 13. Cromatografía en DEAE-celulosa de GS de músculo de rana. 3,5 ml de pellet de homogeneizado de músculo de rana resuspendido que contenían 35 unidades de GS se colocaron en una columna (15 x 1,5 cm) de DEAE-celulosa equilibrada con amortiguador B. Se hizo un primer lavado con 15 ml de amortiguador C. Se hizo un segundo lavado con 45 ml de amortiguador C + NaCl 0,05 M. Finalmente, las proteínas se eluyeron con NaCl en una gradiente lineal de 0,05 M a 1 M en amortiguador C. Se colectaron fracciones de 3 ml. La cromatografía se llevó a cabo a 4°. La actividad de la enzima fue medida a 32° tal como se describe en materiales y métodos, usando un radioensayo que utiliza UDP-glucosa 3 mM y glc-6-P 3 mM.

4.9.3 Detección de HK, PGM y UDPG-PPasa en las fracciones obtenidas de la cromatografía en DEAE-celulosa

En las fracciones obtenidas de la cromatografía en DEAE-celulosa se buscó la presencia de las otras tres enzimas que participan en la vía directa de síntesis de glicógeno. Estas enzimas son la HK, la PGM y la UDPG-PPasa. Este ensayo se hizo con el objetivo de saber si estas enzimas coelúan con la GS en la cromatografía en DEAE-celulosa. De acuerdo con los resultados de la figura 14, las actividades de HK y de UDPG-PPasa coinciden con el pico de la GS; no así la PGM, que eluye antes. Este control indica la necesidad de continuar purificando la GS para poder microinyectarla en los oocitos.

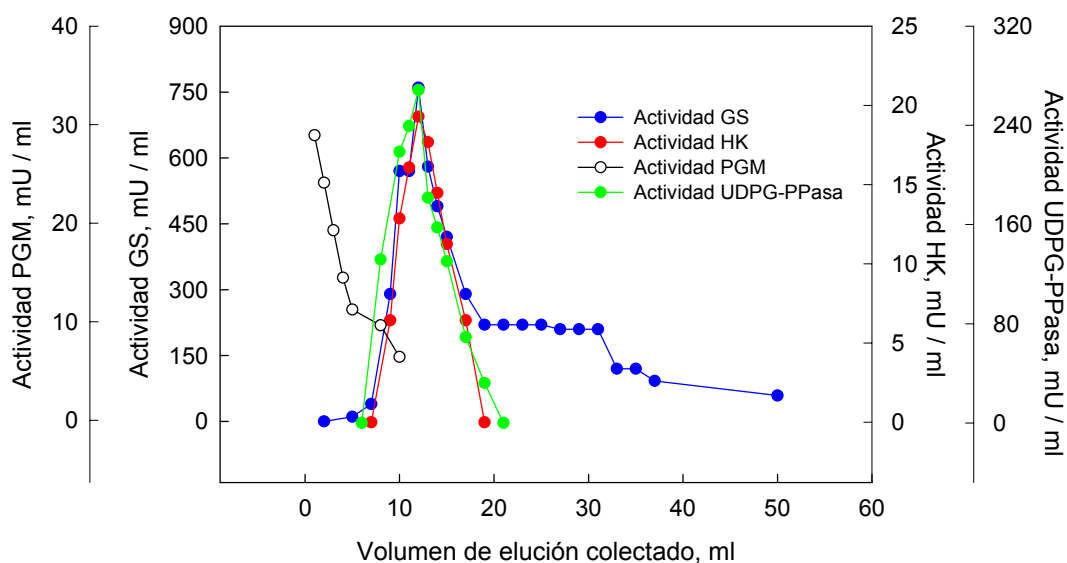


Figura 14. Cromatografía en DEAE-celulosa: elución de HK, PGM y UDPG-PPasa. Se midieron las actividades enzimáticas de HK, PGM y de UDPG-PPasa en las fracciones que formaban el pico de actividad de GS obtenido en la cromatografía en DEAE-celulosa. Se usaron 100 μ l del eluido para determinar la actividad de HK. Para las determinaciones de actividad de la PGM y de la UDPG-PPasa se usaron 100 μ l y 50 μ l del eluido, respectivamente. Las actividades enzimáticas fueron medidas tal como se describió en materiales y métodos.

Con las fracciones de mayor actividad de GS eluidas de la columna de DEAE-celulosa se hizo un pool, al que se le determinó actividad de GS y concentración de proteínas. La recuperación de la cromatografía fue bastante baja; de las 35 U presentes en el pellet de GS que se cargaron a la

columna, sólo se recuperaron 11,1 U, lo que equivale al 32 % de la actividad cargada. Esto quiere decir que se perdió 68 % de la actividad de GS. Con el objeto de verificar si la GS había eluído antes de aplicar la gradiente salina, se midió la actividad de la enzima en los lavados de la columna. En el primer lavado (15 ml) la actividad medida fue de 1,5 U totales, mientras que en el segundo (45 ml), la actividad fue de 0,9 U totales. Esto indica que la enzima prácticamente no se perdió en esta etapa, y descarta la posibilidad que la baja recuperación se deba a esta causa. Al comparar la concentración de proteínas que había en el pellet y en el pool de DEAE-celulosa, se observa una disminución de 243 veces. Por último con el fin de cotejar el grado de pureza alcanzado con estas 2 etapas de purificación, se compararon las actividades específicas del pellet y del pool de DEAE-celulosa, con la actividad específica del sobrenadante 1 (S1). A partir de los resultados de la Tabla 4, se observa que hasta esta etapa, se ha alcanzado un grado de purificación de 150 veces con respecto a S1. El rendimiento alcanzado en esta etapa es del 15 %.

4.9.4 Cromatografía en Sephacryl S-200 de GS de músculo de rana

Una vez obtenido el pool de DEAE-celulosa, éste se concentró hasta llegar a un volumen de 0,5 ml. La tercera etapa de la purificación consistió en cargar el pool de DEAE-celulosa concentrado a una columna de Sephacryl S-200.

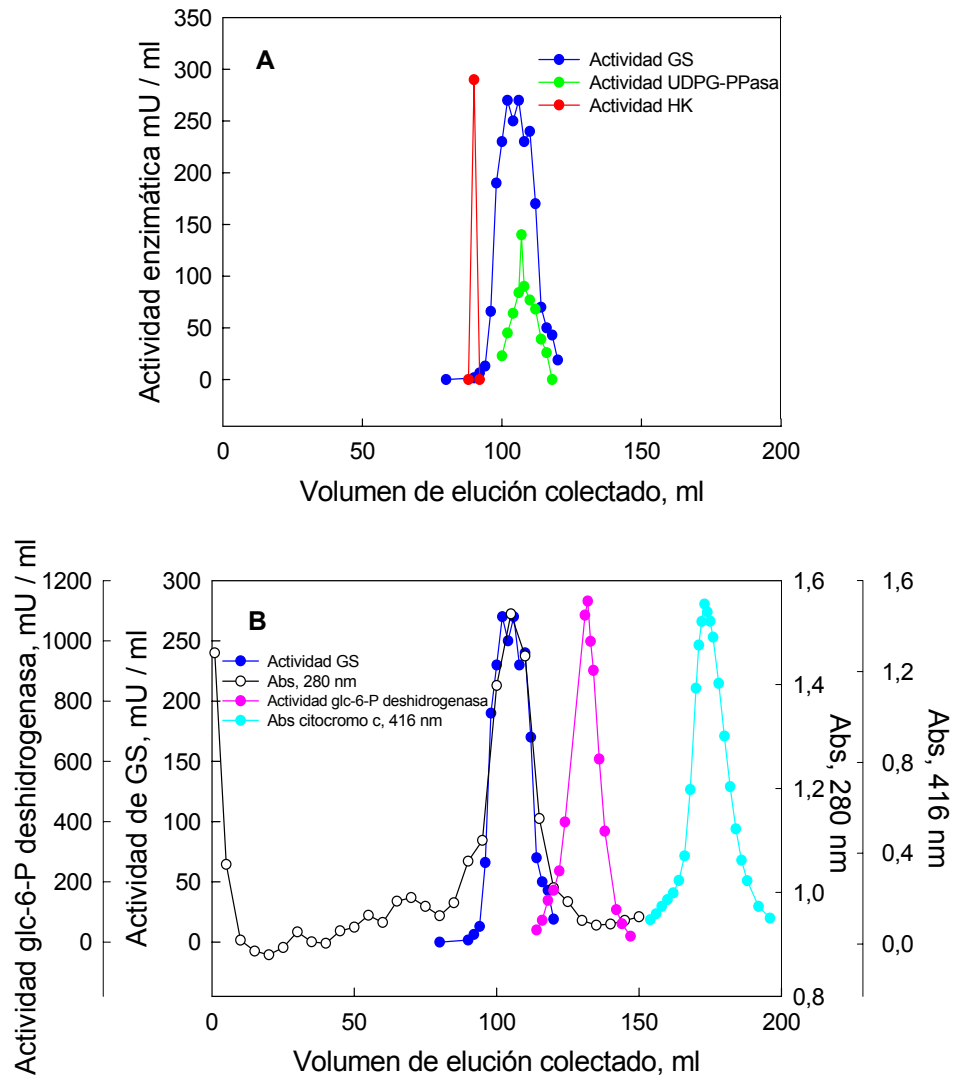


Figura 15. Cromatografía en Sephacryl S-200 de GS de músculo de rana. 0,5 ml del pool de DEAE-celulosa concentrado que contenían 11,1 unidades de GS se colocaron en una columna de Sephacryl S-200 (2,1x 83,5 cm) equilibrada con amortiguador D. Se lavó con 200 ml de amortiguador D. Se colectaron fracciones de 1 ml. La cromatografía se llevó a cabo a 4°. La actividad de la GS fue medida a 32° tal como se describe en materiales y métodos, usando un radioensayo que utiliza UDP-glucosa 3 mM y glc-6-P 3 mM. En el panel A se observa la elución de la GS, HK y UDPG-PPasa. En el panel B se muestra la elución de la GS, de los estándares de PM glucosa-6-P deshidrogenasa y citocromo C, y el perfil de proteínas de la cromatografía.

Junto con el pool concentrado se cargaron a la columna 100 µl de citocromo C (30 mg/ml) y 10 µl de glucosa-6-P deshidrogenasa, los que se usaron como estándares de peso molecular. La figura 15 muestra la cromatografía en Sephacryl S-200 practicada al pool concentrado obtenido de la cromatografía en DEAE-celulosa. En el panel A se puede apreciar que la actividad enzimática de UDPG-PPasa coincide con el pico de la GS; no así la HK, que eluye antes. En el panel B se observa que la GS eluye antes que la glucosa-6-P deshidrogenasa (108 kDa) y que el citocromo C (12,5 kDa).

Al igual que como ocurrió con la cromatografía en DEAE-celulosa, la recuperación de la cromatografía en Sephacryl S-200 fue baja, ya que de las 11,1 U de GS que se cargaron a la columna, sólo se recuperaron 3,8 U, lo que equivale al 34 % de la actividad cargada. Esto quiere decir que se perdió 66 % de la actividad de GS.

Puesto que la UDPG-PPasa y la GS habían coeluido en Sephacryl, y teniendo en cuenta que el objetivo era obtener una fracción rica en GS, que estuviera libre de las demás enzimas presentes en la vía directa de síntesis de glicógeno, queda claro que no era posible juntar en un pool todas las fracciones que tenían actividad GS. Por esta razón se optó por trabajar sólo con las fracciones que tuvieran las mayores actividades de GS obtenidas de la cromatografía en Sephacryl S-200, y que estuvieran libres de UDPG-PPasa. A cada una de estas fracciones se les determinó la concentración de proteínas para estimar su actividad específica. La fracción 98 fue la que alcanzó la mayor actividad específica, la que resultó ser igual a 34,2 U/mg, lo que implicaba que esta fracción era 684 veces más pura que el S1, y que era la fracción más pura obtenida de la cromatografía en Sephacryl S-200.

Sin embargo, con el objeto de hacer un análisis comparativo entre todas las etapas de purificación a las que se sometió la GS de músculo de rana, en la Tabla 4 se incluyó la purificación en Sephacryl. Debe tomarse en consideración que los valores que corresponden a esta etapa, se obtuvieron mediante la suma de las actividades y de las concentraciones de proteínas que se midieron para cada una de las fracciones que tenían actividad GS, eluidas de la cromatografía en Sephacryl. Como se dijo anteriormente, estas fracciones eluidas de la cromatografía en Sephacryl nunca se juntaron en un pool. Bajo esta perspectiva, en esta etapa se logró purificar la enzima 200 veces, con un rendimiento del 5 %.

Tabla 4**Purificación de la enzima glicógeno sintasa de músculo de rana**

Fracción	Actividad (U / ml)	Volumen (ml)	Actividad Total (U)	Proteína (mg / ml)	* A. E. (U/ mg)	Purificación (veces)	Rendimiento %
S1	0,3	249	74,7	6,1	0,05	1	100
Pellet	10	3,5	35	9,7	1,03	21	47
DEAE	0,3	37	11,1	0,04	7,5	150	15
† Sphacryl	0,1	38	3,8	0,01	10	200	5

*A.E. = Actividad específica

S1 = Sobrenadante de la primera centrifugación

Pellet = Precipitado de la segunda centrifugación

† = Corresponde a la suma de las actividades GS y proteínas medidas en las fracciones separadas (véase comentario en la p. 31)

Se realizó una electroforesis a cada una de las muestras de GS de las distintas etapas de la purificación, lo que permitió observar el avance del proceso (figura 16). Para cotejar la pureza de la muestra cromatografiada en Sephacryl S-200, se cargó al gel la fracción 98, que fue la fracción eluída con mayor actividad específica. En las etapas que corresponden a las cromatografías en DEAE-celulosa y Sephacryl S-200 se pudo observar una notoria disminución de las bandas que aparecían sobre los 100 kDa y bajo los 75 kDa, respecto a las bandas que aparecían en el S1 y el pellet rico en GS. Asimismo, se observó un aumento en la concentración de las bandas entre los 90 kDa y los 150 kDa. Considerando que el monómero de la GS debería tener un peso molecular cercano a los 90 kDa, y teniendo en cuenta la concentración de bandas entre los 90 y los 150 kDa, se puede establecer que las sucesivas etapas de purificación lograron

separar de manera efectiva (pero no completa) la GS de las demás proteínas presentes en el músculo de rana.

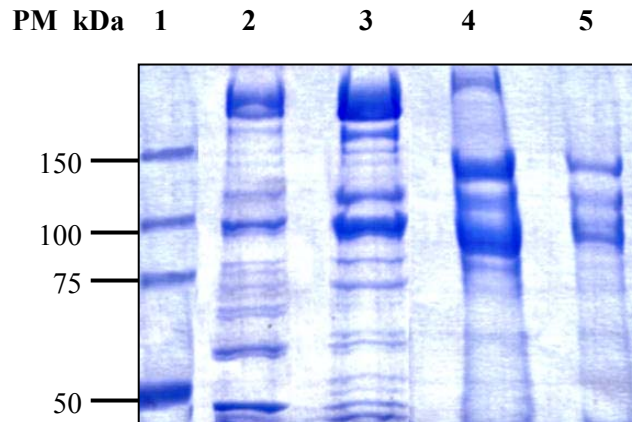


Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 % en condiciones desnaturalantes de las etapas de purificación de glicógeno sintasa de músculo de rana. Se cargaron 20 μg de proteínas de cada una de las etapas de purificación. Carril 1: estándares de peso molecular; carril 2: sobrenadante 1 (S1), carril 3: pellet rico en GS, carril 4: fracción purificada en columna de DEAE-celulosa, carril 5: fracción purificada en columna de Sephacryl S-200. Después de las electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Finalmente, la fracción cromatografiada en Sephacryl S-200 se concentró y se lavó con solución Barth que además tenía DTT 2 mM y 0,25 % de glicógeno, con el objetivo de obtener una fracción muy concentrada de GS, que estuviera libre de glicerol y de KCl 100 mM, para los experimentos de microinyección. Sin embargo, fue imposible concentrar esta fracción hasta el volumen requerido, ya que el glicógeno de la muestra gelificaba al concentrarse. Por lo tanto, se optó por lavar una vez más la fracción, ahora con solución Barth libre de glicógeno que sólo tenía DTT 2 mM. El resultado fue la inactivación progresiva de la enzima, lo que se tradujo en la pérdida de dos tercios de la actividad inicial, y por ende, en la imposibilidad de microinyectar esa fracción de GS, ya que no se contaba con la concentración suficiente.

En esta etapa del trabajo, se pensó en adquirir y limpiar la enzima comercial. Sin embargo, no existe enzima comercial disponible en este momento.

DISCUSIÓN

Fosfoglucomutasa

Caracterización cinética parcial de la PGM

Pese a que en la literatura existe vasta información acerca de la PGM, sobre la PGM de oocitos de rana la información es escasa. Por esta razón el primer objetivo en esta memoria fue hacer una caracterización parcial de la PGM con el fin de encontrar las condiciones óptimas de trabajo para esta enzima.

En primer lugar se probó si el método espectrofotométrico (Davies et al., 2003) era adecuado para medir la actividad de la PGM en un sobrenadante crudo de un homogeneizado de oocitos, ya que existía la posibilidad de que el sobrenadante fuera tan turbio que impidiera realizar una buena medición, o que contuviera compuestos que pudieran interferir con la medición de la reacción de la PGM, como por ejemplo glc-6-P. Afortunadamente, no hubo problemas de turbidez ni de contaminantes en el sobrenadante, y la curva de actividad en función de la concentración de enzima resultó lineal.

Al hacer ensayos de actividad enzimática en función de la concentración de glc-1-P en el sobrenadante de homogeneizado de oocitos, se observó que la cinética para este sustrato es hiperbólica con un valor de K_m igual a 0,16 mM. Las mediciones de actividad enzimática que se hicieron para ensayos de pH óptimo y de coeficiente de control, se llevaron a cabo con una concentración final de glc-1-P igual a 1,5 mM, ya que así se aseguraba la saturación de la enzima.

Al comparar los valores de K_m para glc-1-P que existen para las PGM de distintos organismos, se puede apreciar que el conjunto de ellos es bastante variado: existen valores de K_m tan pequeños como 0,0013 mM para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, o 0,016 mM para el maíz, o valores muy altos como 2,6 mM para la bacteria *Acetobacter xylinum*. Los valores más cercanos a la K_m determinada en esta tesis pertenecen a un tipo de tubérculo (*Solanum tuberosum*) con una K_m igual a 0,12 mM, y a la arveja (*Pisum sativum*), igual a 0,36 mM, (base de datos sobre enzimas BRENDA [en línea] <<http://www.brenda.uni-koeln.de/>>).

No existen en la literatura valores de K_m para glc-1-P, ni para glc-6-P de PGM de otros anfibios.

pH óptimo y estabilidad de la enzima en el tiempo

Otro ensayo indispensable para medir satisfactoriamente la actividad enzimática era determinar el pH al cual la enzima alcanzaba su mayor actividad. La actividad máxima de la PGM medida en el sobrenadante de homogeneizado de oocitos fue a pH 7,5. Al analizar los valores de pH óptimo para la PGM de otros organismos, se aprecia que el rango de valores es más bien estrecho; es de 7,4 en *Homo sapiens* a 8,6 en *Pisum sativum*. El valor obtenido en este ensayo coincide con muchos de los pH óptimos encontrados para otras PGM. Es así como en conejo (*Oryctolagus cuniculus*), papa (*Solanum tuberosum*) y un tipo de arbusto llamado Casia (*Cassia corymbosa*), el pH óptimo también es de 7,5 para la actividad de la PGM, (base de datos sobre enzimas BRENDA [en línea] <<http://www.brenda.uni-koeln.de/>>).

Con respecto a la estabilidad de la enzima, se observó que era posible preservar por mayor tiempo la actividad enzimática sólo en frío a -20°. La actividad enzimática en el sobrenadante de homogeneizado de oocitos disminuía en un 63,5 % al cabo de 28 días, mientras que si se conservaba entre 4° y 8°, esta actividad se perdía totalmente el cabo de 72 horas.

Actividad endógena en oocitos

Una vez que se determinaron las condiciones propicias para trabajar con la enzima, se procedió a determinar la actividad endógena de la PGM en los oocitos de rana. Para esto se utilizó el sobrenadante de un homogeneizado de oocitos. Se observaron dos tendencias estacionales para la actividad endógena de la enzima. Entre septiembre y enero la actividad medida fue de $41 \pm 3,1$ mU por oocito. Si este valor lo transformamos para expresarlo por gramo, entonces la actividad endógena fue de $5,7 \pm 0,4$ U por gramo de oocitos. Este valor concuerda con la medición de actividad endógena de PGM en oocitos de rana para la misma especie descrito por Radojkovic y Ureta (1982), que fue de $5,8 \pm 0,9$ U por gramo de oocitos. Sin embargo, entre los meses de abril y agosto la actividad medida decayó a $9,4 \pm 0,93$ mU por oocito. Al convertir este valor a unidades por gramo obtenemos una actividad endógena igual a $1,3 \pm 0,13$ U por gramo de oocitos. Es decir, la actividad endógena de la PGM medida entre abril y agosto es 4,4 veces más pequeña que la actividad medida entre los meses de septiembre y enero. Esto podría deberse a que en los meses de invierno las ranas suelen hibernar y reducen

por tanto su actividad metabólica. Algo parecido se ha visto con la enzima UDPG-PPasa ya que en los meses de invierno la actividad medida ha sido cerca de 2,7 veces inferior a la actividad medida durante los meses de verano (determinaciones hechas en el laboratorio por el tesista Christian Wilson). Entre noviembre y marzo la actividad medida fue de $11,5 \pm 2,2$ mU por oocito, mientras que entre abril y agosto la actividad medida fue de $4,3 \pm 0,65$ mU por oocito.

Al comparar los valores de actividades endógenas de las cuatro enzimas de la vía directa de la síntesis de glicógeno que aparecen en la Tabla 1, nos podemos percatar que la PGM es la enzima con mayor actividad en los oocitos. En la tendencia estacional de alta actividad, la actividad de PGM es cerca de 500 veces más alta que la actividad de la HK, que es la enzima con menor actividad. Incluso, en la tendencia estacional de baja actividad, la PGM es cerca de 100 veces más activa que la HK.

La determinación de la actividad endógena de la PGM en los oocitos era fundamental para los experimentos relacionados con el cálculo del coeficiente de control. Esto, porque al determinar la actividad endógena, podíamos elegir cuantas veces íbamos a incrementar la actividad de la PGM dentro del oocito.

Pureza y coeficiente de control de PGM

A lo largo de la historia, el estudio del control metabólico se ha abordado preferencialmente desde el enfoque que establece que en una vía metabólica existe sólo una enzima capaz de controlar el flujo, llamada enzima marcapaso o rate-limiting step. Esta enzima debería constituir la etapa más lenta de la vía metabólica, o ser la etapa más regulada de la vía. Sin embargo, existen algunas desventajas en la utilización de este enfoque, ya que la aplicación de éste, solo permite obtener información acerca de cuál es la enzima que controla el flujo, pero no da la posibilidad de comparar cuanto control ejercen las otras enzimas de la vía. Esto, debido a que la teoría de la enzima marcapaso no considera la posibilidad de que en una misma vía metabólica el control del flujo pueda estar compartido. A partir de los años sesenta, se comienzan a hacer estudios relacionados con el metabolismo basándose principalmente en 2 ramas: El MCA y el BST (Biochemical Systems Theory). La aplicación del MCA permite obtener una medida cuantitativa del control que ejerce una enzima sobre el flujo de una vía metabólica particular, y basándose en el Teorema de la Suma (Kacser y Porteous, 1987; Meléndez-Hevia et al., 1987), establece que el control sobre el flujo total de la vía estará distribuido entre todas las enzimas de la vía, lo que no significa que todas las enzimas deban tener el mismo grado de control, o por el

contrario, que no pueda haber una enzima que ejerza el mayor control sobre la vía. Cuando hablamos de control metabólico nos referimos a la capacidad o facultad que se tiene para hacer cambios en el estado metabólico en respuesta a una señal. En cambio, cuando hablamos de regulación metabólica, nos referimos a la mantención de una variable (por ej. concentración de un metabolito) constante en el tiempo, en desmedro de las fluctuaciones externas al sistema. La influencia de cada enzima participante en una vía se cuantifica mediante los coeficientes de control para cada una de las enzimas. Existen distintos métodos para calcular los coeficientes de control. Los estudios pueden ser directos, modificando la actividad enzimática de una enzima en particular, y midiendo el flujo, o indirectos, basados en mediciones experimentales y parámetros cinéticos de la enzimas.

Dentro de las mediciones directas, se han realizado experimentos en los que se ha alterado la actividad enzimática gracias al uso de inhibidores o activadores enzimáticos de una enzima en particular. Además hay estudios en los que se ha alterado la actividad enzimática genéticamente, incrementado la actividad enzimática por medio de la sobreexpresión del gen que la codifica (Fell, 1997). En el presente trabajo se calculó el coeficiente de control de la PGM modificando la actividad de la PGM, por medio de la microinyección de esta enzima pura dentro de los oocitos. Con el objeto de cotejar el grado de pureza de la PGM que se iba a microinyectar, la enzima fue sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes. Además, se hicieron controles que permitieron demostrar que el efecto sobre la síntesis de glicógeno se debía única y exclusivamente a la actividad de la PGM microinyectada, y no a otros factores. Se midió la actividad enzimática de HK, de UDPG-PPasa y de GS, en la PGM comercial Roche. No se detectó actividad de ninguna de estas tres enzimas en la PGM comercial, lo que indicaba que la PGM no estaba contaminada con ninguna de las restantes enzimas que forman parte de la vía directa de síntesis del glicógeno. En experimentos preliminares de microinyección de PGM, se había observado que al microinyectar la enzima a los oocitos se producía una fuerte inhibición sobre la síntesis de glicógeno (experimento no mostrado). La causa más probable de esto último podía ser el sulfato de amonio presente en la enzima comercial. Por ello, la PGM comercial se lavó con solución Barth para retirar todo el sulfato de amonio. Luego la enzima fue concentrada y resuspendida en solución Barth de acuerdo a las concentraciones de PGM requeridas para la microinyección. Después de microinyectar la PGM, se esperó una hora para que la enzima difundiera dentro del oocito. Se procedió entonces a microinyectar los 6 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa y los oocitos se incubaron durante 20 min. En experimentos previos se había visto

que la incorporación de 6 nmoles de glucosa marcada en glicógeno era lineal hasta 40 min (experimentos realizados por la Dra. Ana Preller). Por lo tanto, incubando durante 20 min se tenía la certeza que la medición de incorporación de glucosa marcada en glicógeno era lineal. Finalmente se cuantificó la producción de glicógeno y de CO₂ y se determinaron los coeficientes de control.

Se hicieron varios experimentos de microinyección de PGM dentro de los oocitos y para cada experimento se determinaron los valores de coeficientes de control para la enzima. En cada uno de estos experimentos se controló la actividad de la PGM microinyectada dentro de los oocitos, con el fin de asegurar que la enzima permanece activa dentro de las células (Tabla 2). En la figura 9 panel A se puede observar que al aumentar 6 veces la actividad endógena de la PGM dentro del oocito, se produce sólo un pequeño incremento en la síntesis de glicógeno. A partir del gráfico inserto que es logarítmico, se puede calcular de la pendiente el valor para el coeficiente de control para la PGM, que resultó ser igual a 0,19. En el panel B se observa que el aumento de 6 veces de la actividad endógena de la PGM produjo una disminución no significativa de la producción de CO₂, obteniéndose un coeficiente de control para la PGM igual a - 0,09. El valor del coeficiente de control medido para la PGM en la vía directa de síntesis de glicógeno es pequeño y estaba dentro de lo esperado. Los coeficientes de control medidos en esta misma especie para la HK, que dio alrededor de 0,5 (trabajo no publicado Dra Ana Preller) y para la UDPG-PPasa, igual a 0,1 (trabajo no publicado Christian Wilson), implican que los valores de los coeficientes de control para las restantes enzimas de la vía directa (PGM y GS) necesariamente deberían ser pequeños, ya que la suma de los coeficientes de control de las cuatro enzimas de esta vía metabólica debería ser igual a 1 según el Teorema de la suma (Kacser y Porteous, 1987; Meléndez-Hevia et al., 1987). Dicho de otra manera, la suma de los coeficientes de control para la PGM, y para la GS, no deben exceder de 0,4, por lo tanto resulta razonable que la PGM tenga un coeficiente de control bajo. El valor del coeficiente de control indica que la PGM ejerce un bajo control sobre la vía directa de síntesis de glicógeno en los oocitos de rana, y que no controla el flujo por la vía de las pentosas-P, puesto que no hubo cambios significativos en la liberación de CO₂. Se determinó el coeficiente de control de la PGM en la vía de las pentosas-P como una manera de controlar la especificidad del efecto producido por el aumento de la actividad de PGM. De esta manera se está demostrando que el aumento de la actividad de PGM en el oocito tuvo un efecto específico sobre la vía directa de síntesis de glicógeno, ya que no tuvo efecto sobre la vía de las pentosas-fosfato. Resulta relevante señalar

que hubo experimentos donde se aumentó cerca de 15 veces la actividad endógena de la PGM dentro del oocito, obteniéndose valores de coeficientes de control muy parecidos a los obtenidos cuando se aumentó en un rango estrecho la actividad endógena de dicha enzima. Esto evidencia que el control que ejerce la PGM sobre el flujo es el mismo para incrementos pequeños en la actividad endógena (6 veces) y para incrementos grandes (15 veces), lo que descarta la posibilidad de que el valor pequeño de coeficiente de control obtenido para la PGM en la síntesis de glicógeno se deba al pequeño incremento en la actividad endógena dentro de los oocitos.

Considerando que la PGM cataliza una reacción reversible, no existe ningún antecedente que relacione la bidireccionalidad de una reacción enzimática, con el grado de control que esta enzima puede tener sobre el flujo. Es más, la aplicación del MCA para estudiar el control del metabolismo, sólo permite obtener información cuantitativa acerca del control que las enzimas de una vía tienen sobre el flujo, permitiendo establecer una jerarquía. Asimismo, este enfoque no entrega respuestas sobre las razones por las cuales las enzimas tienen esos grados de control sobre el flujo (Fell, 1997).

La única referencia conocida respecto al cálculo del coeficiente de control para la PGM, corresponde a un trabajo realizado por Fernie et al., (2001) donde midió el coeficiente de control de la enzima sobre la síntesis de almidón en la papa, el cual resultó ser igual a 0,24. En este estudio, se aplicó MCA para el estudio del control metabólico, y la actividad enzimática se varió usando RNA antisentido para hacer inhibiciones de distinta magnitud sobre la PGM. Como se puede apreciar, este valor de coeficiente de control resultó ser similar al determinado en este trabajo, lo cual reforzaría la idea de que la PGM tiene un bajo control sobre la síntesis de glicógeno.

Glicógeno Sintasa

Actividad de la GS de oocitos *in vitro*

Según estudios previos, se ha visto que en oocitos de rana hay una mezcla de ambas formas de GS; la forma D, o dependiente de glc-6-P, y la forma I, o independiente de glc-6-P. Además, hay evidencia que en condiciones *in vitro* la forma predominante de la enzima es la forma D, ya que en ausencia de glc-6-P, es casi imposible medir actividad enzimática (Báez et al., 2003).

Con estos antecedentes se procedió a medir la actividad endógena de la GS total en oocitos de rana, la que resultó ser igual a $0,7 \pm 0,03$ mU por oocito. Este valor está muy cerca de lo

publicado por Báez para la misma especie, que fue $0,6 \pm 0,03$ mU por oocito (Báez et al., 2003). El medio de reacción que se utilizó para la medición de la actividad enzimática contenía NaF 60 mM, y el amortiguador A contenía NaF 100 mM. El NaF inhibe la acción de las fosfatasa presentes en el oocito, lo que permite la permanencia de la GS en su forma fosforilada o D. Esto implica que en la medición de actividad que se llevó a cabo, se midió la actividad de la GS total; esto quiere decir que la actividad medida corresponde a ambas formas de GS, la forma fosforilada o D, y la desfosforilada o I. Cabe señalar que se hicieron determinaciones de actividad de GS en oocitos en ausencia de glc-6-P, obteniendo como resultado una actividad bajísima, lo que concuerda con lo dicho anteriormente. De acuerdo con las determinaciones realizadas, el porcentaje de actividad de la forma D (dependiente de glc-6-P) alcanza al 63 %, mientras que la forma I (independiente de glc-6-P) corresponde a 37 %.

Al comparar la actividad endógena de la GS en los oocitos de rana con las actividades de las demás enzimas de la vía directa de síntesis de glicógeno, se observa que la GS es una de las enzimas con menor actividad, apareciendo por debajo de la PGM y de la UDPG-PPasa, y superando sólo a la HK (Tabla 1). La actividad de la GS es cerca de 9 veces mayor que la actividad de la HK, es cerca de 13 veces menor que la actividad invernal medida para la PGM, y es casi 59 veces menor que la actividad medida en verano para la PGM.

Es importante conocer la actividad endógena de la GS para poder calcular cuántas veces se debe incrementar la actividad endógena de la enzima en los experimentos de microinyección. Esta información era fundamental para la determinación del coeficiente de control de la GS. Con respecto a las variaciones estacionales de actividad observadas para las enzimas PGM y UDPG-PPasa, se puede señalar que este fenómeno no se repitió para la GS.

Pureza de la GS comercial

Con el fin de determinar cuán pura se encontraba la enzima GS de Sigma que se iba a utilizar para los ensayos de microinyección en los oocitos, se realizó una electroforesis de la enzima en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalantes (figura 11). De este ensayo se pudo establecer que la enzima no tenía la pureza suficiente como para poder ser microinyectada dentro de los oocitos. Ello queda de manifiesto al observar las bandas de proteínas que aparecen por debajo de la banda de proteína correspondiente a la GS ($PM \approx 80$ kDa). Por esta razón se decidió intentar purificar la enzima desde músculo de rana de acuerdo con el protocolo de Camici et al., (1984).

Coefficiente de control de GS

El rol que la GS cumple en el control y en la regulación del metabolismo de la vía de síntesis de glicógeno, ha estado en continuo cuestionamiento. Debido a su compleja regulación, llevada a cabo por modificación covalente (Mersmann y Segal, 1967) y modificación alostérica (Ferrer et al., 2003), y a la relocalización que sufre por acción de la glucosa y de glucosa-6-P (Fernández-Novell et al., 1992), se creía que esta enzima era la que controlaba el flujo en la vía de síntesis de glicógeno. Sin embargo, los últimos estudios que se han hecho sobre el control metabólico, indican que el control de esta vía lo ejercen el transportador de glucosa junto con la HK (Chase et al., 2001; Schafer et al., 2004).

En este trabajo, y en particular, para los estudios de control del metabolismo realizados en este laboratorio, no se consideró el control que pudiera ejercer el transportador de glucosa. La razón obedece al hecho que la glucosa es microinyectada directamente dentro del oocito, por lo que la vía metabólica no utiliza al transportador de glucosa.

Como se ha mencionado anteriormente, en este laboratorio se han determinado los coeficientes de control de flujo para la HK (0,5), para la PGM (0,19) y para la UDPG-PPasa (0,1). Si sumamos los tres coeficientes de control determinados, es decir: HK (0,5) + PGM (0,19) + UDPG-PPasa (0,1), el resultado que obtenemos es cercano a 0,8. Recordando que la suma de los coeficientes de control de una vía metabólica debe dar 1 (Kacser y Porteous, 1987; Meléndez-Hevia et al., 1987), se llega a la conclusión que el valor más probable que el coeficiente de control de la GS debería tener, es igual a 0,2. Esto está de acuerdo a lo planteado hipotéticamente en el inicio de esta Tesis, y concuerda con lo propuesto en otros estudios. En un estudio realizado por Chase et al., (2001), en músculo gastrocnemio de ratas, se estudió el control que tenían sobre el flujo de la vía de síntesis de glicógeno el transportador de glucosa junto con la HK, y la GS. Se usó MCA para el estudio del control metabólico, basándose en el cálculo de los coeficientes de control, y para la medición de los flujos metabólicos se utilizó NMR. Los resultados obtenidos, señalan que el coeficiente de control para el transportador de glucosa / HK para la síntesis de glicógeno fue igual a 1,1, mientras que el coeficiente de control para la GS fue igual a 0,01. Esto, evidentemente indica que la GS no estaría controlando el flujo, y que el gran control estaría ejercido por el transportador de glucosa / HK. Asimismo, en otro trabajo realizado por el grupo de Schafer et al., (2004), se estudió en células de ratas los mecanismos utilizados para controlar el flujo metabólico, en condiciones de hiperglicemia. Se

aplicó MCA y se determinaron los coeficientes de elasticidad, los que permiten determinar como varía la velocidad de una enzima en función de la concentración de un metabolito. Se llegó a la conclusión de que el rol de la GS sería impedir que el nivel del metabolito glc-6-P varíe dramáticamente, como consecuencia del gran aumento en el flujo causado por la hiperglicemia. Ello lo llevaría a cabo gracias a la regulación a la que está sometida por este metabolito, el cual activaría a la GS, lo que permitiría contrarrestar el aumento del flujo. Ellos sugieren que el control del flujo estaría al inicio de la vía, en el transportador de glucosa / HK, y que la GS tendría un rol regulador en el flujo metabólico, basado en la regulación a la que está sometida por fosforilación y por alosterismo, permitiéndole mantener constante la concentración de metabolitos intermedios de la vía, frente a cambios bruscos en el flujo.

Actividad de la GS en el pellet de músculo de rana

Se homogeneizó músculo de rana tal como se describe en materiales y métodos, obteniéndose un pellet rico en GS, el cual fue resuspendido en 3 ml de amortiguador B. Al medir la actividad del pellet resuspendido, nos percatamos que estábamos subestimando la real actividad de la GS, por lo cual fue necesario montar un ensayo donde se estudiara la actividad enzimática en función del tiempo de incubación y de la concentración de enzima. Este ensayo permitió encontrar una concentración y un tiempo apropiados para las mediciones de actividad enzimática en el pellet resuspendido. Se utilizó entonces una dilución de 50 veces del pellet, agregando 5 μ l del pellet diluído al mismo medio de reacción utilizado para medir la actividad enzimática de la GS de los oocitos. El tiempo de incubación se fijó en 4 min.

Al comparar las actividades de GS de músculo y de oocito de rana queda de manifiesto el beneficio de intentar purificar la GS desde músculo, debido a la gran cantidad de enzima que ahí existe. Como se puede apreciar en la Tabla 3, la actividad de la GS en músculo es casi 2,6 veces mayor que la actividad en oocito. La actividad está expresada en mU/g/min.

Purificación de GS a partir de músculo de rana

La primera etapa de la purificación consistió en obtener un pellet rico en GS, proveniente de homogeneizado de músculo de rana. Luego, este pellet fue resuspendido en 3 ml de amortiguador B, lo que permitió concentrar la muestra cerca de 71 veces. La segunda etapa consistió en cargar la muestra a una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa. En las fracciones eluídas con actividad GS se determinó que la enzima se había purificado cerca de 200

veces. La tercera etapa de purificación consistió en concentrar el pool hasta llegar a un volumen de 0,5 ml y procesarlo en una columna de exclusión molecular de Sephacryl S-200. Esta cromatografía permitió purificar la enzima cerca de 684 veces. Un punto a considerar es la baja recuperación obtenida en ambas cromatografías. La cromatografía en DEAE-celulosa tuvo un recuperación del 32 % y la de Sephacryl S-200 del 34 %. Para optimizar la recuperación se agregaron protectores de la actividad enzimática a los amortiguadores usados. Se agregó glicerol a los amortiguadores, y además se detectó que el DTT resultaba imprescindible para la estabilidad de la GS, ya que en ausencia de DTT la enzima se inactivaba (datos no mostrados). Sin embargo, en todas las cromatografías que se hicieron, incluso con los amortiguadores enriquecidos, las recuperaciones fueron bajas.

Se hicieron múltiples esfuerzos para concentrar la fracción rica en GS y además dejarla libre de glicerol y de KCl. Sin embargo, fue imposible llegar a concentrar la enzima hasta el volumen requerido y fue aún más difícil conservar la actividad de la fracción en ausencia de glicógeno y glicerol. Si se lavaba la fracción retirando el glicógeno y el glicerol, para evitar la gelificación de la muestra, la actividad de GS disminuía enseguida. Por otro lado, si se conservaban el glicógeno y el glicerol, y se intentaba concentrar la solución, no se llegaba al volumen requerido de concentración, debido a la gelificación de la solución. Es conocido el hecho de que la GS se asocia fuertemente a glicógeno y a algunas enzimas implicadas en las vías de síntesis y degradación del polisacárido y en la regulación de ellas (Bergamini et al., 1977). Por otra parte, recientemente se ha reportado que la GS se encuentra en estructuras subcelulares asociadas a proteínas estructurales de la célula (Prats et al., 2005). De aquí que no es de extrañar los impedimentos que se encontraron para concentrar la enzima.

Tampoco fue posible adquirir la enzima comercial para purificarla, puesto que no está disponible en el mercado. Todas estas dificultades hicieron que no se pudiera cumplir con el objetivo de determinar directamente el coeficiente de control de la GS en este trabajo.

CONCLUSIONES

- 1) Se observaron 2 tendencias estacionales para la actividad endógena de la PGM de oocitos. En las mediciones hechas entre septiembre y enero la actividad medida fue de $41 \pm 3,1$ mU por oocito. Sin embargo, entre los meses de abril y agosto la actividad medida decayó a $9,4 \pm 0,93$ mU por oocito. La PGM es la enzima que presenta mayor actividad en la vía directa de síntesis de glicógeno.
- 2) El pH óptimo para la PGM resultó ser de 7,5.
- 3) La cinética para el sustrato glucosa-1-P es hiperbólica, con una $K_{m \text{ app}}$ de 0,16 mM.
- 4) El coeficiente de control medido para la PGM en la vía directa de síntesis de glicógeno resultó ser 0,19. Para la vía de las pentosas-P, el coeficiente tuvo un valor de -0,09.
- 5) La actividad endógena de la GS en oocitos resultó ser igual a $0,7 \pm 0,03$ mU por oocito, independiente de la época del año en que se mide. Esta es una de las enzimas con menor actividad, apareciendo por debajo de la PGM y de la UDPG-PPasa, y superando sólo a la HK.
- 6) La actividad de GS en músculo es alrededor de 2,6 veces mayor que la actividad en oocito de rana.
- 7) De acuerdo con las determinaciones realizadas, en oocitos el porcentaje de actividad de la forma D de GS alcanza al 63 %, mientras que la forma I de GS corresponde a un 37 %.
- 8) Después de someter a la GS de músculo de rana a las cromatografías en DEAE-celulosa y en Sephacryl S-200, y considerando sólo a la fracción más pura eluida desde la columna de exclusión molecular, ésta alcanzó una actividad específica de 34,2 U/mg de proteína, y se logró una purificación de 684 veces, con un rendimiento del 0,28 %. Si se consideran todas las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl S-200, se logró una purificación de 200 veces, con un rendimiento del 5 %.

9) No fue posible concentrar la GS hasta el nivel requerido para los experimentos de microinyección.

10) El coeficiente de control para la GS en la vía directa de síntesis de glicógeno determinado indirectamente es igual a 0,2.

REFERENCIAS

Báez, M., Preller, A. y Ureta, T. (2003) Frog oocyte glycogen synthase: enzyme regulation under in vitro and in vivo conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* **413**, 9-16.

Beitner, R., Klein, S. y Nordenberg, J. (1982) The participation of glucose-1,6-diphosphate in the regulation of hexokinase and phosphoglucomutase activities in brains of young and adult rats. *Int. J. Biochem.* **14**, 195-199.

Bergamini, C., Buc, H. y Morange, M. (1977) Purification of muscle glycogen particles by glycerol-gradient centrifugation. *FEBS Lett.* **81**, 166-172.

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

Cadefau, J., Bollen, M. y Stalmans, W. (1997) Glucose-induced glycogenesis in the liver involves the glucose-6-phosphate- dependent dephosphorylation of glycogen synthase. *Biochem. J.* **322**, 745-750.

Camici, M., DePaoli-Roach, A. y Roach, P. J. (1984) Rabbit liver glycogen synthase. Purification and comparison of the properties of glucose-6-P-dependent and glucose-6-P-independent forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **259**, 3429-3434.

Chase, J. R., Rothman, D. L. y Shulman, R. G. (2001) Flux control in rat gastrocnemius glycogen synthesis pathway by in vivo $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ NMR spectroscopy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, 598-607.

Daugherty, J. P., Kraemer, W. F. y Joshi, J. G. (1975) Purification and properties of phosphoglucomutase from Fleischmann's yeast. *Eur. J. Biochem.* **57**, 115-126.

Davies, E. J., Tetlow, I. J., Bowsher, C. G., Emes, M. J. (2003) Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucomutase in wheat endosperm (*Triticum aestivum* L. cv. Axona). *J. Exp. Bot.* **54**, 1351-1360.

Dumont, J. N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* **136**, 153-180.

Fell, D. A. (1997) Understanding the Control of Metabolism. Portland Press, London, 1997.

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

Fernie, A. R., Roessner, U., Trethewey, R. N. y Willmitzer, L. (2001) The contribution of plastidial phosphoglucomutase to the control of starch synthesis within the potato tuber. *Planta* **213**, 418-426.

Ferrer, J. C., Favre, C., Gomis, R. R., Fernández-Novell, J. M., García-Rocha, M., de la Iglesia, N., Cid, E. y Guinovart, J. J. (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* **546**, 127-132.

Gurdon, J. B. (1974) The Control of Gene Expression in Animal Development. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 121-126

Higuera, J. C., Alape-Girón, A., Thelestam, M. y Katz, A. (2003) A point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene results in decreases of UDP-glucose and inactivation of glycogen synthase. *Biochem. J.* **370**, 995-1001.

Kacser, H. y Porteous, J. W. (1987) Control of metabolism: what do we have to measure?. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 5-14.

Kessi, E., Guixé, V., Preller, A. y Ureta, T. (1996) Glycogen synthesis in amphibian oocytes : evidence for an indirect pathway. *Biochem. J.* **315**, 455-460.

Martz, F., Wilczynska, M. y Kleczkowski, L. A. (2002) Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* **367**, 295-300.

Meléndez-Hevia, E., Riol-Cimas, J. M. y Torres, N. V. (1987) La teoría del control y su aplicación al metabolismo. *Anales de Química* **83**, 226-243.

Mersmann, H. J. y Segal, H. L. (1967) An on-off mechanism for liver glycogen synthetase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**, 1688-1695.

Prats, C., Cadefau, J.A., Cussó, R., Qvortrup, K., Nielsen, J.N., Wojtaszewski, J.F., Hardie, D.G., Stewart, G., Hansen, B.F. y Ploug, T. (2005) Phosphorylation-dependent translocation of glycogen synthase to a novel structure during glycogen resynthesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 23165-23172

Radojkovic, J. y Ureta, T. (1982) Regulation of carbohydrate metabolism in microinjected frog oocytes. *Arch. Biol. Med. Exp.* **15**, 395-405.

Schafer, J. R., Fell, D. A., Rothman, D. y Shulman, R. G. (2004) Protein phosphorylation can regulate metabolite concentrations rather than control flux: the example of glycogen synthase. *PNAS* **101**, 1485-1490.

Ureta, T., Fernández, W. Y., Centelles, J.J. y Cascante, M. (2000) In vivo measurements of control coefficients for hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* **475**, 145-149.

Ureta, T., Preller, A. y Kessi, E. (2001) Frog oocytes: a living test tube for studies on metabolic regulation. *IUBMB Life* **51**, 5-10.

