

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



Aplicación del análisis del control metabólico al estudio de la regulación de la síntesis de glicógeno *in vivo* en oocitos de *Caudiverbera caudiverbera* (Linneaus): Coeficiente de control para UDP-glucosa pirofosforilasa y glicógeno sintasa en la vía de síntesis de glicógeno

Christian Andrés Marcelo Wilson Moya

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Patrocinante:
Dra. María Antonieta Valenzuela P
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Directores de memoria:
Dra. Ana Preller Simmons
Dr Tito Ureta Aravena
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Santiago, Chile
Abril, 2008

A mi familia



**Yo, Catalina Wilson, Rodrigo Wilson jr, Rodrigo Wilson, Carmen Gutiérrez, César Wilson,
Marcela Moya, Bárbara Wilson, Juan Sangüesa, Marcela Wilson y Marcelo Wilson (de
izquierda a derecha)**

La Serena, 2008

AGRADECIMIENTOS

Todo comenzó gracias a las motivaciones y apoyo que me dieron mis padres al momento de tener inquietudes en la vida. Mi madre, Marcela Moya, es Tecnóloga Médica y siempre ha sido una fuente de inspiración en la elección de ser un científico. Su apoyo incondicional y fe en mí, me dio el valor para seguir lo que más me gusta, y así poder entender cómo funcionan las cosas.

En la educación media en el Liceo Experimental Manuel de Salas, en un curso electivo de biología y pasando el tema “Metabolismo”, mi madre, de sus antiguos apuntes de Tecnóloga médica me entregó lo que posteriormente sabría que era un *paper*, Organización del metabolismo: Localización subcelular de enzimas glicolíticas, Arch. Biol. Med. Exp. 18: 9-32 (1985).

El autor de este trabajo era el Dr. Tito Ureta. Me gustó muchísimo el artículo y pasó a ser mi sueño poder trabajar un día en algún tema relacionado con el metabolismo. Mejor si era con el autor del *paper*, de quién no sabía si estaba aún vigente. Entré a estudiar Bioquímica y supe que el Dr. Ureta aún estaba trabajando en investigación y más activo que nunca. Para que el Dr. Ureta me conociera y para no llegar repentinamente a su laboratorio, tomé el curso de Evolución Molecular, que él dicta anualmente. Como alumno, le pedí realizar una unidad de investigación en su laboratorio. Ahí comenzó mi paso por el laboratorio en el cual aún sigo trabajando feliz!. Allí conocí a la Dra. Ana Preller, pilar fundamental en mi trabajo de investigación. Su apoyo no ha cesado hasta el día de hoy, y su confianza me ha permitido avanzar sin dificultades. Además conocí a Dieguiño (Diego Quiroga), quién me guió en el laboratorio y con él que tuvimos gratos momentos de trabajo, como decía él...Obi Wan me enseñó bien.

Cómo no mencionar además a la Dra. María Antonieta Valenzuela, quién desde un principio me ha apoyado en mi desarrollo como persona y científico, y a quién considero una gran científica y mentora.

A Claudiña (Claudia Sanhueza), quién me ayudó muchísimo en el avance de la Tesis.

Muchas gracias a todos los integrantes del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular: a la Dra. Victoria Guixé, al Dr. Jorge Babul, al Dr. Ricardo Cabrera. A Mauricio Baez, Rapa (Andrés Caniuguir), Felipe Merino, Jaime Andrés Rivas Pardo, Freddy Navarro, Cesar Ramírez, Fernando Olate, Jazmín Herrera y don Mauricio Arriagada

Por supuesto agradezco a todos los integrantes de mi familia, que me han apoyado en todo. Y a todas las personas que de alguna forma han ayudado en el desarrollo de mi tesis. Muchas Gracias a todos!!

ABREVIATURAS

APS:	Persulfato de amonio
CZE:	Capillary zone electrophoresis
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
UGPasa:	Uridin-difosfoglucosa-pirofosforilasa

INDICE GENERAL

	pág.
Agradecimientos	III
Abreviaturas	IV
Indice General	V
Indice de Materias	VI
Indice de Tablas	VIII
Indice de Figuras	IX
Resumen	XI
Abstract	XIII

INDICE DE MATERIAS

pág.

I	Introducción	
1.1	Análisis del control metabólico.....	
1.2	El oocito de rana	
1.3	Vías metabólicas para la síntesis del glicógeno	
1.4	La enzima UGPasa.....	
1.5	Estudios preliminares realizadas en nuestro laboratorio	
II	Hipótesis de trabajo y objetivos	
2.1	Hipótesis	
2.2	Objetivos	
III	Materiales y métodos	
3.1	Reactivos	
3.2	Animales.....	
3.3	Obtención de células	
3.4	Medición de la actividad de HK	
3.5	Medición de la actividad de PGM	
3.6	Medición de la actividad de UGPasa	
3.7	Medición de la actividad de GS	
3.8	Microinyección: Microinyección de enzimas y sustratos.....	
3.9	Preparación de las soluciones radiactivas para inyectar	
3.10	Variación de la actividad endógena de UGPasa.....	
3.11	Variación de la actividad endógena de GS	
3.12	Cuantificación del CO ₂	
3.13	Obtención de glicógeno	
3.14	Determinación de proteínas	
3.15	Determinación de la identidad de secuencia entre UGPasa de <i>Saccharomyces</i>	

cerevisiae y UGPasa de *Xenopus laevis*

IV Resultados

4.1 Métodos de medida.....

4.2 Caracterización parcial de la UGPasa de oocitos de rana.....

4.3 Coeficiente de control de la UGPasa.....

4.4 Coeficiente de control de la GS.....

V Discusión.....

5.1 Caracterización parcial de la UGPasa de oocitos de rana.....

5.2 Coeficiente de control de la UGPasa de oocitos de anfibio.....

5.3 Coeficiente de control de la GS de oocitos de anfibio.....

V Conclusiones

VI Referencias

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Actividad endógena de las enzimas participantes en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos	
Tabla 2. Enzimas de la vía directa de síntesis de glicógeno presentes en la enzima comercial Sigma.	
Tabla 3. Purificación de la enzima comercial de Sigma	
Tabla 4. Comparación entre la actividad de UGPasa inyectada y la medida dentro del oocito	

INDICE DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Aumento de la actividad de la UGPasa en función de la concentración de enzima....	
Figura 2. Actividad de la UGPasa en función de la concentración de enzima auxiliar.....	
Figura 3. Curva de calibración para UDP-glucosa	
Figura 4. Perfiles de elución de nucleótidos.....	
Figura 5. Curva de concentración de enzima	
Figura 6. Curva de progreso para UGPasa	
Figura 7. Efecto del pH sobre la actividad de la UGPasa	
Figura 8. Efecto de la concentración de UDP-glucosa sobre la actividad de UGPasa.....	
Figura 9. Efecto de la concentración de PP_i sobre la actividad de UGPasa	
Figura 10. Estabilidad de la UGPasa en el tiempo	
Figura 11. Comparación de secuencias de la UGPasa de levadura y de <i>Xenopus</i>	
Figura 12. Electroforesis de UGPasa comercial en gel poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes	
Figura 13. Purificación de UGPasa comercial Sigma	

Figura 14. Electroforesis de UGPasa purificada en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes

Figura 15. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía directa de síntesis de glicógeno

Figura 16. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía de las pentosas-P

Figura 17. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía indirecta de síntesis de glicógeno

Figura 18. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía de las pentosas-P

Figura 19. Efecto de la glc-6-P sobre la GS

Figura 20. Coeficiente de control para la GS en la vía directa de síntesis de glicógeno

RESUMEN

Tradicionalmente se ha abordado el estudio del control del metabolismo analizando las propiedades de los componentes de un sistema (enzimas, transportadores y otros) aislados del sistema completo. Durante las dos últimas décadas se han desarrollado algunas teorías para analizar el comportamiento de sistemas metabólicos completos con una aproximación sistémica, entre ellas la llamada *análisis del control metabólico*. Esta teoría considera los sistemas metabólicos como un todo; así, la respuesta del flujo original (δJ) a un pequeño cambio en la actividad de una enzima (δe) será entonces consecuencia de todas las variaciones de las concentraciones de intermediarios. Esta respuesta puede ser cuantificada por el *coeficiente de control del flujo*. En este trabajo se intentó determinar qué grado de control ejercen en la regulación del flujo de la vía directa de síntesis de glicógeno las enzimas UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa) y glicógeno sintasa (GS), usando como modelo experimental los oocitos en estadio VI de rana *Caudiverbera caudiverbera*.

UGPasa cataliza la reacción $UTP + \text{glucosa-1-P} \rightleftharpoons \text{UDP-glucosa} + \text{PPi}$. Ésta es una reacción que se encuentra en todos los organismos hasta ahora estudiados. Además de su función clave en la síntesis de disacáridos y polisacáridos, la enzima es esencial en la síntesis de la parte carbohidrato de glicolípidos, glicoproteínas y una variedad de metabolitos secundarios.

La actividad de UGPasa en extractos crudos de oocitos de *C. caudiverbera* se midió en el sentido de la formación de UDP-glucosa por electroforesis capilar. Las corridas se realizaron en un capilar no protegido de 57 cm de longitud y 50 μm de diámetro, a un voltaje de 22 kV. La señal del nucleótido se determinó a 254 nm. Cuando se aplicó el método para medir la actividad de la enzima en extractos crudos se obtuvo una curva de tiempo lineal durante un tiempo experimental apropiado. La reacción reversa se midió por el método espectrofotométrico, acoplando y cuantificando la formación de NADPH a 340 nm.

La actividad endógena de la enzima en oocitos resultó ser alrededor de 12 mU/oocito. La enzima presenta actividad máxima a pH 8,5. En relación a las constantes cinéticas para los sustratos de la reacción reversa, se encontró que la enzima tiene cinética sigmoidea para pirofosfato, con un $K_{0,5}$ de alrededor de 460 μM y un n_H mayor que 2,0. La cinética para UDP-glucosa es hiperbólica, con una $K_{m_{app}}$ de 50 μM .

Para la determinación del coeficiente de control de la enzima se procedió a inyectar en los oocitos cantidades crecientes de UGPasa pura. Se usó la enzima comercial de Sigma. Dado que ésta

contenía impurezas, se procedió a purificarla por medio de una columna de exclusión molecular. La enzima microinyectada en los oocitos permaneció activa durante el tiempo que duraban los experimentos. El coeficiente de control para la enzima UGPasa en la vía directa de síntesis de glicógeno fué 0,15 y en la vía indirecta, 0,05.

La glicógeno sintasa ha sido considerada tradicionalmente la enzima reguladora de la síntesis de glicógeno, pero estudios *in vivo* han puesto en duda esta afirmación. No existe enzima comercial disponible y no fue posible obtener enzima pura en la concentración adecuada para la microinyección. Como alternativa se procedió a la activación de la enzima por medio de glucosa-6-P. Los experimentos para determinar el efecto de la glucosa-6-P sobre la GS se realizaron microinyectando diferentes concentraciones de glucosa-6-P. Después de 8 min se procedió a la microinyección de UDP-[U-³H]glucosa 3 mM. Después de 12 min de incubación, se midió la radiactividad en glicógeno. La activación máxima de la enzima fue entre 2 y 3 veces a 2 mM de glucosa-6-P inyectada. El efecto del éster fue transitorio, siendo máximo entre 5 a 10 min. Para la determinación del coeficiente de control se microinyectaron diferentes concentraciones de glucosa-6-P. Después de 8 min de incubación los oocitos recibieron [U-¹⁴C]glucosa (6 nmoles). Después de 12 min incubación, se midió la radiactividad en glicógeno. El coeficiente de control para GS en la vía directa de síntesis de glicógeno fue igual a 0,01.

Los coeficientes de control de las otras enzimas de la vía han sido previamente determinados en el laboratorio. Para hexoquinasa resultó ser de 0,6 y para fosfoglucomutasa de 0,2. Según el teorema de la suma, la suma de los coeficientes de control de todas las enzimas en una vía metabólica es igual a 1.

Para el caso de la síntesis de glicógeno, la suma de los coeficientes de control de las enzimas en la vía directa en oocitos de anfibio fue 0,96. Esta es la primera vez que se determinan todos los coeficientes de control de una vía metabólica completa en un sistema *in vivo*.

ABSTRACT

Traditionally metabolic control and regulation has been studied by analysing the properties of the system components (enzymes, transporters and others) isolated from the whole system. During the last two decades, new proposals have emerged to analyze the behaviour of complete metabolic systems with a systemic approximation. Among them is the so called *Metabolic Control Analysis*. This approach considers the metabolic system as a whole; thus, the response of the original flux (δJ) to a small change in the activity of one enzyme (δe) will be then the consequence of all the variations of the intermediate concentrations. This response may be quantified by the *flux control coefficient*. The aim of this work was to determine the involvement of the enzymes UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) and glycogen synthase (GS) on the control of the flux through the direct path way for glycogen synthesis. Oocytes stage VI from *C. caudiverbera* were used as an *in vivo* experimental model.

UGPase catalyzes the reaction $UTP + \text{glucose-1-phosphate} \rightleftharpoons \text{UDP-glucose} + \text{PPi}$. This is a reaction found in all the organisms so far studied. Besides its key function in the synthesis of disaccharides and polysaccharides, the enzyme is essential in the synthesis of the carbohydrate part of glycolipids, glycoproteins and a variety of secondary metabolites.

The activity of UGPase in crude extracts from *C. caudiverbera* oocytes was measured in the forward formation of UDP-glucose by capillary electrophoresis. Separations were performed in a non protected capillary of 57 cm long and 50 μm diameter, at a voltage of 22 kV. The signal of the nucleotide was determined at 254 nm. When the method was applied to measure the enzyme activity in crude extracts, a linear time curve was obtained during an appropriate experimental time. The reverse reaction was measured by the spectrophotometric method, coupling and quantitating the formation of NADPH at 340 nm.

The endogenous activity of the enzyme in oocytes was about 12 mU/oocyte. The enzyme presents maximum activity at pH 8,5. In relation to the kinetic constants for the substrates of the reverse reaction, it was found that the enzyme has sigmoidal kinetics for pyrophosphate, with a $K_{0,5}$ of about 460 μM and a n_H higher than 2.0. The kinetic for UDP-glucose is hyperbolic, with a $K_{m_{app}}$ of 50 μM .

To determine the control coefficient of the enzyme, increasing quantities of pure commercial UGPase, were microinjected into the oocytes. Because the enzyme was not homogenous, it was purified by molecular exclusion. The microinjected enzyme inside the oocytes remained active during the time of the experiments. The control coefficient for UGPase in the direct path way for glycogen synthesis was 0.15 and 0,05 in the indirect way.

Glycogen synthase has been traditionally considered the regulatory enzyme of glycogen synthesis, but studies *in vivo* have questioned this statement. There is no commercial enzyme available and it was not possible to obtain pure enzyme in the proper concentration for microinjection in our laboratory. As an alternative, activation of the enzyme by glucose-6-P was chosen. The experiments to determine the effect of glucose-6-P on GS were carried out by microinjecting into the oocytes different concentrations of glucose-6-P. After 8 min, microinjection of 3 mM UDP-[U-³H]glucose was performed. After 12 min incubation, the radioactivity on glycogen was measured. The maximum activation of the enzyme was between 2-3 times at 2 mM glucose-6-P. The effect of the ester was temporary, being maximum between 5 to 10 min. To determine the control coefficient into the cells, different concentrations of glucose-6-P were microinjected . After 12 minutes incubation, the radioactivity in glycogen was measured. The control coefficient for GS in the direct pathway for synthesis glycogen was 0.01.

The control coefficient of the other enzymes of the pathway have been previously determined in the laboratory. For hexokinase it was 0.6 and for phosphoglucomutase, 0.2. According to the summation theorem, the sum of the control coefficients of all the enzymes involved in a metabolic path is equal to 1. In the case of glycogen synthesis pathway, the sum of the control coefficients of the enzymes in the direct route in amphibian oocytes was 0.96. This is the first time that all control coefficients for a complete metabolic pathway are determined in a system under *in vivo* conditions.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Análisis del control metabólico

Tradicionalmente se ha abordado el estudio del control del metabolismo analizando las propiedades de los componentes de un sistema (enzimas, transportadores y otros) aislados del sistema completo. En este enfoque suele usarse un modelo que postula que la velocidad del flujo de una vía metabólica específica está dada por una enzima particular, llamada la enzima limitante o marcapaso. Por lo tanto, si se quiere modificar la velocidad del flujo, se manipula esta enzima, dejando de lado el comportamiento global de la vía metabólica.

Durante las dos últimas décadas se han desarrollado algunas teorías para analizar el comportamiento de sistemas metabólicos de manera sistémica, entre ellas la llamada *análisis del control metabólico*. Esta aproximación fue formulada originalmente en los trabajos de Kacser y Burns (1973) y Heinrich y Rapoport (1974). Los postulados de este análisis se pueden resumir en las siguientes generalizaciones (Kacser y Porteus, 1987; Meléndez-Hevia et al., 1987):

- a) el control del flujo se distribuye en todos los componentes enzimáticos de la vía.
- b) varias enzimas pueden ejercer control significativo del flujo
- c) la distribución del control puede variar con el cambio del estado metabólico de la célula o por cambios en las condiciones del experimento.

Esta teoría considera los sistemas metabólicos como un todo, donde la respuesta del flujo original (δJ) a un pequeño cambio en la actividad de una enzima (δe) será entonces consecuencia de todas las variaciones de las concentraciones de intermediarios. Esta respuesta puede ser cuantificada por el *coeficiente de control del flujo* (Kacser y Porteus, 1987; Cornish-Bowden, 2002).

Si C_e^J es el coeficiente de control, J es el flujo en estudio y e es la actividad de la enzima en particular,

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

La ecuación puede reordenarse de la siguiente manera:

$$C_e^J = \frac{\delta J}{\delta e} \circ \frac{e}{j}$$

El coeficiente de control del flujo queda definido como la tangente a la curva de flujo ($\delta J / \delta e$) *versus* la concentración de la enzima. Esta definición es igual a :

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

Según esta última expresión, el coeficiente de control de flujo es la pendiente de la tangente en un gráfico de ln del flujo *versus* el ln de la cantidad de la enzima.

El control del flujo puede ser compartido cuantitativamente por todas las enzimas de la vía. Estudios rigurosos de varios sistemas metabólicos muestran que la suma de los coeficientes de control de flujo de las enzimas participantes en una vía es igual a 1 (teorema de la suma , [Kacser y Porteus, 1987; Cornish-Bowden, 2002]).

El análisis del control metabólico ha resultado ser una concepción poderosa para entender la coordinación celular y la conexión entre procesos de variado tipo que ocurren en la célula en tiempos y circunstancias diferentes, ya que analiza sistemas completos.

Para estudiar el control del flujo en una vía determinada y calcular los coeficientes de control de las enzimas participantes es necesario entonces variar la actividad de una enzima en particular y analizar el efecto de esta perturbación sobre el flujo. En este trabajo se estudiará *in vivo* la regulación del flujo en la vía directa de síntesis de glicógeno. El sistema experimental elegido corresponde a los oocitos de rana. Para modificar la actividad endógena de la enzimas a estudiar, se microinyectarán cantidades variables de una determinada enzima, o bien se activará la enzima endógena por microinyección de un modificador alósterico.

1.2.- El oocito de rana

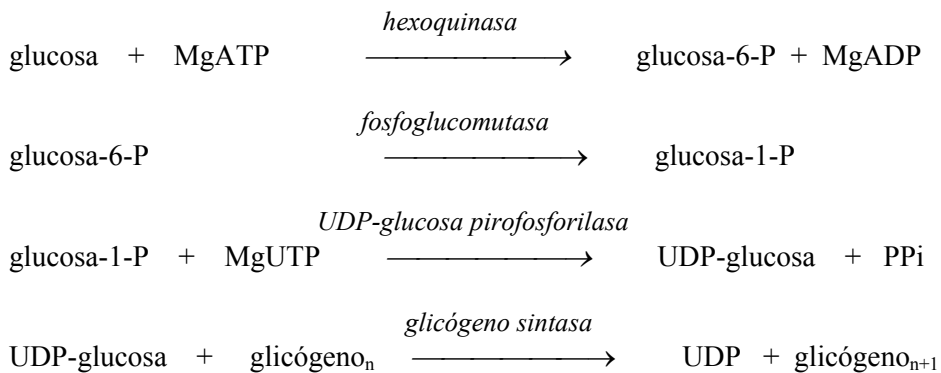
Los oocitos de rana son un modelo ideal para el estudio del metabolismo de la glucosa. El gran tamaño de los oocitos (2 mm de diámetro y 3 μ l de volumen) permite microinyectar fácilmente enzimas, glucosa y otros metabolitos (Radojkovic y Ureta, 1982; Ureta et al., 2001). Permite además hacer mediciones metabólicas en células individuales. Mediante microinyección es posible

alterar la actividad de una sola enzima, lo que permite la medición del coeficiente de control correspondiente (Ureta et al., 2000). Además, en trabajos previos del laboratorio se han descrito las condiciones óptimas para la medición de flujo en las vías de síntesis de glicógeno (Preller et al., 2007). Los oocitos en estadio VI (según la clasificación de Dumont, 1972) se obtuvieron de los ovarios de la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera*.

1.3.- Vías metabólicas para la síntesis del glicógeno

El glicógeno es la forma en que la glucosa se almacena en las células animales como reserva energética. Los oocitos de rana metabolizan la glucosa preferentemente hacia la síntesis de glicógeno (95%) y alrededor de un 5% por la vía de las pentosas-fosfato (Ureta et al., 2001). Se ha demostrado que los oocitos sintetizan glicógeno tanto por la vía clásica o directa como por la vía indirecta; ambas vías operan simultáneamente en la misma célula (Kessi et al., 1996). La operación preferencial de una u otra vía depende de la concentración de glucosa disponible para la célula (Preller et al., 2007).

La vía directa de síntesis consta de las siguientes reacciones:



1.4.- La enzima UDP-glucosa pirofosforilasa

La UDP-glucosa pirofosforilasa (E.C. 2.7.7.9). Esta es una enzima clave en el metabolismo de carbohidratos, pues produce UDP-glucosa, precursor de oligo y polisacáridos en todos los eucariontes y procariontes estudiados. Esta enzima es regulada por diversos mecanismos a nivel de transcripción y traducción (Kleczkowski et al., 2005).

Se han desarrollado varios ensayos para la medición de la actividad enzimática, tanto en el sentido de la síntesis de UDP-glucosa como para la reacción reversa. Para ambos casos existe un ensayo espectrofotométrico. El método espectrofotométrico para medir la enzima en el sentido de la formación de UDP-glucosa, utiliza la UDP-glucosa deshidrogenasa como enzima auxiliar (Sowokinos et al., 1993). También se ha descrito un radioensayo, que utiliza glucosa-1-fosfato radiactiva como sustrato. El producto radiactivo UDP-glucosa es adsorbido en carbón y luego eluido para su cuantificación (Turnquist y Hansen, 1973). El primer método presenta las dificultades inherentes al uso de grandes cantidades de enzima auxiliar en extractos crudos. El segundo, presenta los problemas clásicos relacionados con la manipulación de radiactividad. La necesidad de contar con un método desprovisto de las limitaciones anteriores nos llevó a ensayar la actividad de la UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa) por electroforesis capilar.

1.5.- La enzima glicógeno sintasa

La enzima glicógeno sintasa (E.C. 2.4.1.11) cataliza la incorporación de glucosa en glicógeno a partir de UDP-glucosa. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en nuestro laboratorio, y se han comparado las actividades tanto *in vitro* como *in vivo* (Baez et al., 2003). La enzima en esas dos condiciones no presenta los mismos parámetros cinéticos.

Se ha descrito que la actividad de la enzima es regulada por diversos mecanismos. Uno de ellos es un mecanismo de fosforilación-desfosforilación, siendo la forma desfosforilada la activa en ausencia de glucosa-6-P, a diferencia de la fosforilada, que sólo es activa en presencia de ése metabolito (Mersmann y Segal, 1967). Otro es activación alostérica por glucosa-6-P. Ésta estimularía a la fosfatasa-1, que desfosforilaría a la GS y la activaría; además la glucosa-6-P produce un cambio conformacional en la enzima (Cadefau et al., 1997). Por último, se ha demostrado relocalización subcelular de la GS en presencia de glucosa-6-P (Fernández-Novell et al., 1992).

Recientemente se ha descrito un mecanismo regulatorio a través de degradación mediada por el proteosoma, y que sería dependiente de las proteína malina y laforina (Vilchez et al., 2007).

Por el hecho de ser una enzima muy regulada, se ha pensado que la GS va a ejercer un gran control en la vía de síntesis de glicógeno. Estudios realizados por Shulman et al. (1995) y Ureta et al.

(2001) indican que es la HK y no la GS la que ejerce un mayor control en la vía de síntesis de glicógeno.

1.6.- Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio

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 *C. caudiverbera*. El valor encontrado fue de 0,6, confirmando el hallazgo de Ureta et al. (2000) en oocitos de *Xenopus laevis*. Este resultado sugiere que la hexoquinasa ejercería el mayor control sobre el flujo de esta vía metabólica. El 0,4 restante debiera distribuirse entre las demás enzimas de la vía. En la Tesis de pregrado de Diego Quiroga (Quiroga, 2006), se determinó el coeficiente de control para la fosfoglucomutasa, resultando igual a 0,2. En dicha Tesis además se realizó una caracterización parcial de las enzimas PGM y GS. Falta determinar el coeficiente de control de la UGPasa y de la GS, además de conocer las características cinéticas de la UGPasa puesto que aún no han sido determinadas en oocitos de anfibio.

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Hipótesis

El control que ejercen la UGPasa y la GS sobre la velocidad del flujo en la síntesis del glicógeno por la vía directa, es muy bajo o nulo, lo que se refleja en un coeficiente de control muy pequeño.

2.2.- Objetivos

Objetivo general

Determinar qué grado de control ejerce en la regulación del flujo de la vía directa de síntesis de glicógeno las enzimas UGPasa y GS, usando como modelo experimental oocitos estadio VI de rana *C. caudiverbera*.

Objetivos específicos

- Determinar la actividad endógena de UGPasa presente en oocitos estadio VI.
- Realizar una caracterización preliminar de la enzima de oocitos: pH óptimo, y determinación de las K_m aparente para los sustratos UDP-glucosa y pirofosfato.
- Medir el coeficiente de control del flujo metabólico en la vía directa e indirecta de síntesis de glicógeno para la UDP-glucosa pirofosforilasa.
- Medir el coeficiente de control del flujo metabólico en la vía directa de síntesis de glicógeno para la glicógeno sintasa.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Reactivos.

Glucosa-6-fosfato, glucosa-1,6-bisP, DTT, PPO, POPOP, estándares de peso molecular, Sephacryl S-200, Sephacryl S-500, UDP-glucosa y UDP-glucosa pirofosforilasa fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Tris y NaCl, fueron obtenidos de Winkler Ltda. La enzima PGM se obtuvo de Roche. EDTA, acrilamida, bisacrilamida, y TEMED fueron obtenidos de Gibco BRL. La DEAE-celulosa (DE 52) de Whatman. $[U^{14}C]$ glucosa y $[U^{14}C]$ glucosa-1-fosfato de Amersham UK.

3.2.- Animales.

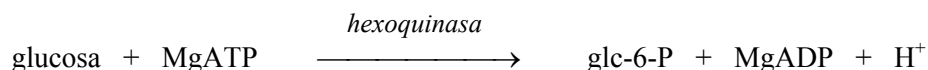
Ejemplares de la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* se adquirieron de un proveedor comercial y se mantuvieron en el laboratorio en un estanque con agua potable, alimentadas semanalmente con hígado de vacuno (Preller, 1988).

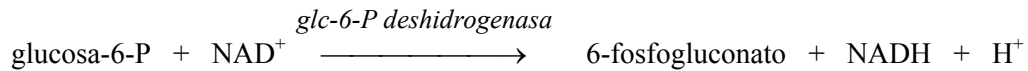
3.3.- Obtención de células.

Se utilizaron oocitos de *C. caudiverbera* en estadio VI de maduración de acuerdo con el criterio de clasificación de Dumont (1972). Inmediatamente de extraído, el ovario se colocaba en solución salina de Barth (NaCl 88 mM, CaCl₂ 0,41 mM, KCl 1mM, NaHCO₃ 2,4 mM, Mg₂SO₄ 0,82 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 7,6) a temperatura ambiente. Antes de ser utilizados, los oocitos se separaban utilizando pinzas finas, procurando seleccionar células de tamaño similar. Los oocitos seleccionados se depositaban en una placa con solución de Barth para su posterior utilización (Báez, 2000).

3.4.- Medición de la actividad de la HK

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 glc-6-P, de acuerdo al siguiente esquema:

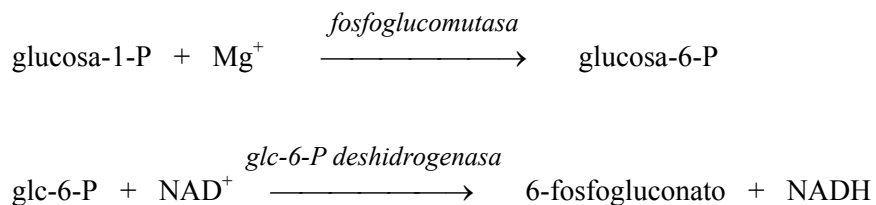




La velocidad de formación del NADH se registraba en un espectrofotómetro Unicam UV2-100 a 28°. El medio de reacción tenía un volumen final de 1 ml, y contenía los siguientes reactivos (concentraciones finales): Tris-HCl 80 mM (pH 7,5), KCl 100 mM, MgCl₂ 12,6 mM, ATP 5 mM, glucosa 1 mM, EDTA 1,6 mM, NAD⁺ 0,5 mM y 0,5 U de glc-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°.

3.5.- Medición de la actividad de la PGM

Una cierta cantidad de oocitos se homogeneizaban en un Potter Elvehjem usando amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8,0 en una proporción 1 : 3 (v/v) (volumen de oocitos/volumen de amortiguador). Se consideró que cada oocito tenía un volumen de 3 μl, según lo descrito en trabajos previos de Ureta et al., (2001). Luego se centrifugaba la muestra durante 1 h a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman modelo L5-50 B rotor Ti 50. Se obtenía un líquido sobrenadante en el cual se determinaba 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:



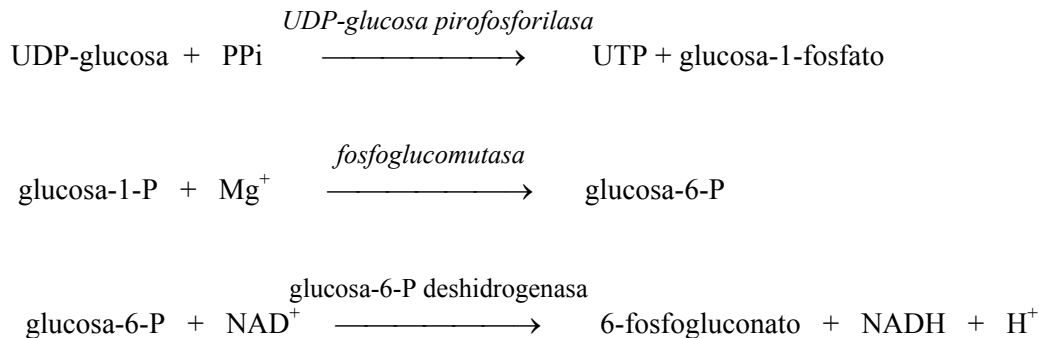
La velocidad de formación del NADH se registraba en un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8453 a 24°. El medio de reacción tenía un volumen final de 1 ml, y contaba con los siguientes reactivos (concentraciones finales): imidazol 30 mM pH 7,5, MgCl₂ 3,3 mM, NAD⁺

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 μ mol de glc-6-P en 1 min a 24°.

3.6.- Medición de la actividad de la UGPasa.

Método espectrofotométrico.

Se modificó el método espectrofotométrico descrito por Martz et al. (2002) para la medición de la actividad de UGPasa en la reacción reversa. El ovario completo se homogeneizaba en una proporción 1/2 (p/v) con solución salina de Barth. El medio de ensayo contenía: UDP-glucosa a una concentración saturante de 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NADP⁺ 0,6 mM, pirofosfato de sodio 3 mM, glucosa 1,6-bisP 0,02 mM, BICINE 50 mM (pH 8,55), fosfoglucomutasa 0,5 U, glucosa-6-P-deshidrogenasa 5,6 U y alícuotas de líquido sobrenadante. Se cuantificaba la aparición de NADPH a 340 nm en un espectrofotómetro UNICAM, modelo UV 2. Una unidad de UGPasa se define como la cantidad de enzima requerida para reducir 1 μ mol de NADP⁺/min.



Electroforesis capilar

Con el objetivo de medir la actividad en la dirección de la síntesis de UDP-glucosa, el ensayo comenzaba al homogeneizar los oocitos en un tubo eppendorf (utilizando un bastón de vidrio con punta esmerilada) en 100 μ l del siguiente medio de ensayo: BICINE 50 mM (pH 8,55), UTP 8 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa-1-fosfato 10 mM. Después de incubar a 30° durante 10 min, la reacción se detenía calentando a 100° por 5 min. Posteriormente se centrifugaba 30 min a 14.000 rpm y 50 μ l del líquido sobrenadante se colocaban en un tubo eppendorf de 0,7 ml para cuantificar UGPasa por electroforesis capilar.

Para asegurar la linealidad del método en muestras provenientes de extractos de oocitos, diferentes cantidades de células se homogeneizaron como se describió anteriormente y se incubaron 10 min a 30° deteniéndose la reacción como se describió previamente.

Con el objeto de detectar señales de otros nucleótidos que podrían afectar la medición, se sometieron al mismo procedimiento soluciones de los nucleótidos UTP, UDP, UMP, ATP, ADP, AMP, GTP, CTP, y UDP-glucosa.

Se utilizó el procedimiento descrito por Wilson et al. (2007) para la determinación de nucleótidos, que usa el modo de separación CZE (capillary zone electrophoresis). Las determinaciones se realizaron en un instrumento Waters, usando un capilar no protegido de 57 cm de largo con 50 µm de diámetro, y un voltaje de 22 kV. La señal del nucleótido se determinó a 254 nm.

La mejor resolución se alcanzó con amortiguador tetraborato 20 mM (pH 9,2), a una temperatura de 25°, alcanzando una corriente de alrededor de 36 µA.

El capilar se regeneraba durante 5 min con NaOH 0,5 M y 5 min con H₂O desionizada cada vez que se iba a medir una muestra.

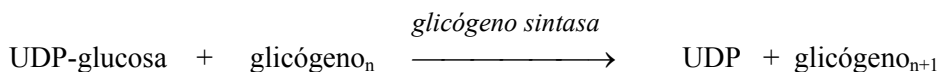
3.7.- Medición de la actividad de la GS

Una vez obtenidos los oocitos se homogeneizaban en un Potter Elvehjem usando amortiguador A, en una proporción 1 : 2,5 (p/v). El amortiguador A 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 centrifugaba la muestra durante 15 min a 10.000 rpm en una centrífuga Sorvall modelo RC-5 rotor 5534. En el líquido sobrenadante obtenido se determinaba 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 µmol de UDP-glucosa a glicógeno en 1 min a 32°. El ensayo se llevó a cabo según lo descrito por Báez et al., (2003). Se agregaban 50 µl del líquido sobrenadante del homogeneizado de oocitos a tubos eppendorf que contenían en un volumen de 25 µl 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 agregaba a cada tubo 500 µl de KOH 30% y luego se incubaba por 30 min a 100°. Posteriormente, el contenido de cada tubo se vertía a

tubos de vidrio y se adicionaban 100 μ l de Na₂SO₄ 2%, 40 μ l de glicógeno (5 mg/ml) y 2 ml de etanol 96%, y se dejaba precipitar el glicógeno durante toda la noche. Al día siguiente, los tubos se centrifugaban a 5.000 rpm por 2,5 min en una centrífuga Sorvall modelo RC-5 rotor 5534. El pellet resultante era resuspendido en 2 ml de agua y reprecipitado por 8 hrs con 6 ml de etanol 96%. Finalmente, los tubos se centrifugaban nuevamente a 5.000 rpm por 2,5 min obteniéndose un nuevo pellet, el que se resuspendía con 1,2 ml de agua. Para medir la radiactividad, se tomaban alícuotas de 1 ml, las cuales se colocaban en viales y se mezclaban 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, los oocitos se homogenizaban (1, 2, 3 y 4 oocitos por tubo) usando un vástago de vidrio. De aquí en adelante se repitió el protocolo descrito anteriormente.



3.8.- 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.

3.9.- Preparación de las soluciones radiactivas para inyectar

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

3.10.- Variación de la actividad endógena de UGPasa

Dado que la enzima comercial Sigma liofilizada no resultó ser homogénea por SDS PAGE, y que además contenía una importante contaminación de hexoquinasa, fue necesario purificarla. Para la purificación de la enzima se utilizó una columna de Sephacryl S-200 (2,1 x 73 cm). Se tomaban

alrededor de 992 μg de enzima directa del frasco, se le agregaba 100 μl de glicerol y 200 μl de amortiguador de corrida (100 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM KCl). La muestra se colocaba en la columna previamente equilibrada con amortiguador de corrida. En el eluido se cuantificó la actividad enzimática de hexoquinasa y UGPasa. Los tubos con actividad de UGPasa se juntaron y se concentraron para una posterior recromatografía en la misma columna de Sephacryl S-200. La enzima recromatografiada se concentró a un volumen de 100 μl y se le agregó 100 μl de glicerol y 200 μl de amortiguador de corrida. El conjunto de tubos con actividad enzimática se concentró para su posterior microinyección en los oocitos.

La enzima concentrada se diluía en un volumen adecuado de H_2O desionizada para obtener las concentraciones de UGPasa 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 con solución salina de Barth. Después de inyectar la enzima, los oocitos se dejaban 1 h en solución Barth y posteriormente se microinyectaban con 6 nmoles de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glucosa, condición en la cual prevalece la vía directa de síntesis de glicógeno. Después de incubar 20 min bajo una atmósfera de O_2 con agitación continua y capturando el CO_2 desprendido, se procedía a aislar el glicógeno.

3.11.- Variación de la actividad endógena de la GS

Dado que no se contaba con enzima pura en las concentraciones requeridas para la microinyección, se decidió activar la GS intracelular microinyectando diferentes concentraciones del activador alostérico glucosa-6-P. Grupos de 10 oocitos se microinyectaban con glucosa-6-P 2 mM (0,67 mM intracelular). Después de 8 min, se microinyectaban $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glucosa 6 nmoles. Luego de incubar por 12 min, bajo una atmósfera de O_2 con agitación continua, se procedió a aislar el glicógeno.

3.12.- Cuantificación de CO_2

Se realizó según lo descrito por Ureta et al. (2000). Grupos de 5 oocitos se incubaban después de la microinyección de glucosa, en 120 μl de Barth durante 20 min a temperatura ambiente en tubos sellados. Estos tubos tenían un flujo continuo de oxígeno. El CO_2 que se liberaba se recolectaba en viales que tenían 600 μl de NaOH 0,3 N y gotas de Tritón X 100. A estos viales se les agregaba 4 ml de líquido de centelleo y 300 μl de agua, y se contaban en contador de centelleo marca PACKARD modelo 1600 TR.

3.13.- Obtención de glicógeno.

Para medir la incorporación de glucosa marcada en glicógeno (flujo de la vía), cada uno de los oocitos incubados durante 20 min como se describió anteriormente fue digerido en un tubo eppendorf individual que tenía 200 µl de KOH 30 %, durante 30 min a 100°. Luego la mezcla se colocó sobre pequeños cuadrados de papel ET31 Whatman filter, previamente numerados, que tienen la propiedad de retener al glicógeno. Se esperó que cada papel se secase y se dejaron toda la noche en alcohol 66 % a - 20°. Los papeles se lavaron 3 veces con alcohol 66 % a temperatura ambiente, con agitación durante 30 min. Los papeles se secaron sobre toalla de papel, y luego se sometieron a luz infrarroja. Finalmente se colocaron en viales con 4 ml de líquido de centelleo, y se contó la radiactividad en un contador de centelleo marca PACKARD modelo 1600 TR (Ureta et al., 2000).

3.14.- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de las distintas preparaciones enzimáticas fue medida por el método de Bradford (Bradford, 1976). En algunos casos se siguió la concentración de proteínas por absorbancia a 280 nm.

3.15.- Determinación de la identidad de secuencia entre UGPasa de *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) y UGPasa de *Xenopus laevis*.

El presente estudio utilizó el programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) para el alineamiento de secuencias de aminoácidos de UGPasa de levadura y de rana. Se utilizó el programa Bioedit como interfaz gráfica (Hall, 1999). Las secuencias se obtuvieron de Genbank con los siguientes números de acceso: AAH77213 (*Xenopus laevis*) y 2124302A (*Saccharomyces cerevisiae*).

IV.- RESULTADOS

4.1.- Métodos de medida.

Medición espectrofotométrica de la actividad de la UGPasa

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Martz et al. (2002) para la enzima de plantas. Se hicieron controles que permitieran validar el método para medir la actividad enzimática en un extracto de oocitos. Además, se verificó el pH al cual la actividad enzimática era óptima (ver caracterización parcial de la enzima). Es importante mencionar que las mediciones se realizaban el mismo día que se obtenía el extracto. La actividad de la enzima en el extracto celular se mantiene casi en un 100% después de una semana a 0°.

La figura 1 muestra la actividad de la UGPasa medida en función de la concentración de enzima. Se puede observar que hay un aumento lineal de la actividad de la UGPasa en función del volumen de líquido sobrenadante agregado. 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 mediciones retirando por separado cada uno de los reactivos necesarios para la reacción.

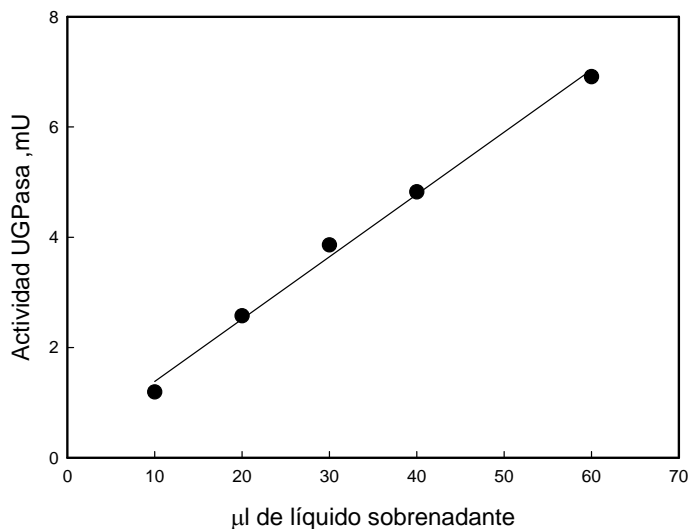


Figura 1. Actividad de la UGPasa en función de la concentración de enzima. La actividad de la enzima fue medida en el líquido sobrenadante obtenido después de centrifugar un homogeneizado de oocitos como se describe en Materiales y Métodos.

Es importante mencionar que este método usa como enzimas auxiliares la PGM y la glucosa-6-P deshidrogenasa. Se realizaron los controles que permitieran demostrar que estas enzimas en el volumen de líquido sobrenadante utilizado no fuesen limitantes. Para ello se dejó constante los volúmenes de líquido sobrenadante utilizados y se aumentó la cantidad de cada enzima auxiliar por separado. No se observaron cambios en el valor de la actividad enzimática de la UGPasa. El ensayo mide la enzima en el sentido de la reacción reversa (formación de glc-1-P). Se intentó realizar la medición espectrofotométrica de la enzima en la dirección de la síntesis de UDP-glucosa. El método utiliza la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa (UDPGDH). En la literatura se describen 2 métodos para medir la actividad de la UGPasa utilizando UDPGDH como enzima auxiliar (Aksamit y Ebner, 1972). Uno de ellos es el método *one step* (Aksamit y Ebner, 1972). Este método utiliza de 4 a 6 U de enzima acoplada (un frasco de enzima comercial contiene 2 U). Se intentó entonces disminuir la cantidad de la enzima acoplada. Para ello utilizamos 5 μ l de líquido sobrenadante de oocitos de rana (generalmente en la determinación espectrofotométrica por la vía indirecta se utilizan 20 μ l) y concentraciones crecientes de UDPGDH. Se observó que al aumentar la concentración de enzima auxiliar, aumentaba también la actividad de la enzima UGPasa, no llegando a una cantidad de enzima auxiliar adecuada para la medición (Figura 2).

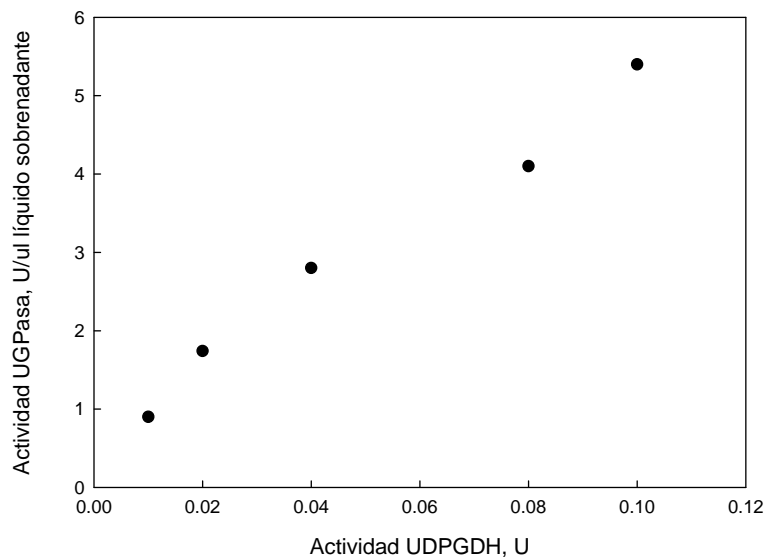


Figura 2. Actividad de la UGPasa en función de la concentración de enzima auxiliar. La actividad de la enzima fue medida en el líquido sobrenadante obtenido después de centrifugar un homogeneizado de oocitos como se describe en Materiales y Métodos. El medio de reacción estaba compuesto por: BICINE pH 8,55 50 mM; UTP 8 mM; $MgCl_2$ 10 mM; glucosa-1-P 10 mM; NAD^+ 6 mM; UGPasa (5 μ l de sobrenadante), y UDPGDH (distintas concentraciones). La reacción se comenzaba con UGPasa y se seguía espectrofotométricamente a 340 nm.

El segundo método consiste en incubar la enzima con UTP y glucosa-1-P radiactiva. Una vez que se detiene la reacción, la UDP-glucosa formada es adsorbida en carbón activado, luego se eluye y se mide la radiactividad (Carlson y Hansen, 1962). Éste método está descrito como gran consumidor de tiempo pero muy sensible (Turnquist y Hansen, 1973). Este procedimiento no fue probado, pero nos sirvió de base para desarrollar un método basado en el uso de electroforesis capilar para la medición de la enzima en la vía de formación de UDP-glucosa.

Determinación de la actividad de la UGPasa por electroforesis capilar en la dirección de la síntesis de UDP-glucosa

Antes de medir la actividad de la UGPasa por electroforesis capilar, se hizo una curva de calibración para el producto UDP-glucosa (Figura 3). Como se puede observar, la curva obtenida fue lineal hasta una concentración de 3 mM, que se eligió como la más alta puesto que la máxima concentración utilizada en los ensayos es 1 mM. Además se determinó el límite de detección del método, que resultó ser alrededor de 1 μ M. Como se puede utilizar un mínimo de 20 μ l de muestra para las mediciones, esta técnica permite medir pmoles de sustrato y producto.

Un control necesario para medir la actividad de la UGPasa por electroforesis capilar fue descartar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del producto a medir, ya que la reacción catalizada por la enzima se detenía calentando el medio de ensayo a 100° durante 5 min. La UDP-glucosa fue estable hasta 5 min a 100°.

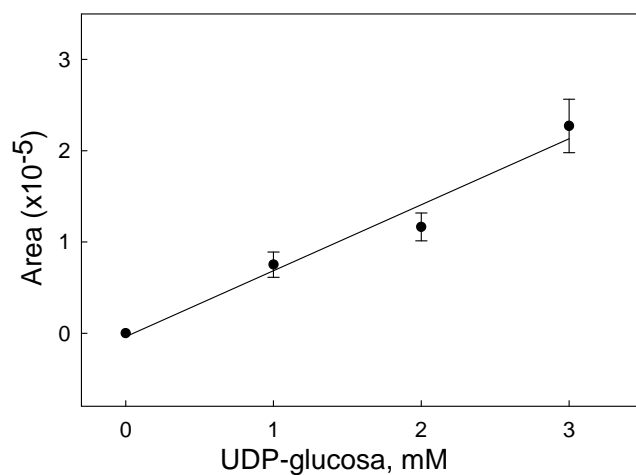


Figura 3. Curva de calibración para UDP-glucosa. Concentraciones crecientes de UDP-glucosa disuelta en el medio de ensayo, se sometieron a electroforesis capilar en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los resultados corresponden a 3 determinaciones \pm D.S.

Por otra parte, se obtuvieron los perfiles de elución de varios nucleótidos (Figura 4A); los resultados obtenidos indican que la UDP-glucosa y el UTP (producto y sustrato de la reacción enzimática, respectivamente), no se superponen entre sí ni con los otros nucleótidos usados.

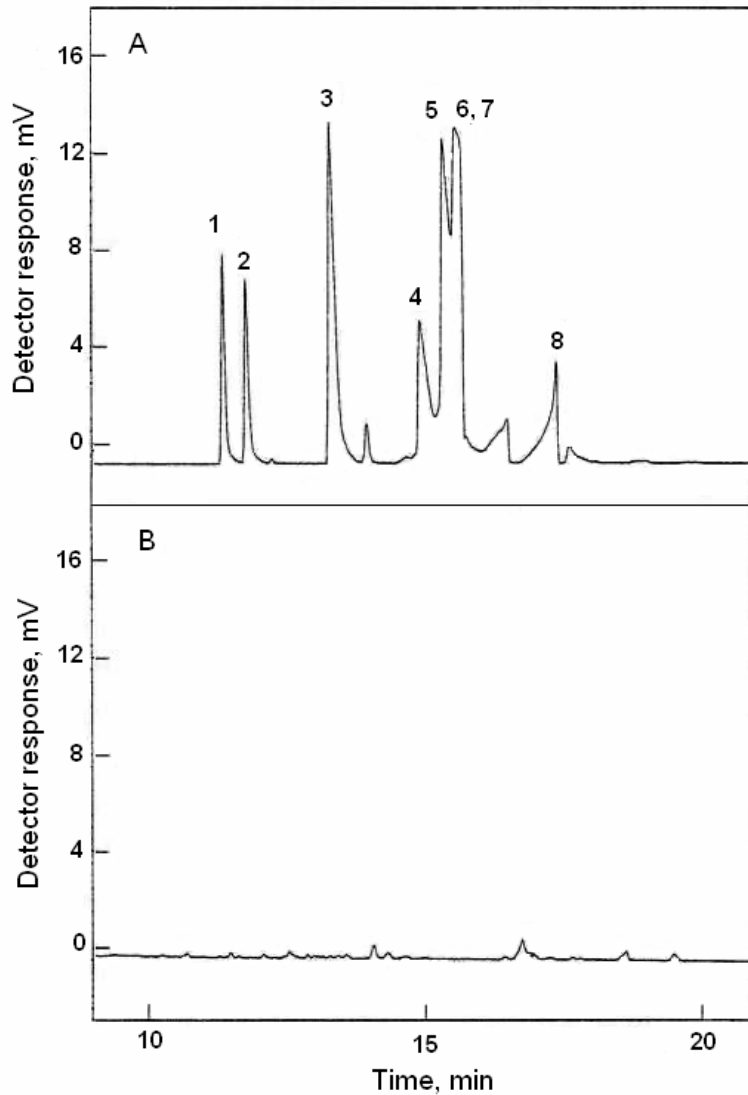


Figura 4. A. Perfiles de elución de nucleótidos. Una mezcla de nucleótidos se sometió a electroforesis capilar en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los números en la figura indican el nucleótido correspondiente y su tiempo de elución. 1: desconocido 2: UDP-glucosa, 3: AMP, 4:ADP, 5:CTP, 6:UMP, 7:ATP, 8:UDP **B.** Un homogenizado obtenido al resuspender 2 oocitos en la mezcla de reactantes para la medición de la enzima en ausencia de sustratos y 50 uL del líquido sobrenadante fueron medidos en CZE.

Además se determinó la presencia de nucleótidos en el líquido sobrenadante de oocitos. Se observó que no hay nucleótidos en la muestra que pudieran interferir con las mediciones de actividad enzimática (Figura 4B). La figura 5 muestra una curva de concentración de enzima que se obtuvo aumentando el número de oocitos en el medio de ensayo. Se puede apreciar que dicha curva se mantenía lineal hasta 8 oocitos, máximo ensayado.

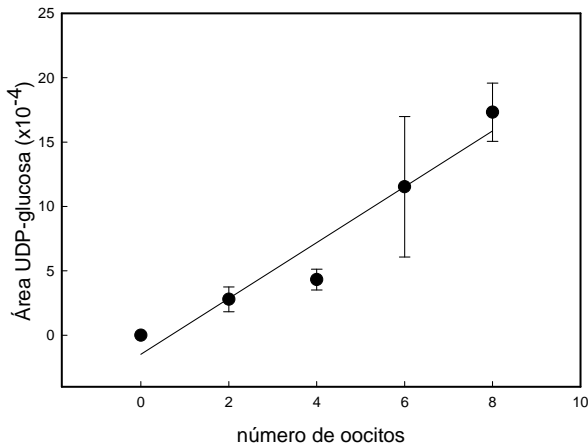


Figura 5. Curva de concentración de enzima. 2 o más oocitos de *C. caudiverbera* se homogeneizaron en medio de ensayo y se incubaron durante 10 minutos. Después de detener la reacción y centrifugar, 40 μ l de líquido sobrenadante se sometieron a electroforesis capilar. Los resultados corresponden al promedio de 3 determinaciones \pm E.S.

Por último se hizo una curva de progreso para la actividad de la UGPasa, cuyos resultados muestran que la reacción enzimática es lineal al menos hasta los 20 min de incubación (Figura 6).

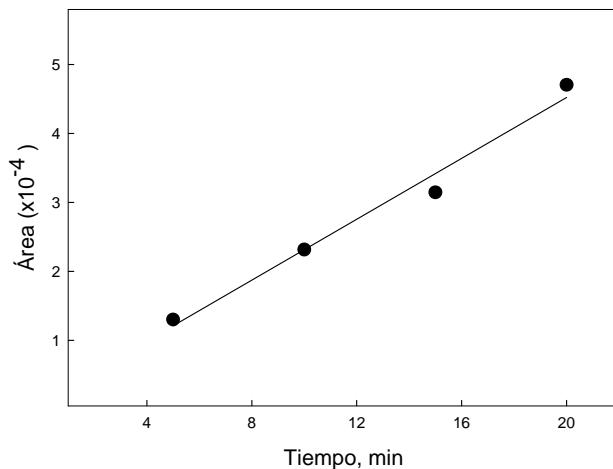


Figura 6. Curva de progreso para UGPasa. 2 oocitos de *C. caudiverbera* se homogeneizaron en medio de ensayo y se incubaron durante los tiempos indicados en la figura. Después de detener la reacción y centrifugar, 40 μ l de líquido sobrenadante se sometieron a electroforesis capilar.

Esta técnica de electroforesis capilar tiene una gran potencialidad: permite cuantificar simultáneamente la desaparición de UTP y la aparición de UDP-glucosa. Además puede ser aplicada a otras enzimas que producen o consumen UDP-azúcares, puesto que, como se puede apreciar en el perfil de elusión, los diferentes nucleótidos son bien resueltos por esta metódica (Figura 4).

Comparado con las metodologías clásicas, este método posee varias ventajas inherentes a la electroforesis capilar: es un método simple, rápido, no muy costoso, tiene la posibilidad de automatización y usa muy pequeña cantidad de muestra. Este ensayo se utilizó para medir la actividad de la GS, pues no existía un método a través de electroforesis capilar para la medición de esta enzima (Wilson et al., 2007).

Determinación de la actividad endógena de la UGPasa

La actividad endógena de la UGPasa se determinó en el líquido sobrenadante obtenido después de centrifugar un homogeneizado de ovario. Se utilizó el método espectrofotométrico descrito en Materiales y Métodos. Se encontró una actividad endógena igual a $11,5 \pm 2,2$ mU/oocito, lo que equivale a $1,6 \pm 0,3$ U/g de oocito, valor promedio correspondiente a 4 mediciones en ranas distintas. Este resultado no estaba descrito en la literatura y fue comparado con las demás enzimas que participan en la vía directa de síntesis de glicógeno (Tabla 1). Se observa que la UGPasa tiene una actividad relativa alta con respecto a la hexoquinasa y a la glicógeno sintasa, pero está por debajo de la fosfoglucomutasa (Radojkovic y Ureta, 1982). Además se observó una dependencia de la actividad endógena de la enzima con respecto a las estaciones del año (Quiroga, 2006), observándose una mayor actividad en los meses de invierno.

Tabla 1

Enzima	Actividad (U/g de oocito)	Actividad relativa
*Hexoquinasa	0,08 ± 0,01	1
*Fosfoglucomutasa	5,8 ± 0,9	73
UGPasa	1,6 ± 0,3	20
*Glicógeno sintasa	0,6 ± 0,06	8

Actividad endógena de las enzimas participantes en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos.

*Datos obtenidos de Radojkovic y Ureta (1982). Se tomó a la enzima con menor actividad con una actividad relativa de 1.

4.2.- Caracterización parcial de la UGPasa de oocitos de rana.

Dependencia de la actividad de la UGPasa de oocitos del pH

En la figura 7 se aprecia el efecto que ejerce el pH en la actividad de la UGPasa. La medición de actividad enzimática se realizó en presencia de 4 amortiguadores distintos para los diferentes pH. Como se puede observar, el pH óptimo para la actividad de la UDP-glucosa pirofosforilasa fue de 8,5. Valores de pH óptimo cercanos a 8,5 para la enzima UGPasa han sido descritos en la literatura (Turnquist y Hansen, 1973), y en general la enzima tiene valores de pH óptimo levemente alcalinos.

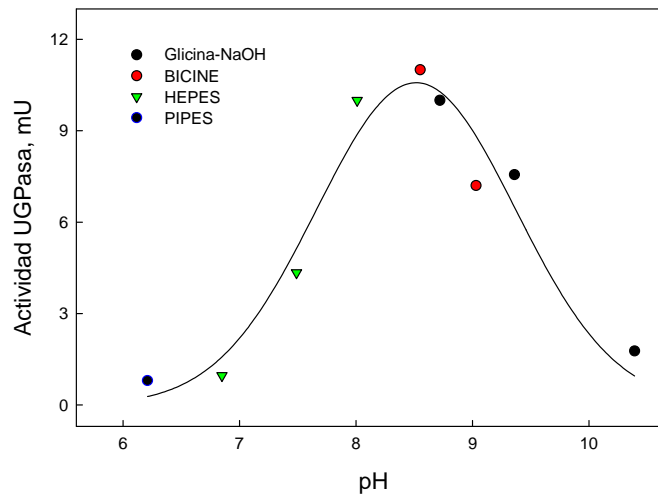


Figura 7. Efecto del pH sobre la actividad de la UGPasa. 15 μ l de líquido sobrenadante se agregaron al medio de reacción descrito en Materiales y Métodos. La actividad enzimática se midió por el método espectrofotométrico convencional, en presencia de pirofosfato 3 mM y UDP-glucosa 1 mM.

En la literatura se encuentran valores variables para el pH intracelular en los oocitos de anfibio. Un trabajo de Cicirelli et al. (1983) habla de un amplio rango de valores de pH al interior de los oocitos que estaría entre $7,06 \pm 0,01$ y $7,93 \pm 0,01$. Estos valores además fluctuarían durante el desarrollo del oocito permitiendo la activación o inhibición de ciertos procesos celulares (Cicirelli et al. 1983). Es importante tener en cuenta este punto pues la enzima debe estar activa al pH interno de los oocitos. Como vemos la enzima tiene un pH óptimo de 8,5 *in vitro*, y los oocitos tienen un rango de pH intracelular que va desde 7 a 8. Al observar la curva de la actividad de la enzima con respecto al pH vemos que la enzima a pH 8 está prácticamente en su actividad máxima.

Características cinéticas de la UGPasa

Se determinó la $K_{m_{app}}$ para los sustratos UDP-glucosa y PPI. La cinética para UDP-glucosa resultó ser hiperbólica con una $K_{m_{app}}$ de 50 μ M (Figura 8). Este valor es semejante a los descritos en la literatura para este sustrato (Rudick y Weisman, 1974; Turnquist et al., 1974; Gustafson y Gander, 1972).

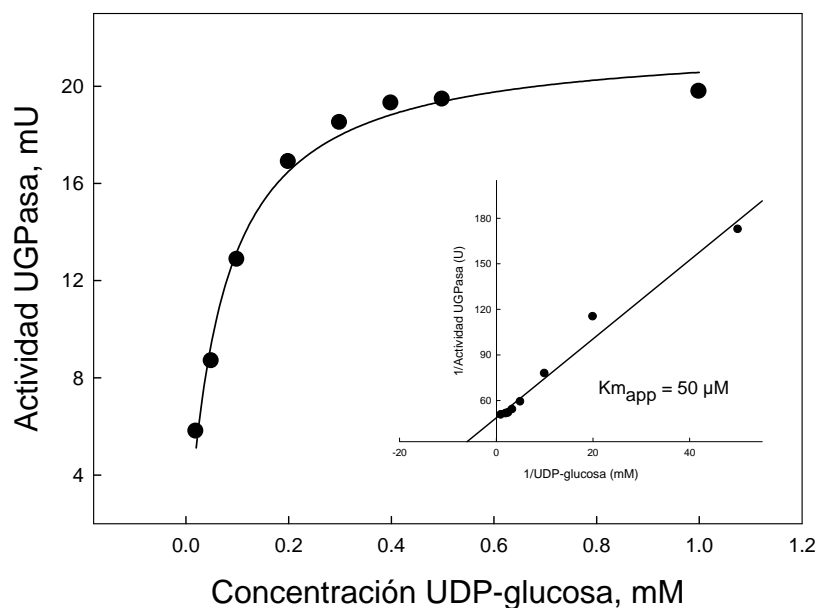


Figura 8. Efecto de la concentración de UDP-glucosa sobre la actividad de UGPasa. 30 μ l de líquido sobrenadante se agregaron al medio descrito en Materiales y Métodos que contenía concentraciones crecientes de UDP-glucosa. Se usó el método espectrofotométrico convencional, en presencia de pirofosfato 3 mM.

Para el sustrato PP_i se obtuvo una cinética sigmoideal, con valores para $K_{0,5}$ de 460 μ M y n_H de 3,65 (Figura 9). Esto no es particular de la enzima de oocitos de anfibio, pues la misma cinética fue descrita para PP_i en la forma II de UGPasa de músculo humano (Duggleby et al., 1996). Los valores de K_m y $K_{0,5}$ obtenidos nos sirvieron para corroborar que la concentración de los sustratos PP_i y UDP-glucosa utilizadas en el ensayo eran saturantes para la enzima de oocitos, lo cual indica que se estaba midiendo la máxima actividad posible.

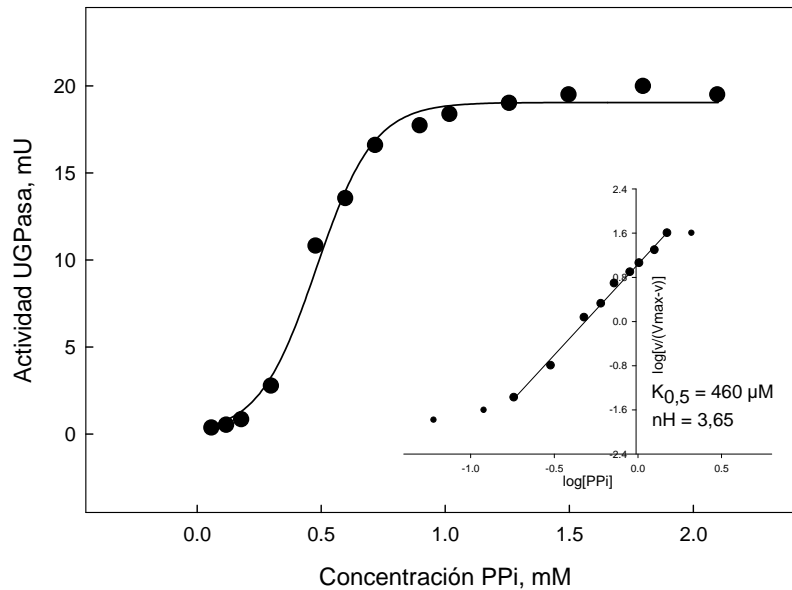


Figura 9. Efecto de la concentración de PP_i sobre la actividad de UGPasa. 30 μl de líquido sobrenadante se agregaron al medio de reacción descrito en Materiales y Métodos. El medio contenía concentraciones crecientes de PP_i y UDP-glucosa 1 mM. Se usó el método espectrofotométrico convencional.

Estabilidad de la enzima en el tiempo

La figura 10 muestra la estabilidad de la enzima en el tiempo en 2 condiciones. Se observa que la mantención del sobrenadante a -20° conserva la actividad de la enzima por un tiempo mayor que a 4° . Por esta razón se decidió mantener el sobrenadante de oocitos a -20° y descongelar sólo minutos antes de los experimentos a realizar. Generalmente para las mediciones se usaba el sobrenadante el mismo día de su preparación y los oocitos se utilizaban el mismo día de su extracción.

La enzima es más estable a -20° que a 4° . En la primera situación, se pierde un 50% de actividad a los 20 días, mientras que a 4° el 50% de la actividad se pierde alrededor de 5 días. Es probable que ésto se deba a la presencia de proteasas en el sobrenadante que degradan la enzima a 4° , pero no a -20° .

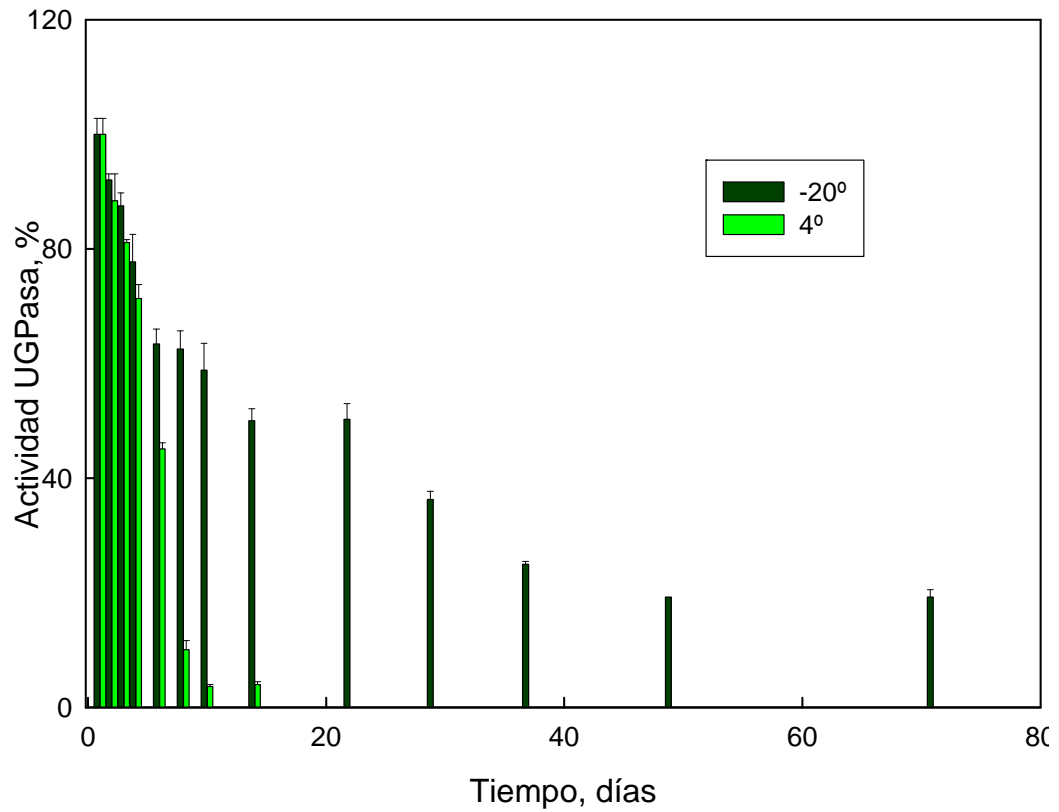


Figura 10. Estabilidad de la UGPasa en función del tiempo. La actividad enzimática está expresada como porcentaje. El 100% corresponde a la actividad medida el día 1 de extracción de oocitos. Los resultados corresponden al valor promedio de 3 determinaciones \pm ES. Para esta determinación se utilizaron 30 μ l de sobrenadante (ver Materiales y Métodos).

4.3.- Coeficiente de control de la UGPasa.

Validación de la microinyección de enzima de levadura: identidad de secuencias.

La UGPasa inyectada en los oocitos provenía de levadura (*Sacharomyces cerevisiae*). La enzima de rana no está disponible comercialmente y la purificación aún está en progreso en nuestro laboratorio. Si bien la secuencia de aminoácidos de la enzima UGPasa de oocitos de *C. caudiverbera* no se conoce, se utilizó la secuencia de UGPasa de *X. laevis* para comparar su secuencia con la de levadura (Figura 11). La identidad de secuencias es de 50%, lo que indica que la UGPasa es una enzima conservada. Según los conceptos de Dickerson la gran identidad de secuencias en especies tan divergentes en el tiempo nos sugiere que la función de la enzima es indispensable (Dickerson, 1971).

Comparación de secuencias:

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                10          20          30          40          50
UGPasa1      MSTKKHTKTH STYAFESNTN SVAASQMRNA LNKLADSSKL DDAARAKFEN
UGPasa2      -----MASG GMSHFQEAIR EELEGAMKAD LERILSTAPE SELEHTTKD-
Consenso          F              M   L              K

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                60          70          80          90          100
UGPasa1      ELDSFFTLFR RYLVEKSSRT TLEWDKIKSP NPDEVVKYEI ISQQ--PENV
UGPasa2      -LAGFQKLFH RFLQEKGP-- AVDWGKIQRP PEDSIQPYEK IKAKGLPDNI
Consenso      L  F  LF  R  L  EK              W  KI  P  D   YE  I   P  N

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                110         120         130         140         150
UGPasa1      SN-LSKLAVL KLNGLGTSM GCVGPKSVIE VREGNTFLDL SVRQIEYLN
UGPasa2      ASVLNKLVLV KLNGLGTSM GCKGPKSLIG VRNENTFLDL TVKQIEHLNT
Consenso      L  KL  VL  KLNGLGTSM GC  GPKS  I  VR  NTFDL  V  QIE  LN

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                160         170         180         190         200
UGPasa1      QYDSVPLLL MNSFNTEKDT EHLIKKYSAN RIRIRSFNQS RFPRVYKDSL
UGPasa2      TYNTDVSLVL MNSFNTEKDT KKILQKYSHC RVKIHTFNQS RYPRINKESL
Consenso      Y  DV  L  L  MNSFNTEKDT      KYS  R  I  FNQS  R  PR  K  SL

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

```


	210	220	230	240	250
UGPasa1	LPVPTEYDSP	LD---AWYPP	GHGDLFESLH	VSGELDALIA	QGREILFVSN
UGPasa2	LPIAKDLSYS	VENAESWYPP	GHGDIYASFY	NSGLLDRLIG	EGKEYIFVSN
Consenso	LP	WYPP GHGD	S	SG LD LI	G E FVSN

	260	270	280	290	300
UGPasa1	GDNLGATVDL	KILNHMIETG	----AEYIME	LTDKTRADVK	GGTLISYDQ
UGPasa2	IDNLGATVDL	YILNHLLNPP	NGKKCEFVME	VTDKTRADVK	GGTLTQYEGK
Consenso	DNLGATVDL	ILNH	E ME	TDKTRADVK	GGTL Y G

	310	320	330	340	350
UGPasa1	VRLLEVAQVP	KEHIDEFKNI	RKFTNFNTNN	LWINLKAVKR	LIESSNLEME
UGPasa2	LRLVEIAQVP	KAHVDEFKSV	SKFKIFNTNN	LWISLSAIKR	LQEANAIDME
Consenso	RL E AQVP	K H DEFK	KF FNTNN	LWI L A KR	L E ME

	360	370	380	390	400
UGPasa1	IIPNQKTITR	DGHEINVLQL	ETACGAAIRH	FDGAHGVVVP	RSRFLPVKTC
UGPasa2	IIVNPKTLDG	G---LNVIQL	ETAVGAAVKS	FENSLGINVP	RSRFLPVKTT
Consenso	II N KT	NV QL	ETA GAA	F G VP	RSRFLPVKT

	410	420	430	440	450
UGPasa1	SDLLLKSDL	FRLEHGSLKL	DPSR-FGPNP	LIKLGSHFCK	VSGFNARIPH
UGPasa2	SDLLLVMNSL	YSLQAGSLTM	SEKREFPTVP	LTKLGSSFTK	VQDYLKRFES
Consenso	SDLLL V S L	L GSL	R F P L	KLGS F K V	R

	460	470	480	490	500
UGPasa1	IPKIVELDHL	TITGNVFLGK	DVTLRGTVII	VCSGDGHKIDI	PNGSILENVV
UGPasa2	IPDMLELDHL	TVSGDVTFGK	NVALKGTVII	IANHGDRIDI	PPGAVLENKI
Consenso	IP ELDHL T	G V GK	V L GTVII	G IDI P G	LEN
				
	510				
UGPasa1	VTGNLQILEH				
UGPasa2	VSGNLRILDH				
Consenso	V GNL IL H				

UGPasa1 = *Sacharomyces cerevisiae*

UGPasa2 = *Xenopus laevis*

Figura 11. Comparación de las secuencias de UGPasa de *S. cerevisiae* y *X. laevis*.

Pureza de la enzima a microinyectar

La enzima a microinyectar es la UGPasa de levadura de Sigma Co. Para la cuantificación del coeficiente de control se requiere que la enzima esté pura. La enzima comercial, como se observa en la figura 12, no es homogénea. El método de purificación que utiliza la empresa Sigma Co. está basado en Munch-Petersen (1955).

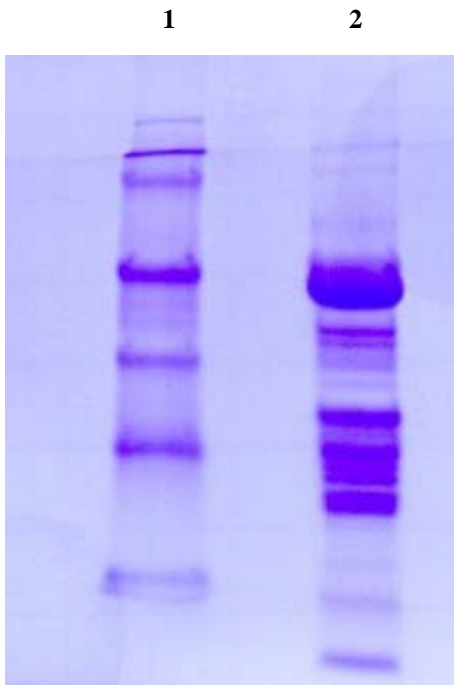


Figura 12. Electroforesis de UGPasa comercial en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes. Antes de cargar las muestras, se les agregó la mezcla desnaturalante y se colocaron por 5 min a 100°. Se cargaron con jeringa Hamilton de 5 µl.

1: Estándar de peso Molecular 2: Enzima comercial Sigma, 20 µg.

Por otra parte es esencial que ninguna otra enzima de la vía se encuentre en la preparación. Por esta razón se determinaron las actividades de las otras enzimas de la vía en la enzima comercial. Como se observa en la tabla 2, la HK, está presente en un alto porcentaje en la enzima comercial, lo que es especialmente relevante dado que ha sido descrita como la enzima con el más alto coeficiente de control (Ureta et al., 2000). Estos 2 resultados hicieron necesario purificar la enzima comercial. En palabras de Racker: *No gastes pensamientos puros en enzimas impuras.*

Tabla 2

Enzimas determinadas en UGPasa comercial	U/mg de proteína
Sigma	

UGPase	70,1
HK	7,7
PGM	A.I.
GS	A.I.

Enzimas de la vía directa de síntesis de glicógeno presentes en la enzima comercial Sigma. Las actividades de las enzimas se midieron como se indicó en Materiales y Métodos. A.I. = actividad indetectable.

Purificación de la UGPasa comercial

El protocolo de purificación utilizado por Sigma no tiene una etapa de filtración molecular. Considerando que el peso molecular de la HK de levadura es 100 kDa (forma dimérica), y que la UGPasa es un octámero con un PM del monómero de alrededor de 50 kDa, ello implicaría que ambas enzimas pueden separarse fácilmente por filtración molecular. La tabla de purificación nos indica que la enzima se purificó 8,2 veces por este procedimiento (Tabla 3). Los resultados de las cromatografías se muestran en la figura 13. Se puede observar que la recromatografía en Sephacryl elimina completamente la contaminación por HK. La figura 14 muestra el resultado de la electroforesis de la enzima purificada.

Tabla 3

	Actividad (U/ml)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Veces purificación
Enzima comercial	260	992	39	39,3	1
Sephacryl S-200	1,42	292,4	32	109,4	2,8
Recromatografía en Sephacryl S- 200	0,84	49,5	16	323,3	8,2

Purificación de la enzima comercial de Sigma. El método de purificación se describe en Materiales y Métodos.

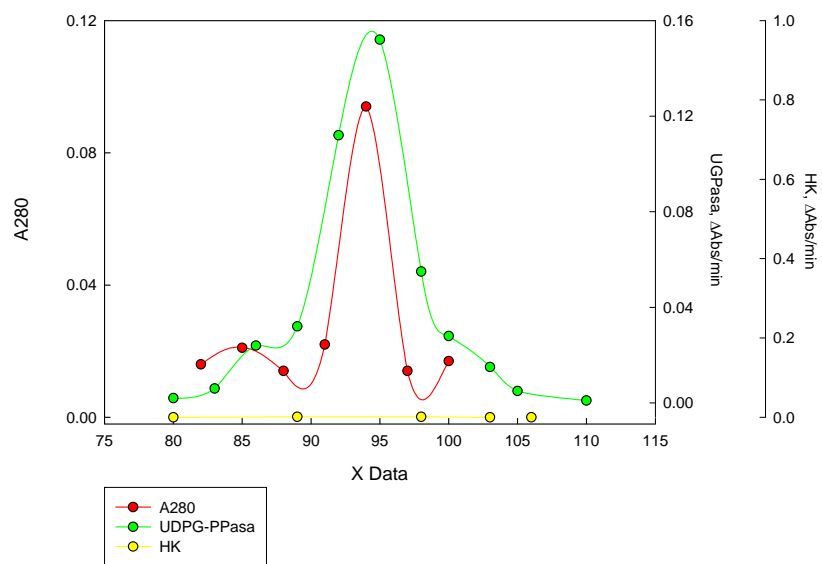
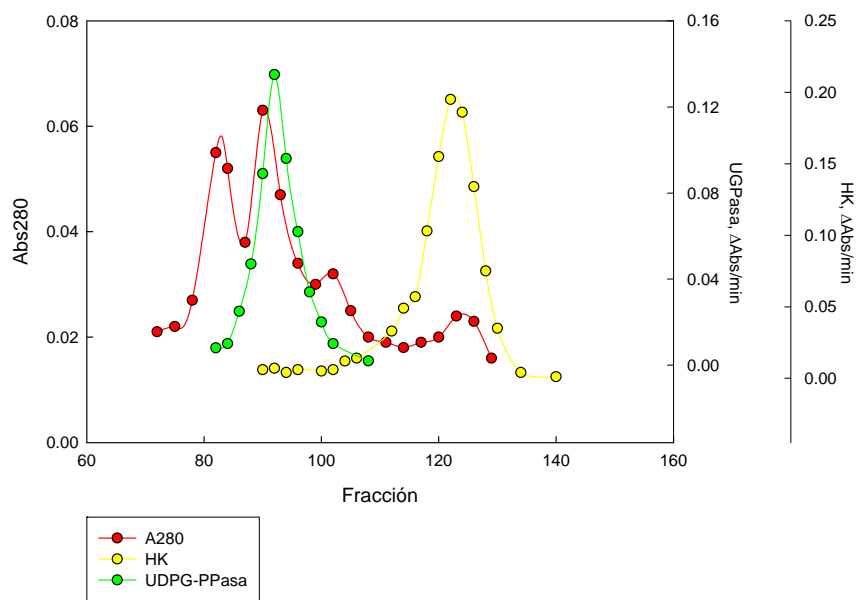


Figura 13. Purificación de UGPasa comercial Sigma. A. La enzima fue purificada por Sephacryl S-200 como se describe en Materiales y Métodos. B. Recromatografía en Sephacryl S-200

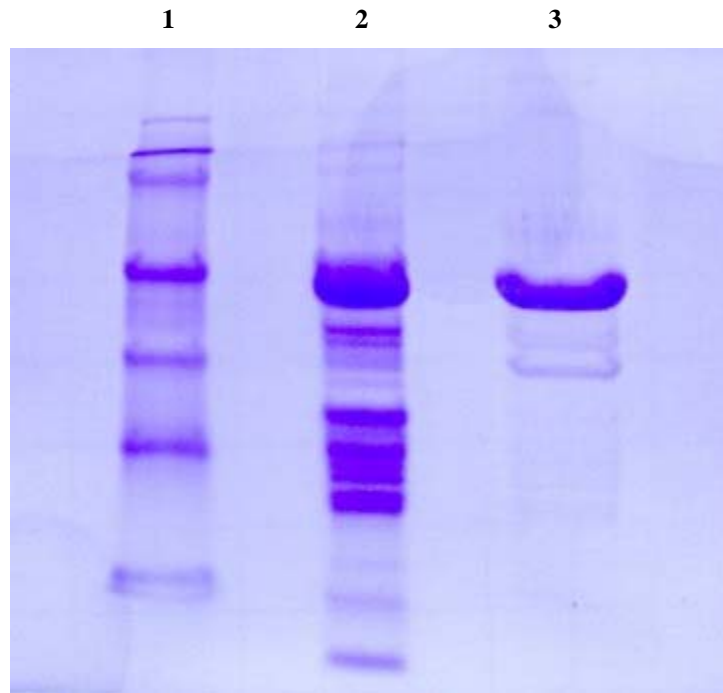


Figura 14. Electroforesis de UGPasa purificada en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes. Antes de cargar las muestras, se les agregó la mezcla desnaturalante y se calentaron por 5 min a 100°. Se cargaron con jeringa Hamilton de 5 μ l.

1: Estándar de Peso molecular 2: Enzima comercial 20 μ g. 3: Enzima comercial después de ser recromatografiada en Sephacryl S-200

Determinación del coeficiente de control de la UGPasa

Coeficiente de control en la vía directa de síntesis de glicógeno.

Para determinar el coeficiente de control que ejerce la UGPasa sobre la vía directa de síntesis de glicógeno, se aumentó la actividad de UGPasa intracelular. Para ello se microinyectaron oocitos con distintas cantidades de enzima UGPasa comercial Sigma purificada. El coeficiente de control de la enzima resultó ser 0,15 (Figura 15). Se hicieron varios experimentos con diferentes variaciones de la actividad endógena, llegando hasta 13 veces la actividad endógena con los mismos resultados. Paralelamente se midió el control que ejerce esta enzima sobre la vía de las pentosas-P, cuantificando la glucosa incorporada en CO₂. En este caso el valor obtenido fue igual a 0,01 (Figura 16).

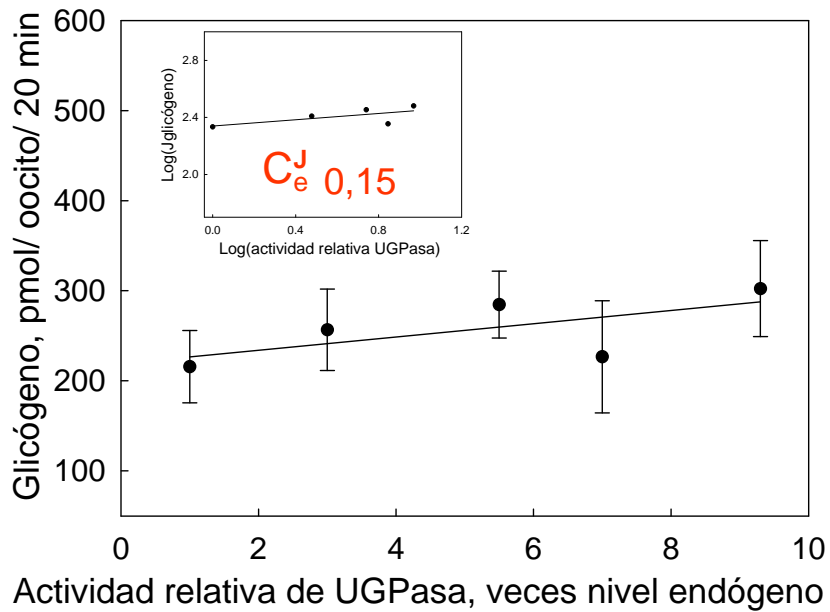


Figura 15. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía directa de síntesis de glicógeno. Cada punto es el promedio de diez oocitos que fueron inyectados con cantidades crecientes de UGPasa y preincubados durante 1 h a 20°. Posteriormente las células se inyectaron con 6 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa y se incubaron bajo una atmósfera de O₂ con agitación continua durante 20min. Después se aisló el glicógeno y se cuantificó la radiactividad incorporada en glicógeno. Los resultados corresponden al valor promedio de cada grupo ± el error estándar (n=10). **Inserto.** Cálculo del coeficiente de control a partir de los datos mostrados en el gráfico.

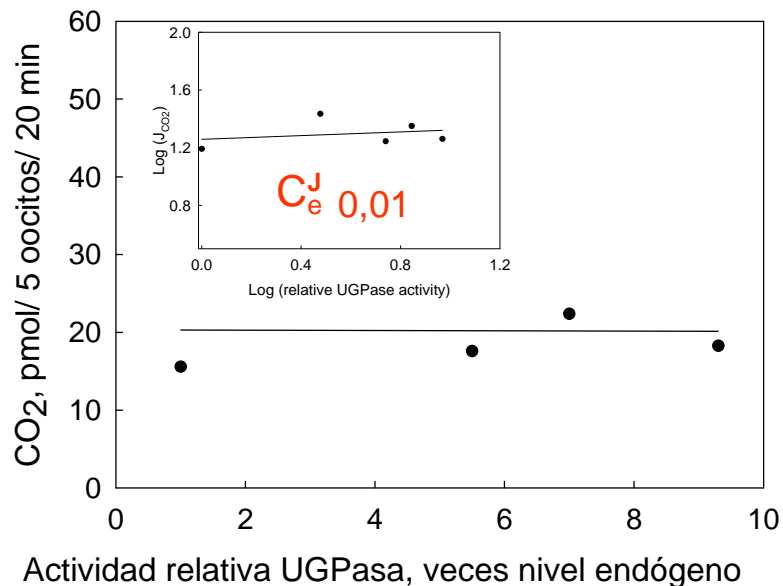


Figura 16. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía de las pentosas-P. Cada punto es el promedio de diez oocitos que fueron inyectados con cantidades crecientes de UGPasa y preincubados durante 1 h a 20°. Posteriormente las células se inyectaron con 6 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa y se incubaron bajo una atmósfera de O₂ con agitación continua durante 20min, colectándose el CO₂ producido. Después se cuantificó la radiactividad del CO₂ **Inserto**. Cálculo del coeficiente de control a partir de los datos mostrados en el gráfico.

Coeficiente de control de la UGPasa de la vía indirecta de síntesis de glicógeno.

Además se determinó el coeficiente de control de la enzima por la vía indirecta de síntesis de glicógeno inyectando en este caso [U-¹⁴C]glucosa 0,5 nmoles. El coeficiente de control obtenido es igual a 0,05. Los resultados muestran que la enzima UGPasa ejerce un control muy bajo sobre el flujo en la vía directa de síntesis de glicógeno ($C_e^J = 0,1$) (Figura 17). Por otra parte, la enzima no afecta el flujo por la vía indirecta ($C_e^J = 0,05$) ni tampoco afecta el flujo por la vía de las pentosas-P ($C_e^J = 0,01$) (Figura 18).

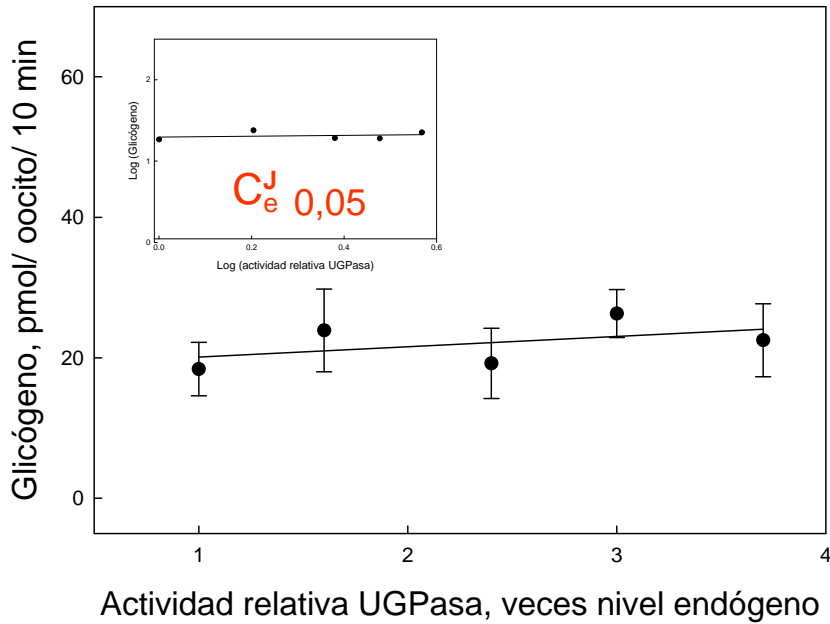


Figura 17. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía directa de síntesis de glicógeno. Cada punto es el promedio de diez 10 oocitos que fueron inyectados con cantidades crecientes de UGPasa y preincubados durante 1 h a 20°. Posteriormente las células se inyectaron con 0,5 nmoles de $[U-^{14}C]$ glucosa y se incubaron bajo una atmósfera de O_2 con agitación continua durante 20min. Después se aisló el glicógeno y se cuantificó la radiactividad incorporada en glicógeno. Los resultados corresponden al valor promedio de cada grupo \pm el error estándar (n=10). **Inserto.** Cálculo del coeficiente de control a partir de los datos mostrados en el gráfico.

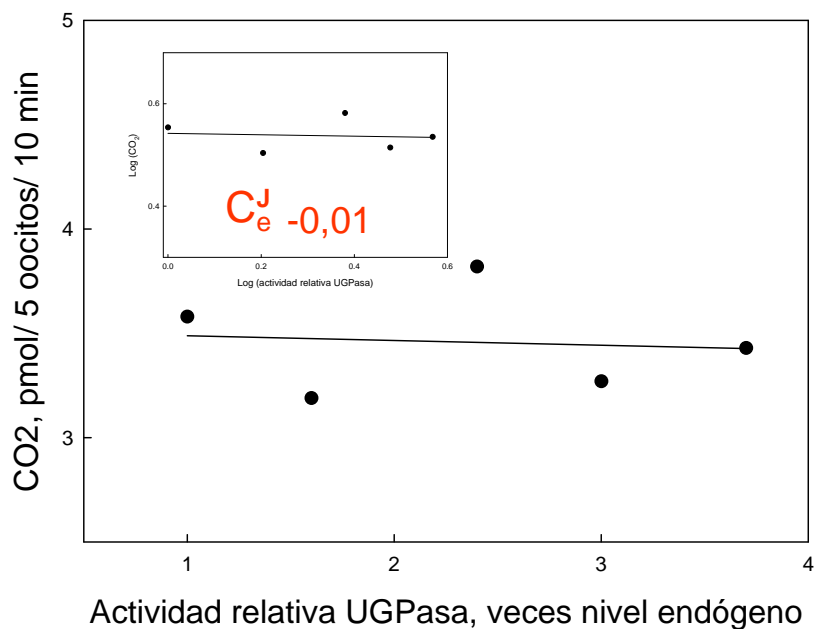


Figura 18. Coeficiente de control para la UGPasa en la vía de las pentosas-P. Cada punto es el promedio de diez oocitos que fueron inyectados con cantidades crecientes de UGPasa y preincubados durante 1 h a 20°. Posteriormente las células se inyectaron con 0,5 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa y se incubaron bajo una atmósfera de O₂ con agitación continua durante 20min, colectándose el CO₂ producido. Después se cuantificó la radiactividad del CO₂ **Inserto**. Cálculo del coeficiente de control a partir de los datos mostrados en el gráfico.

Un control importante para estos experimentos fue determinar si la enzima inyectada permanecía activa durante el tiempo que duraba el experimento (Tabla 4).

Tabla 4

Grupos de oocitos	UGPasa		UGPasa (mU endógenas + mU inyectadas) Teórico esperado
	mU inyectadas / oocito	Experimental	
Ooc. no perturbados	0	3,47	
Ooc. inyectados con Barth	0	3,39	
Ooc. inyectados con UGPasa	1,77	6,09	5,02
Ooc. inyectados con UGPasa	4,09	7,05	7,52
Ooc. inyectados con UGPasa	6,15	9,46	9,58
Ooc. inyectados con UGPasa	8,20	12,22	11,63

Actividad de UGPasa medida después de inyectar la enzima en oocitos. Para el cálculo de los valores teóricos esperados se parte de la base que la mU endógenas / oocito son 3,43. Este valor corresponde al promedio de las mU medidas en los oocitos no perturbados con las mU medidas en los inyectados con Barth.

4.4.- Coeficiente de control de la GS

El coeficiente de control para la enzima glicógeno sintasa no ha sido determinado. No hemos logrado obtener enzima pura para microinyectar. Además no existe una enzima comercial pura. Las dificultades en la purificación radican en que la enzima, copurifica con glicógeno y si se saca el glicógeno, degradándolo, la enzima se inactiva. No se puede microinyectar la enzima con glicógeno, pues su consistencia viscosa impide la microinyección. Para abordar la determinación del coeficiente de control de la glicógeno sintasa, hemos decidido activar la enzima endógena. Como sabemos la determinación del control del flujo se basa en el cambio del flujo mediado por

un cambio en la actividad enzimática. En la literatura se han descrito al menos 2 activadores de la glicógeno sintasa (litio, glucosa-6-P). Realizamos pruebas preliminares para observar si con litio la enzima en oocitos se activaba. Para ello inyectamos concentraciones crecientes de cloruro de litio, o una concentración fija de cloruro de litio y se veía su efecto en el tiempo. No hubo activación de la enzima con litio.

La glucosa-6-P es un activador alostérico de la glicógeno sintasa (Báez et al., 2000) y se ha descrito que activa la glicógeno sintasa de oocitos de anfibio. Por lo cual probamos el efecto de la concentración de glucosa-6-P sobre la activación de GS y también su efecto en el tiempo. El metabolito activa a la enzima hasta 3 veces su actividad endógena y el máximo de su actividad se observa a los 8 min. Por ello se microinyecto glucosa-6-P para activar la glicógeno sintasa y luego microinyectar glucosa, y así determinar el coeficiente de control de la glicógeno sintasa (figuras 20).

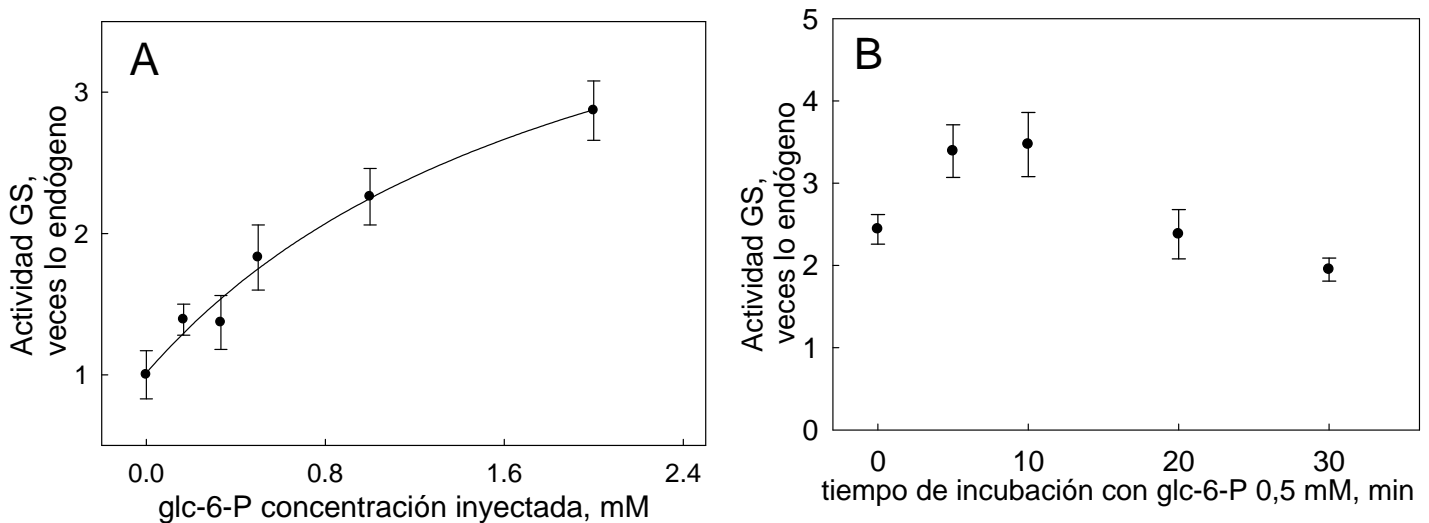


Figura 19. Efecto de glucosa-6-fosfato sobre la GS. A. Efecto de la concentración de glucosa-6-fosfato sobre la activación de GS. B. Tiempo de duración del efecto de glucosa-6-fosfato.

El coeficiente de control para la glicógeno sintasa es muy pequeño, prácticamente nulo. Este valor concuerda con el determinado por Shulman et al. (1995) en músculo de conejo, lo que indica que esta enzima, aunque es muy regulada no es importante en el control del flujo de la síntesis de glicógeno, a partir de glucosa.

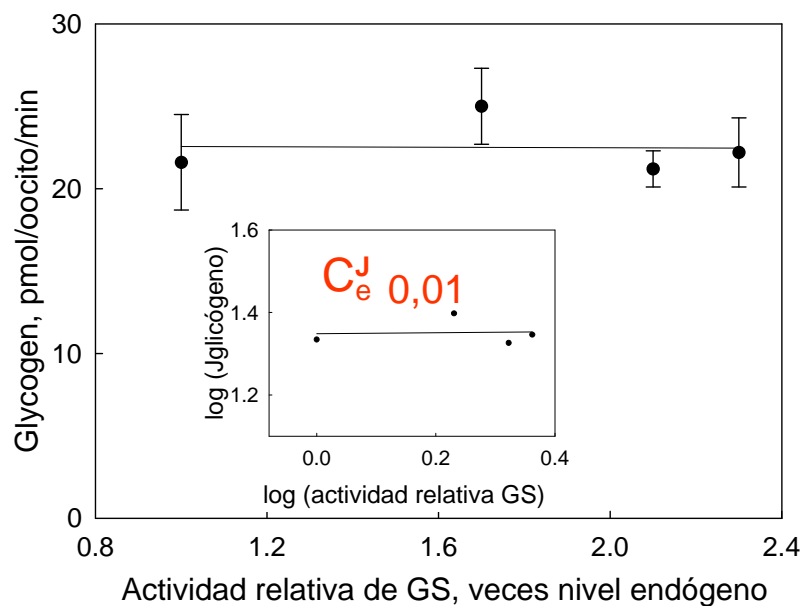


Figura 20. Coeficiente de control para la GS en la vía directa de síntesis de glicógeno. Cada punto es el promedio de diez oocitos que fueron microinyectados con cantidades crecientes de glc-6-P (0.13, 0.25, 0.5 y 0.75 mM, concentraciones intracelulares), y fueron preincubados durante 8 min. Luego, se inyectaron 6 nmoles de $[U-^{14}C]$ glucosa en cada oocito y las células se incubaron durante 12 min. Posteriormente se aisló el glicógeno y se cuantificó la radiactividad incorporada.

V.- DISCUSIÓN

5.1.- Caracterización cinética de la UGPasa de oocitos de anfibio.

Métodos de medida.

UGPasa cataliza la reacción $UTP + \text{glucosa-1-P} \Leftrightarrow \text{UDP-glucosa} + \text{PPi}$. Ésta es una reacción que se encuentra en todos los organismos hasta ahora estudiados. Además de su función clave en la síntesis de disacáridos y polisacáridos, la enzima es esencial en la síntesis de la parte carbohidrato de glicolípidos, glicoproteínas y una variedad de metabolitos secundarios. Esta enzima no había sido caracterizada en oocitos de anfibio. Estos valores comparados con los de otras enzimas de la vía nos permitirán conocer a la UGPasa en su contexto metabólico y entender qué grado de control ejerce en la vía metabólica.

El método utilizado para medir la actividad de la enzima se basó en el descrito por Martz et al. (2002); con mínimas modificaciones fue utilizado para medir la actividad en extractos crudos de oocitos. Se observó una dependencia lineal entre actividad y sobrenadante de oocitos agregados. Este método mide la formación de glucosa-1-P, es decir, en el sentido contrario de cómo funciona en la vía de síntesis de glicógeno. Ello no es un problema, ya que la reacción es completamente reversible. Existe un método que permite medir la reacción en el sentido de la formación de UDP-glucosa, que usa como enzima auxiliar UDPGDH (Aksamit y Ebner, 1972). Sin embargo, para tener una buena medición se necesita mucha enzima auxiliar, entre 4 a 6 U de enzima por medida. Finalmente ideamos un método para la medición de la actividad de la enzima en la vía de formación de UDP-glucosa utilizando electroforesis capilar. Por medio de esta técnica se pueden determinar los nucleótidos presentes en la muestra. Se puede entonces cuantificar la disminución de UDP y el aumento de UDP-glucosa. Se decidió cuantificar el nucleótido UDP-glucosa, ya que en la corridas de electroforesis capilar era mucho más definida esta señal que la de UDP. La curva de calibración de UDP-glucosa v/s el área es lineal hasta 3 mM, que será la máxima concentración de UDP-glucosa usada en los ensayos. Se determinó también si otros nucleótidos que pueden estar presentes en los oocitos podían interferir con la señal de UDP-glucosa. Se comprobó que dicha interferencia no existe. Se observó una dependencia lineal (hasta los 20 min) del área de UDP-glucosa del tiempo de incubación de la reacción.

Comparado con las metodologías clásicas, este método posee varias ventajas inherentes a la electroforesis capilar: es un método simple, rápido, no muy costoso, tiene la posibilidad de automatización y usa muy pequeña cantidad de muestra. Por lo tanto, este ensayo se utilizó también para medir la actividad de la enzima glicógeno sintasa (Wilson et al., 2007). Este método para UGPasa, aún está en progreso, por lo cual para todas las mediciones de caracterización cinética de la enzima se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Martz et al. (2002).

Actividad de la enzima en oocitos.

Para variar la actividad intracelular de la UGPasa en los experimentos de determinación del coeficiente de control, es necesario conocer la actividad endógena de la enzima.

Pudimos constatar que existe una diferencia estacional en los valores de la actividad endógena de UGPasa. Entre Noviembre y Marzo la actividad fue $11,5 \pm 2,2$ mU/oocito, y entre los meses de abril y agosto, $4,3 \pm 0,7$ mU/oocito. Este comportamiento estacional también se observó en otras enzimas de anfibios. Por ejemplo Quiroga (2006), observó un comportamiento estacional de la enzima PGM, con una actividad de $9,4 \pm 0,9$ mU/oocito entre los meses de abril y agosto y de $41 \pm 3,1$ mU/oocito entre los meses de septiembre y enero.

Si se compara la actividad relativa de todas las enzimas de la vía directa de síntesis de glicógeno en los oocitos asignando el valor 1 a la enzima con la menor actividad endógena (HK), se observa que la UGPasa tiene más de 100 veces la actividad de la HK. Si se correlaciona la actividad de las enzimas que participan en una vía metabólica con el coeficiente de control del flujo se observa que a menor concentración o actividad de la enzima el control que ésta ejercerá será mayor. En este caso se cumple dicha correlación, pues la HK tiene el mayor coeficiente de control del flujo.

Caracterización parcial de la UGPasa de oocitos de anfibio.

Se encontró un valor de 8,5 para el pH óptimo de la enzima en extractos crudos de oocitos. Valores de pH óptimo cercanos a 8,5 para la enzima UGPasa han sido descritos en la literatura (Turnquist y Hansen, 1973), y en general los valores descritos son levemente alcalinos. En la literatura se encuentran valores variables para el pH intracelular en los oocitos de anfibio. Un trabajo de Cicirelli et al. (1983) habla de un amplio rango de valores de pH al interior de los oocitos que fluctuarían entre $7,06 \pm 0,01$ y $7,93 \pm 0,01$. Estos valores además cambiarían durante el desarrollo del oocito permitiendo la activación o inhibición de ciertos procesos celulares (Cicirelli et al. 1983). Es importante tener en cuenta este punto pues la enzima debe estar activa al pH intracelular.

In vitro la enzima tiene un pH óptimo de 8,5, y los oocitos tienen un rango de pH intracelular que varía entre 7 y 8. Al observar la curva de la actividad de la enzima con respecto al pH vemos que la enzima a pH 8 está prácticamente en su actividad máxima. Por otra parte, la cuantificación del coeficiente de control de la enzima se realiza inyectando la enzima comercial de *S. cerevisiae*, que tiene un pH óptimo entre 6,5 y 8,0 (Turnquist y Hansen, 1973), pero que mantiene actividad importante a pH 8,5. Se decidió medir la actividad usando el método espectrofotométrico y al pH óptimo de la enzima de oocitos, ya que al pH óptimo de la enzima de levadura la actividad de la enzima de oocitos se ve más disminuída que la actividad de la enzima de levadura con el pH óptimo de la enzima de oocitos.

La cinética para UDP-glucosa resultó ser hiperbólica con una K_{mapp} de 50 μM . Este valor es semejante a los descritos en la literatura para este sustrato. Por ejemplo, las enzimas de *Acanthamoeba catellanii* (Rudick y Weisman, 1974), *Sorghum vulgare* (Gustafson y Gander, 1970), *Bos taurus*, *Homo sapiens* y *Oryctolagus cuniculus* (Turnquist et al., 1974) presentan idéntico valor de K_{mapp} para este sustrato.

Para el sustrato PP_i se obtuvo una cinética sigmoïdal, con un $K_{0,5}$ de 460 μM y un n_H de 3,65. Esto no es particular de la enzima de oocitos de anfibio, pues la misma cinética fue descrita para PP_i en la forma II de UGPasa de músculo humano (Duggleby et al., 1996). Los valores de K_m y $K_{0,5}$ obtenidos nos sirvieron para corroborar que la concentración de los sustratos PP_i y UDP-glucosa utilizadas en el ensayo eran saturantes para la enzima de oocitos, lo cual indica que se estaba midiendo la máxima actividad posible. Es importante comparar los valores de K_m de la enzima de oocitos de anfibio con los de la enzima de levadura. Esta última tiene una K_m de 35 μM para UDP-glucosa.

5.2.- Coeficiente de control de la UGPasa de oocitos de anfibio.

Para la determinación del coeficiente de control de la enzima UGPasa de oocitos se microinyectó enzima de levadura. Se intentó purificar la enzima de oocitos con resultados poco satisfactorios, ya que se inactiva fácilmente y el rendimiento es muy bajo. Por ello se decidió microinyectar la enzima comercial de levadura. La UGPasa de animales es un oligómero, específicamente un octámero (Kleczkowski et al., 2004). La UGPasa de plantas en cambio es monomérica (Kleczkowski et al., 2004). La UGPasa de levadura fue cristalizada recientemente y se obtuvo la

estructura tridimensional. Al determinar el estado oligomérico de esta enzima se observó que era un octámero, por lo que se acerca más a la enzima de animales que a la de plantas.

Si bien la situación ideal para la medición del coeficiente de control de la UGPasa de oocitos, es microinyectar la misma enzima endógena, ésto no fue posible dadas las dificultades mencionadas anteriormente. No obstante, la enzima de levadura tiene un 50% de identidad de secuencia con la enzima de rana, lo que indica que la enzima está bastante conservada. Es importante saber en qué regiones de la molécula los residuos han sido conservados. Si zonas que interaccionan con otras proteínas no son conservadas, una consecuencia podría ser la imposibilidad para generar complejos multienzimáticos. Sin embargo, la presencia de complejos multienzimáticos en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos de anfibio no ha sido demostrada. Ureta y Radojkovic (1987) realizaron experimentos de enfriamiento de la marca radiactiva para ver si en la vía de síntesis de glicógeno existe el fenómeno de canalización de sustratos. Se observó que al agregar los metabolitos de la vía directa de síntesis de glicógeno se producía enfriamiento de la marca radiactiva en glicógeno, demostrándose que no existía canalización y por ende quizás no exista la formación de un complejo multienzimático en ésta vía en particular. Experimentos realizados por Ureta et al. (2000) muestra que la enzima HK de levadura es completamente activa al interior del oocito y que posee un alto control en el flujo de síntesis de glicógeno. Además, en un experimento preliminar realizado en nuestro laboratorio se microinyectó HK de cerebro de rata, y se obtuvo un valor alto para el coeficiente de control. Con ello se demuestra que, independiente de la fuente de la obtención de la enzima, lo importante es que ésta sea activa al interior del oocito. Por último otro hecho que valida la microinyección de enzima heterólogas, es que la suma de los coeficientes de control en la vía directa de síntesis de glicógeno en los oocitos es prácticamente 1, lo que cumple con el teorema de la sumación.

La enzima de levadura de Sigma no era completamente homogénea. Se necesitó una etapa previa de purificación antes de la microinyección. Una de las mayores impurezas que poseía era la HK. El coeficiente de control para la HK fue determinado previamente en nuestro laboratorio y se calculó un valor de 0,6. Por lo que ésta es una enzima que aporta considerablemente al control del flujo. Por esta razón era imprescindible eliminar la impureza de HK de la muestra de UGPasa.

La UGPasa de levadura es un octámero. La HK de levadura tiene un peso de alrededor de 400 kDa. Para separarlas se utilizó entonces una columna de exclusión molecular. Con esta metódica se logró obtener una UGPasa homogénea libre de HK.

El coeficiente de control de la UGPasa se determinó variando las actividades intracelulares de la enzima por medio de microinyección. Se determinó para las vías directa e indirecta de la síntesis de glicógeno.

El coeficiente de control para la UGPasa en la vía directa de síntesis de glicógeno resultó igual a 0,15 y en la vía indirecta 0,05. Estos resultados indican que la UGPasa no controla el flujo por la vía indirecta y ejerce poco control en la vía directa.

Como control de especificidad, se determinó el control que ejerce la UGPasa sobre la vía de las pentosas-P. Para ello se determinó el CO₂ producido a partir de glucosa. El coeficiente de control para UGPasa en la vía de las pentosas-P fue igual a 0,01, por lo tanto esta enzima no controla el flujo por esa vía. La medición del CO₂ es específica para la vía de las pentosas-P, ya que se ha determinado que en el oocito de estadio VI no está operativo el ciclo de Krebs.

5.3.- Coeficiente de control de la GS de oocitos de anfibio.

Las características cinéticas de la GS de oocitos de anfibio, y en particular de *C. caudiverbera* han sido ampliamente estudiadas en nuestro laboratorio (Baez et al., 2000). Además se desarrolló un método por electroforesis capilar que permite medir la enzima en extractos crudos de oocitos (Wilson et al., 2007). La GS ha sido tradicionalmente considerada la enzima reguladora de la síntesis de glicógeno, pero estudios *in vivo* han puesto en duda esta afirmación (Ureta et al., 2000; Shulman et al., 1995). No existe enzima comercial disponible y aún no ha sido posible en nuestro laboratorio obtener una enzima pura a la concentración necesaria para microinyectar. Como alternativa para variar la actividad intracelular de la enzima, se procedió a la activación de ésta por la glucosa-6-P, un conocido activador de la GS (Cadefau et al., 1997). Los experimentos para determinar el efecto de glucosa-6-P sobre la GS se realizaron microinyectando diferentes concentraciones de glucosa-6-P. La activación máxima alcanzada fue de 2 a 3 veces a 2 mM de glucosa-6-P inyectada. El efecto del éster fue transitorio, siendo máximo entre 5 a 10 min. La determinación del coeficiente de control fue realizada microinyectando diferentes concentraciones de glucosa-6-P. El coeficiente de control para GS en la vía directa de síntesis de glicógeno resultó ser prácticamente nulo (0,01).

Los coeficientes de control de las otras enzimas de la vía ya han sido determinados. Para hexoquinasa resultó ser de 0,6 y para fosfoglucomutasa de 0,2.

La suma de los coeficientes de control de las enzimas en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos de anfibio fue 0,96. Hasta donde alcanza mi conocimiento esta es la primera vez que se determinan *in vivo* todos los coeficientes de control de una vía metabólica completa.

VI.- CONCLUSIONES

- Se usó el método espectrofotométrico para medir la actividad de la UGPasa en la reacción reversa. Mediante este método se obtuvieron los siguientes resultados:
 - La actividad endógena de la enzima es de $11,5 \pm 2,2$ mU/oocito entre los meses de noviembre y marzo, y $4,3 \pm 0,7$ mU/oocito entre los meses de abril y agosto.
 - La enzima presenta cinética sigmoidea para pirofosfato, con un $K_{0,5}$ de alrededor de $460 \mu\text{M}$ y un nH de 3,65.
 - La cinética para UDP-glucosa es hiperbólica, con una $K_{m_{app}}$ de $50 \mu\text{M}$
- Se validó el método de electroforesis capilar para la detección y cuantificación de UTP y UDP-glucosa. Ello permitió la medición de la actividad de la UGPasa en el sentido de la formación de UDP-glucosa. Este resultado permitirá medir la enzima sin los problemas que presentan los métodos espectrofotométricos y el radioensayo.
- La enzima microinyectada en los oocitos permanece activa durante el tiempo que duran los experimentos.
- Los valores de coeficiente de control para la enzima UGPasa en la síntesis de glicógeno fueron de 0,15 para la vía directa y 0,05 para la vía indirecta.
- La GS se activó intracelularmente de 2 a 3 veces con glucosa-6-P 2 mM. La máxima activación estuvo entre 5 a 10 min después de la inyección del metabolito.

- El coeficiente de control para la enzima GS en la vía directa de síntesis de glicógeno fue 0,01.
- Los resultados obtenidos permiten afirmar que es la HK y no la GS la enzima que controla mayormente el flujo en la vía de síntesis de glicógeno.
- La suma de los coeficientes de control de las enzimas en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos de anfibio fue 0,96.

VII.- REFERENCIAS

Aksamit, R.R., y Ebner, K.E. (1972) Purification, properties and kinetic análisis of UDP-glucose pyrophosphorylase from bovine mammary tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 268, 102-112.

Baéz, M.A. (2000) Estudio de la glicógeno sintasa de oocitos: activación *in vivo* e *in vitro* por glucosa-6-P. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile.

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.

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

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

Carlson, D.M., y Hansen, R.G. (1962) The isolation and synthesis of guanosine diphosphate glucose. *J. Biol. Chem.* 237, 1260-1265.

Cicirelli, M.F., Robinson, K.R., y Smith, D. (1983) Internal pH of *Xenopus* oocytes: a study of the mechanism and role of pH changes during meiotic maturation. *Dev. Biol.* 100, 133-146.

Cornish-Bowden, A. (2002) *Fundamental of enzyme kinetics*. Chapter 10: Kinetics of multi-enzyme system. Portland Press, London

Dickerson, R.E. (1971) The structure of cytochrome c and the rate of molecular evolution. *J. Mol. Evol.* 1, 26-45.

Duggleby, R.G., Chao, Y.C., Huang, J.G., Peng, H., y Chang, H. (1996) Sequence differences between human muscle and liver cDNAs for UDPglucose pyrophosphorylase and kinetic properties of the recombinant enzymes expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 235, 173-179.

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

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.

Gustafson, G.L., y Gander, J.E. (1972) Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from *Sorghum vulgare*. Purification and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 247, 1387-1397.

Hall, T.A. (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 98/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.

Heinrich, R. y Rapoport, T.A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* 42, 89-95

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

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

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

Kleczkowski, L.A., Geisler, M., Ciereszko, I., y Johansson, H. (2004) UDP-glucose pyrophosphorylase. And old protein with new tricks. *Plant Phys.* 134, 912-918.

Kleczkowski, L.A., Martz, F., y Wilczynska, M. (2005) Factors affecting oligomerization status of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Phytochem.* 66, 2815-2821.

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., Torres N.V. (1987) La teoría del control y su aplicación al metabolismo. *Anales de química* 83, 224-243

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.

Munich-Petersen, A. (1955) Investigations of the properties and mechanism of the uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase reaction. *Acta. Chem. Scand.* 9, 1523-1536.

Preller, A. 1988. Función de las isoenzimas de hexoquinasa en la utilización de glucosa en oocitos de anfibio. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Universidad de Chile.

Preller, A., Kessi, E., y Ureta, T. (2007) Glycogen synthesis by the direct or indirect pathways depends on glucosa availability: In vivo studies in frog oocytes. *FEBS letters* 581, 663-666.

Quiroga, D.R. (2006) Coeficientes de control para las enzimas fosfoglucomutasa y glicógeno sintasa en la vía directa de síntesis de glicógeno en oocitos de *Caudiverbera caudiverbera*. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile.

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

Rudick, V.L., y Weisman, R.A. (1974) Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase of *Acanthamoeba castellanii*. Purification, kinetic, and developmental studies. *J. Biol. Chem.* 249, 7832-7840.

Shulman, R.G., Bloch, G., y Rothman, D.L. (1995) In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8535-8542.

Sowokinos, J.R., Spychalla, J.P., y Desdorough, S.L. (1993) Pyrophosphorylase in *Solanum tuberosum*. IV. Purification, tissue localization, and physicochemical properties of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Plant. Physiol.* 101, 1073-1080.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Turnquist, R.L., Gillet, T.A., y Hansen, R.G. (1974) Uridine diphosphate pyrophosphorylase. Crystallization and properties of the enzyme from rabbit liver and species comparisons. *J. Biol. Chem.* 249, 7695-7700.

Turnquist, R.L., y Hansen, R.G. (1973) *Uridine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase*. En Boyer, P.D., ed., *The Enzymes*, Ed 3, Academic Press, New York, Vol VIII, 51-71.

Ureta, T., Fernandez, 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.

Ureta, T., y Radojkovic, J. (1987) Organization of glucose metabolism: A model of compartments by poly-isozyemic complexes. *En* Welch, G.R., Clegg, J.S., y Srere, P.A. (Eds) *The organization of cell metabolism*. Plenum Press. pp. 131-142.

Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medraño-Fernández, I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., Rodríguez de Córdoba, S., y Guinovart, J.J. (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neuroscience* 10, 1407-1413.

Wilson, C.A.M., Preller, A., Valenzuela, M.A., y Ureta, T. (2007) Measurement of glycogen synthase activity in crude extracts by CE. *Electrophoresis* 28, 2888-2892.