

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
 FACULTAD DE FARMACIA
 Dpto. de BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

**CARACTERIZACION DE LA
 6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA/FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATASA
 EN EL HIGADO DE RATA DURANTE LA TRANSICION
 FETAL-NEONATAL.**

Ponente: Sr. Dr.

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Manuel R. Benito de las Heras

Vocal: Sr. Dr. Jose P. Garcia Ruiz

Vocal: Sr. Dr. Elesterio Hernandez Miguel

Vocal: Sr. Dr. Luis Alvarez Garcia

Secretario: Sr. Dr. Geny Romero Romero

MARTA CASADO PINNA
 Madrid, 1996

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Dpto. de BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

**CARACTERIZACION DE LA
6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA/FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATASA
EN EL HIGADO DE RATA DURANTE LA TRANSICION
FETAL-NEONATAL.**

Memoria de Tesis para optar al grado de doctora presentada por
MARTA CASADO PINNA

Directora de Tesis:
Dra. Paloma Martín-Sanz

Madrid, 1996

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica Centro Mixto CSIC-UCM. Facultad de Farmacia U.C.M. Madrid, bajo la dirección de la Dra. Paloma Martín-Sanz, con ayuda de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años de tesis muchas han sido las personas a quienes tengo que agradecer, no sólo mi formación científica sino especialmente el haberme ayudado a formarme un poco más como persona.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Paloma Martín-Sanz por haberme aceptado en el laboratorio, por todo su interés, su ejemplo y el continuo apoyo que me ha proporcionado durante la realización del presente trabajo.

Deseo también expresar mi agradecimiento al Dr. Ruiz-Amil y al Dr. Benito de las Heras por la buena acogida que me brindaron en este departamento y a la Dra. Evangelina Palacios por haber aceptado ser mi tutora.

Mi más sincero agradecimiento a los Dres. Lisardo Boscá y María José Martínez Díaz-Guerra gracias a cuya colaboración y ayuda ha sido posible la realización de buena parte de esta tesis.

A Mina, Sonsoles, Nuria, Marta, Teresa, Francisco, Fede, Beatrice, Fulvia, Ana..... por haber sido unos magníficos compañeros y amigos y haberme soportado durante todo este tiempo. Gracias por todos vuestros buenos detalles. A Oscar le agradezco haberme prestado su ayuda cuando se lo he solicitado.

Quiero agradecer a la Dra. María Cascales y a Lola Velasco su acogida, ayuda y amistad.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. J.N. Octave (Bruselas, Bélgica) y al Dr. Pilkis (Minesota, Estados Unidos) por permitirme trabajar en sus laboratorios y conocer cómo se hace ciencia en otros países. Al Dr. Lange por ocuparse de mí tras el desgraciado fallecimiento del Dr. Pilkis y a todo el grupo del laboratorio del Dr. Pilkis (Dave, Doriane, Sara, Tara...) por hacer mi estancia en Estados-Unidos mucho más fácil y agradable.

Gracias a todos los que han estado y siguen estando en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II por los buenos y malos ratos que han compartido conmigo.

Gracias a todo el personal del Instituto de Bioquímica (Manolo, Angel, Maribel, Adoración....) por hacer parte de mi trabajo más fácil.

Muchas gracias a mis amigos Lulu, Carola, Inma, Cota, Teté, Clara, Judith, Cinta, Pilar....por haberme apoyado fuera de mi trabajo y haberme animado a que siguiera adelante.

Quiero dar las gracias a mi familia por apoyarme y haber creído en mí, especialmente a mis abuelos a los que por desgracia no podré decírselo personalmente.

Finalmente quiero dar las gracias a mis padres y a mis hermanos porque sin vosotros no hubiera sido capaz de realizar este ni ningún otro trabajo.

ABREVIATURAS

ADP:	Adenosina 5' bisfosfato
ADN:	Acido desoxiribonucléico
ADNc:	Acido desoxiribonucléico complementario
Ala:	Alanina
ALD:	Aldolasa
AMP:	Adenosina 5' monofosfato
AMPc:	Adenosina 5' monofosfato cíclico
Arg:	Arginina
ARN:	Acido ribonucléico
ARNm:	Acido ribonucléico mensajero
ARNt:	Acido ribonucléico de transferencia
Asp:	Aspártico
ATP:	Adenosina 5' trifosfato
bp:	Pares de bases
CNBr:	Bromuro de cianógeno
cpm:	Cuentas por minuto
Cys:	Cisteína
dCTP:	Deoxicitidina 5' trifosfato
DEPC:	Dietilpirocarbonato
Dex:	Dexametasona
DMEM:	Medio Dulbecco modificado por sales de Eagle
DTT:	DL-Ditiotreitol
ECL:	Sistema intensificador de quimioluminiscencia para Western blot
EEM:	Error standard de la media
EDTA:	Acido etilén-diamino-tetra-acético
EGTA:	Acido etilén-glicol-bis (β -amino etilén-N,N'-tetraacético)
Fru 6P:	Fructosa 6-fosfato
Fru-1,6-P₂:	Fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-2,6-P₂:	Fructosa-2,6-bisfosfato
FBPasa1:	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
FBPasa2:	Fructosa-2,6-bisfosfatasa
GK:	Glucoquinasa
sn-glicerol 3P:	Glicerol 3-fosfato
Glu:	Glutámico
Glu 6P:	Glucosa 6-fosfato
Gly:	Glicina
GTP:	Guanosina 5' trifosfato
Hepes:	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etil-sulfónico
HGF:	Factor de crecimiento del hepatocito
His:	Histidina
Ins:	Insulina
kDa:	Kilodalton
Kb:	Kilobase
Km:	Constante de afinidad
Ki:	Constante de inhibición
Leu:	Leucina
Lys:	Lisina

MOPS:	Acido 4-morfolinopropanosulfónico
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP⁺:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
dNTPs:	Deoxinucleótidos trifosfato
PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción de la polimerasa en cadena
PEPCK:	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK-1:	6-fosfofructo 1-quinasa
PFK-2:	6-fosfofructo 2-quinasa
PFP:	Pirofosfato fructosa 6-fosfato 1 fosfotransferasa
Pi:	Fosfato inorgánico
Pipes:	Acido 1,4-piperazin-dietil-sulfónico
PK:	Piruvato quinasa
PKA:	Proteína quinasa A
PKC:	Proteína quinasa C
PMSF:	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PPI:	Pirofosfato
PPIPFK:	6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato
Pro:	Prolina
RMN:	Resonancia magnética nuclear
SDS:	Dodecil sulfato sódico
Ser:	Serina
T3:	Tiroxina
TGFβ:	Factor de crecimiento transformante beta
TIM/GDH:	Triosafosfato isomerasa/glicerín-3-fosfato dehidrogenasa
Thr:	Treonina
Tris:	Tris-(hidroximetil)-amino metano
UTP:	Uridina 5' trifosfato
Vmax:	Velocidad máxima

Indice

Capítulo 1: Introducción	1
1.- Generalidades	1
2.- Caracterización de los isoenzimas de PFK-2/FBPasa2	5
2.1.- PFK-2/FBPasa2 hepática (Tipo L)	7
2.1.1.- 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK-2)	9
2.1.2.- Fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa2)	11
2.1.3.- Regulación de la PFK-2/FBPasa2 hepática	12
2.1.3.1.- Fosforilación de la L-PFK-2/FBPasa2	12
2.1.3.2.- Regulación por ADP-ribosilación	16
2.2.- PFK-2/FBPasa2 de corazón (Tipo H)	16
2.3.- PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético (Tipo M)	18
2.4.- PFK-2/FBPasa2 de cerebro	18
2.5.- PFK-2/FBPasa2 de testículo	19
2.6.- PFK-2/FBPasa2 de líneas celulares	20
2.7.- Otros isoenzimas PFK-2/FBPasa2	21
3.- Los genes de los isoenzimas PFK-2/FBPasa2	22
3.1.- Gen A de la PFK-2/FBPasa2	22
3.1.1.- Promotor L	23
3.1.2.- Promotor M	25
3.1.3.- Promotor F	26
3.2.- Estructura del gen B que codifica al isoenzima de corazón	27
4.- Control hormonal de la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa2	29
4.1.- Glucocorticoides	29
4.2.- Hormonas tiroideas	30
4.3.- Insulina y glucagón	31
4.4.- Factores de crecimiento, ésteres de forbol y oncogenes	32
Objetivos	33
Capítulo 2: Material y Métodos	35
1.- Materiales	35
1.1.- Equipo instrumental	35
1.2.- Reactivos	36

1.3.- Material biológico	36
1.3.1.- Animales	36
1.3.2.- Preparación de homogeneizados hepáticos	37
1.3.3.- Aislamiento de hepatocitos	37
1.3.3.1.- Aislamiento de hepatocitos adultos	37
1.3.3.2.- Aislamiento de hepatocitos fetales	38
1.3.3.3.- Condiciones de cultivo	39
1.3.4.- Transformación de bacterias competentes. Preparación de plásmidos. Obtención de insertos	40
2.- Métodos	42
2.1.- Determinación de Fru-2,6-P ₂	42
2.2.- Determinación de la actividad quinasa de la PFK-2/FBPasa2	42
2.3.- Detección con anticuerpos de la PFK-2/FBPasa2	43
2.3.1.- Preparación de anticuerpos	43
2.3.2.- Análisis por Western blot	43
2.4.- Extracción de ARN total	44
2.5.- Obtención de poliA-ARN	45
2.6.- Análisis por Northern blot	46
2.7.- Hibridación en solución/Ensayo de protección con ARNasas	48
2.8.- Reacción de extensión con cebador ("Primer extension")	50
2.9.- Análisis por RT-PCR del ARN de la PFK-2/FBPasa2	51
2.10.- Secuenciación de los productos amplificados por PCR	53
2.11.- Determinación de proteínas	54
2.12.- Métodos estadísticos	54
Capítulo 3: Resultados	55
1.- Estudio de la regulación hormonal de la PFK-2/FBPasa2 en el hígado fetal .	55
1.1.- Efecto del glucagón y del AMPc en la actividad quinasa y en la cantidad de PFK-2/FBPasa2 en cultivo primario de hepatocitos fetales y adultos . . .	55
1.2.- Efecto del glucagón y del AMPc sobre los niveles de ARNm de la PFK- 2/FBPasa2 en hepatocitos fetales	56

1.3.- Regulación por glucocorticoides de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales	66
1.4.- Regulación por insulina y tiroxina de la PFK-2/FBPasa2 presente en hepatocitos fetales	68
1.5.- Estudio de la estabilidad del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales de rata	74
2.- Caracterización de la PFK-2/FBPasa2 durante la transición fetal-neonatal en el hígado de rata	77
2.1.- Actividad quinasa durante la transición fetal-neonatal	78
2.2.- Estudio inmunológico de la PFK-2/FBPasa2 durante la etapa perinatal mediante anticuerpos específicos	80
2.3.- Reconocimiento diferencial del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 durante la transición fetal-neonatal en el hígado de rata	81
3.- Caracterización de las formas de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presentes en el hígado fetal	84
4.- Caracterización de las especies de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presentes en el hígado fetal mediante el análisis por transcripción en reverso-reacción de la polimerasa en cadena	94
5.- Identificación del extremo 5' del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específico de hígado fetal. Reacción de extensión con cebador ("Primer extension")	98
Capítulo 4: Discusión	101
Conclusiones	106
Bibliografía	108

Capítulo 1: Introducción

1.- Generalidades

Fue en el año 1909 cuando Young aisló, a partir de levadura en fermentación, la primera fructosa bisfosfato, la fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-P₂), identificada años más tarde, en 1928, por Levene y Raymond. Tuvieron que transcurrir 71 años para que se aislara una segunda fructosa bisfosfato, la fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), que se descubrió en 1980 a raíz de las investigaciones realizadas para elucidar el mecanismo por el cual el glucagón, vía su segundo mensajero el AMPc, estimula la gluconeogénesis e inhibe la glucolisis hepáticas (Van Schaftingen et al., 1980). La Fru-2,6-P₂ se encuentra en eucariotas, incluyendo levaduras y plantas superiores, pero no en procariontes. Su síntesis a partir de Fru 6P y ATP y su hidrólisis a Fru 6P y Pi son catalizadas por los enzimas 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK-2) y fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa2), respectivamente. Las dos actividades copurifican como un enzima homodímero bifuncional (PFK-2/FBPasa2) (El-Maghrabi et al., 1982a), siendo uno de los cinco enzimas bifuncionales conocidos que catalizan reacciones opuestas y el único cuyo sustrato es un metabolito y no una proteína.

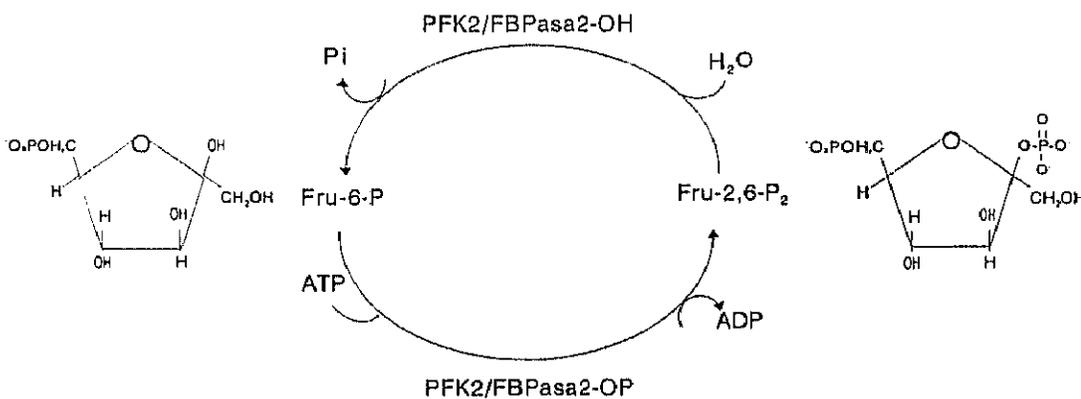


Figura 1.1. Síntesis y degradación de la Fru-2,6-P₂. Adaptada de Van Schaftingen (1990).

La Fru-2,6-P₂ es un potente activador del enzima glucolítico 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1) (Van Schaftingen et al., 1981) y un inhibidor del enzima gluconeogénico fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa1) (Pilkis et al., 1981). La unión de la Fru-2,6-P₂ a su sitio activo en la PFK-1 provoca un incremento en la afinidad del enzima hacia su sustrato, Fru 6P, una

disminución en la sensibilidad del enzima a la inhibición por ATP y una mejora de la unión de otro activador alostérico de la PFK-1, el AMP (Kemp y Marcus, 1990). Con relación a la inhibición de la FBPasa1 por la Fru-2,6-P₂ se han sugerido dos mecanismos de acción de la Fru-2,6-P₂ sobre la FBPasa1. Un grupo de investigadores sugieren una interacción de tipo alostérico entre el azúcar bisfosfato y el enzima, apoyándose en el hecho de que la Fru-2,6-P₂ modifica la cinética de la FBPasa1 hacia su sustrato de un perfil hiperbólico a uno sigmoideo (Meek y Nimo, 1983). El segundo mecanismo de acción implica la unión del metabolito bisfosfato al sitio activo de la FBPasa1, teniendo en cuenta que la presencia del sustrato Fru-1,6-P₂ permite la unión de la Fru-2,6-P₂ e impide la inhibición causada por la modificación química del sitio activo (McGrane et al., 1983).

La PFK-1 y FBPasa1 catalizan la interconversión de Fru 6P y Fru-1,6-P₂. El efecto neto de la acción de ambos enzimas es simplemente la hidrólisis de ATP a ADP y Pi, un ciclo fútil. Con el fin de conservar la disponibilidad de sustratos energéticos, es importante para la célula que los dos enzimas tengan mecanismos de regulación opuestos, es decir, que cuando la PFK-1 (glucolisis) se active, la FBPasa1 (gluconeogénesis) se inhiba, y viceversa. En este sentido la Fru-2,6-P₂ es, por tanto, un eficiente regulador metabólico.

En el hígado, en presencia de concentraciones fisiológicas de sustratos y efectores, la PFK-1 es casi completamente inactiva a menos que concentraciones de Fru-2,6-P₂ del rango micromolar estén presentes para liberar al enzima de la inhibición inducida por ATP. Las concentraciones de Fru-2,6-P₂ están en ese rango (Reinhart y Lardy, 1980), por lo que, en el hígado, la Fru-2,6-P₂ juega un papel principal en la estimulación de la glucolisis en el estado postprandial (cuando la disponibilidad de sustratos energéticos es máxima y prevalece el papel anabólico de la glucolisis), mientras que durante la anoxia serían otros factores tales como nucleótidos de adenina y Pi los que jugarían el principal papel regulador, ya que la concentración hepática de la Fru-2,6-P₂ disminuye, probablemente debido al aumento en la concentración de glicerol 3P que tiene lugar durante la anoxia (fig. 1.2).

En cerebro, médula renal, músculo tetánico, eritrocitos y células espermáticas, la glucolisis es el principal mecanismo para la provisión de disponibilidad de sustratos energéticos. En estos tejidos, la Fru-2,6-P₂ no parece estar implicada en el control de la glucolisis, ya que su concentración no está relacionada con los cambios en el flujo glucolítico

(Yamamoto et al., 1990). Cuando la provisión de disponibilidad de sustratos energéticos es el papel principal que desempeña la glucólisis, el control probablemente lo ejercen los nucleótidos de adenina, el Pi y el citrato en vez de la Fru-2,6-P₂.

Muchos tumores y células de rápido crecimiento mantienen una elevada glucólisis incluso bajo condiciones aeróbicas, el denominado efecto Warburg. El incremento de la glucólisis se debe en parte a un aumento en el transporte de hexosas y en la concentración de Fru-2,6-P₂. Una de las características de las células en proliferación es su contenido relativamente elevado de Fru-2,6-P₂. De hecho, una de las concentraciones más elevadas del metabolito bisfosfato se ha detectado en fibroblastos tratados con ésteres de forbol o transformados con v-src (Boscá et al., 1985 y 1986; Marchand et al., 1992), que es cincuenta veces superior a la requerida para alcanzar la mitad del efecto máximo en la estimulación de la PFK-1.

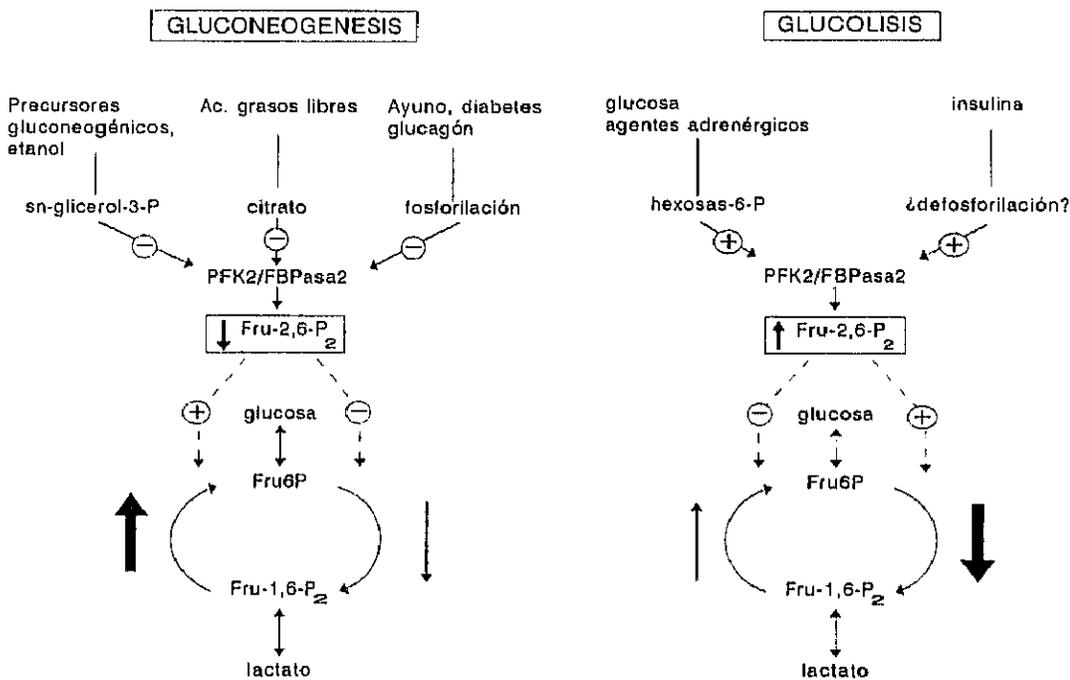


Figura 1.2. Papel de la Fru-2,6-P₂ en el control a corto plazo de los flujos glucolítico/gluconeogénico hepáticos. Adaptada de Rousseau y Hue (1993).

La Fru-2,6-P₂ está presente en una variedad de plantas tanto en tejidos no fotosintéticos como en las hojas y, aunque principalmente se encuentra confinada en el citosol, actúa coordinando la actividad metabólica en diferentes compartimientos subcelulares, concretamente controlando la interconversión de sacarosa (en el citosol) y almidón (en los plastos). Los dos únicos enzimas sobre los que la Fru-2,6-P₂ actúa en plantas son la pirofosfato fructosa 6-fosfato 1 fosfotransferasa (PFK) y la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa1), que al igual que el metabolito bisfosfato, se localizan en el citosol (MacDonald y Buchanan, 1990). A excepción de una escasa activación (10%) de la PFK-1 altamente purificada de raíz de zanahoria, no hay evidencias de que tanto la forma plastídica como la citosólica de la PFK-1 sean sensibles a Fru-2,6-P₂.

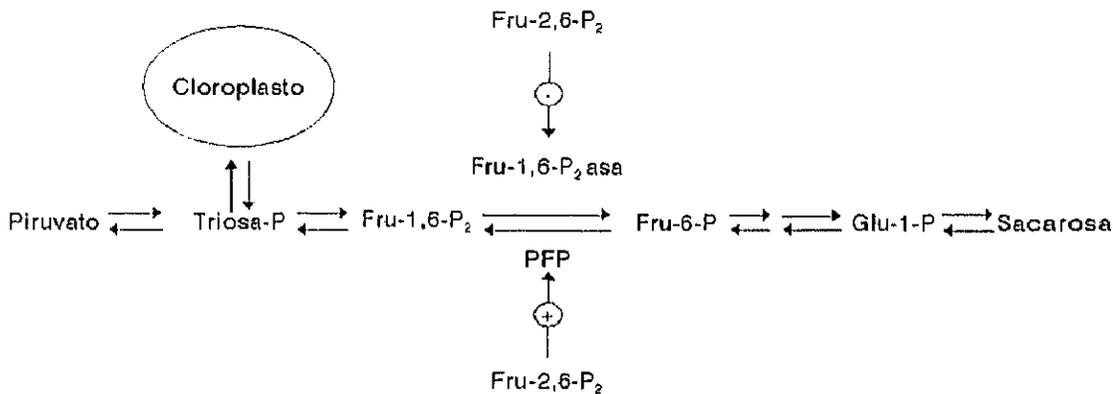


Figura 1.3. Papel de la Fru-2,6-P₂ en plantas. Adaptada de MacDonald y Buchanan (1990).

La PFK-1 de levaduras se activa por concentraciones micromoleculares de Fru-2,6-P₂ y, al igual que ocurre con el enzima de mamíferos, la unión de la Fru-2,6-P₂ incrementa la afinidad de la PFK-1 por AMP (Kessler et al., 1982). En levaduras, la Fru-2,6-P₂ también controla el metabolismo de carbohidratos a través de la inhibición de la FBPasa1 (Noda et al., 1984). La Fru-2,6-P₂ participa en el control de la gluconeogénesis no sólo inhibiendo la actividad bisfosfatasa, sino también estimulando su fosforilación, señal que indica el inicio de la proteólisis de la FBPasa1 de levaduras. Probablemente, la Fru-2,6-P₂ cambie la conformación de la FBPasa1 de tal forma que la hace más susceptible a la fosforilación (Pohlig et al., 1983).

La Fru-2,6-P₂ también está presente en Tripanosomas, Euglenas, Dunaliellas, en el

moho celular del cieno *Dictyostelium discoideum*, así como en las esporangiosporas de *Phycomyces blakesleeanus*. No se ha detectado en *Trichomonas*, *Isotricha*, en las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus albus*, *Streptomyces lividans* o en las bacterias fotosintéticas *Nostoc muscorum* y *Prochloron* (Van Schaftingen et al., 1990). Sin embargo, la FBPasa1 de *E. coli* es inhibida competitivamente por la Fru-2,6-P₂, aunque a diferencia del enzima hepático, esta inhibición no es sinérgica con el AMP (Marcus et al., 1984).

2.- Caracterización de los isoenzimas de PFK-2/FBPasa2

Como ya se ha mencionado anteriormente, la síntesis y la degradación de la Fru-2,6-P₂ están catalizadas por el enzima bifuncional PFK-2/FBPasa2 (E.C. 2-7-1-105/E.C. 3-1-3-46) (fig. 1.1). A la vista de los diferentes papeles en los que está implicada la Fru-2,6-P₂, no sorprende la existencia de diversos isoenzimas de la PFK-2/FBPasa2 que capacitan a los diferentes tejidos para responder de manera distinta tanto a hormonas y nutrientes como al desarrollo y a estados patológicos.

Desde el descubrimiento de la PFK-2/FBPasa2 de hígado de rata (El-Maghrabi et al., 1982a, 1982b; Lively et al., 1988), se han identificado otras cuatro isoformas en mamíferos presentes en músculo esquelético (Darville et al., 1989; Kitamura et al., 1989), corazón (Kitamura y Uyeda, 1987; Tsuchya y Uyeda, 1994), testículo (Sakata et al., 1991) y cerebro (Ventura et al., 1992), así como dos formas de PFK-2/FBPasa2 de levaduras, PFK26 (Kretschmer y Fraenkel, 1991) y FBP26 (Kretschmer et al., 1992). La PFK-2/FBPasa2 también se ha detectado en músculo de anfibios (Pyko et al., 1993) e hígado de peces (DeFrutos y Baanante, 1994), siendo similares a las isoformas de músculo esquelético e hígado de rata, respectivamente. En plantas, hay evidencias de la existencia de un enzima bifuncional (Larondelle et al., 1986), aunque algunas plantas podrían tener una forma independiente de FBPasa2 (MacDonald et al., 1987).

Entre todas las isoformas de PFK-2/FBPasa2 descritas hasta el momento existe un alto grado de conservación de la estructura de los dominios quinasa y bisfosfatasa, encontrándose las mayores diferencias en la longitud y composición de las regiones amino y carboxiterminales, así como en la presencia o ausencia en dichas regiones de varios sitios de

fosforilación por proteína quinasas (fig. 1.4). Así, por ejemplo, las secuencias primarias de los dominios quinasa y bisfosfatasa de los enzimas de hígado de rata y corazón bovino son un 86% idénticas, mientras que sus regiones amino y carboxiterminales comparten tan solo un 29% y un 42% de homología, respectivamente (Lange et al., 1991). Además de haber una elevada homología entre los tejidos, también existe un alto grado de identidad entre distintas especies. Por ejemplo, la homología a nivel de la secuencia de aminoácidos de los enzimas de hígado humano (Lange y Pilkis, 1990; Lange et al., 1993) y de hígado de rata (Colosia et al., 1987; Darville et al., 1987; Colosia et al., 1988) con el enzima presente en hígado bovino (Lange et al., 1991) es de un 98.3% y 97%, respectivamente.

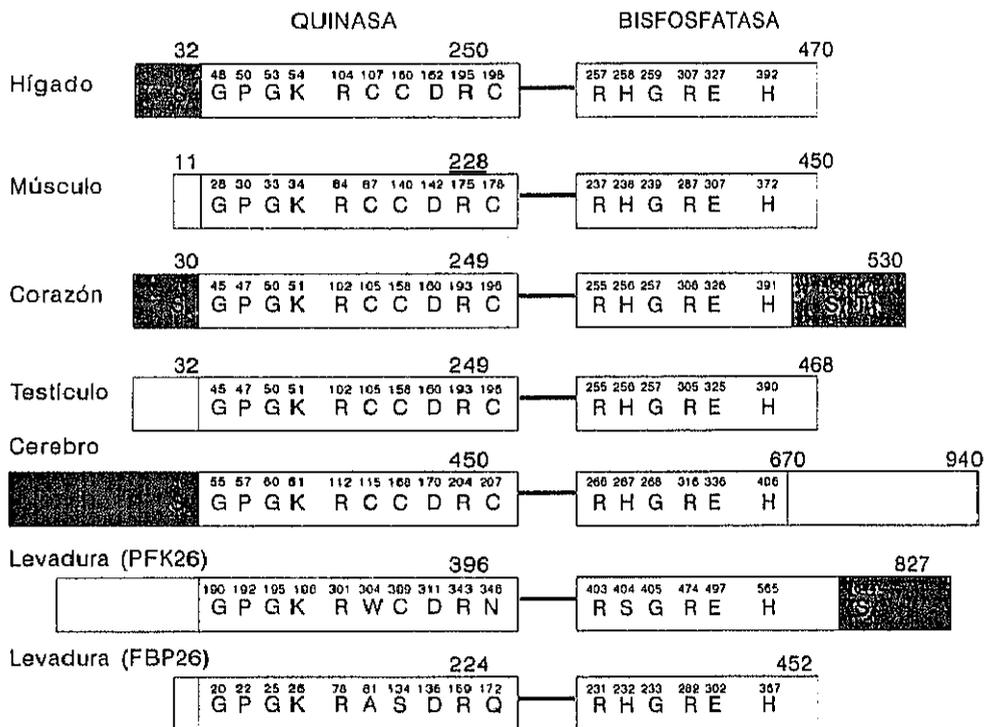


Figura 1.4. Isoformas de la PFK-2/FBPasa2: grado de conservación de sus dominios quinasa y bisfosfatasa. Adaptada de Kurland y Pilkis (1995). Los dominios quinasa y bisfosfatasa se indican con cajas abiertas especificándose la posición de los residuos catalíticamente importantes. Las cajas sombreadas corresponden a las regiones amino y carboxiterminales que contienen sitios de fosforilación por PKA (A) o PKC (C). Las regiones amino o carboxiterminales que no contienen sitios de fosforilación se indican, al igual que los dominios quinasa y bisfosfatasa, como cajas abiertas.

Aún cuando las estructuras de los dominios quinasa y bisfosfatasa están altamente conservadas, hay claras diferencias en las propiedades cinéticas de las distintas PFK-2/FBPasa2 tejido-específicas (fig. 1.5). Con respecto a las isoformas de hígado de rata, testículo y cerebro bovinos, que presentan valores de V_{max} similares para sus actividades quinasa y bisfosfatasa, el enzima de músculo esquelético tiene una relación de actividad quinasa/bisfosfatasa baja, mientras que el enzima de corazón bovino se encuentra en el extremo opuesto, con una relación de actividades PFK-2/FBPasa2 elevada (Pilkis et al., 1995). Dado que entre todas las isoformas las regiones amino y carboxiterminales son las áreas de menor homología (fig. 1.4), las diferencias cinéticas mostradas en la figura 1.5 corroboran la hipótesis de que estas regiones son las responsables de la adaptación de las propiedades catalíticas de cada una de las distintas isoformas a las exigencias metabólicas de cada tejido (Kurland y Pilkis, 1995).

2.1.- PFK-2/FBPasa2 hepática (Tipo L)

La PFK-2/FBPasa2 hepática fue el primer isoenzima en ser purificado a homogeneidad, observándose que sus actividades quinasa y bisfosfatasa copurificaban como una proteína homodimérica con idénticas subunidades de 55 kDa (El-Maghrabi et al., 1986). Cada subunidad se divide en tres dominios: un dominio aminoterminal regulador (residuos 1 al 32), un dominio quinasa (residuos 33-250) y un dominio bisfosfatasa (residuos 251-470) (Lively et al., 1988) (Fig. 1.4). La prueba de la existencia de los dominios se obtuvo cuando cada uno de ellos se expresó de manera independiente en *E. coli* mediante técnicas de DNA recombinante. Cuando el dominio bisfosfatasa (residuos 227-470) se expresó en *E. coli*, sus propiedades cinéticas fueron idénticas al dominio fosfatasa del enzima bifuncional, a excepción de comportarse como un monómero de 30 kDa, mientras que en el enzima bifuncional actúa como un dímero (Tauler et al., 1988). El dominio quinasa expresado en *E. coli* (residuos 1-257) también es catalíticamente activo aunque la afinidad por ATP y Fru 6P se reduce en comparación con la actividad quinasa del enzima bifuncional (Tauler et al., 1989). La expresión de los dos dominios en *E. coli* proporciona una sólida evidencia para la hipótesis de que el enzima hepático consiste en dos dominios catalíticos independientes codificados por un gen fusionado.

	Hígado	Músculo Esquelético	Corazón bovino	Testículo bovino	Cerebro bovino
TAMAÑO (aa)	470	450	570	468	940
QUINASA Vmax mU/mg	113	5.3	180	90	90
Km Fru 6P (μ M)	20	803	50	16	27
Vmax/Km	5.6	0.007	3.6	5	3.3
BISFOSFATASA Vmax mU/mg	45	112	2.2	22	29
Km Fru-2,6-P ₂ (μ M)	0.005	0.01	40	>1	0.4
Vmax/Km	9000	11200	0.055	22	0.4
Formación fosfoenzima mol/mol	1.0	1.0	0.05	0.6	0.7
Relación de actividades PFK-2/FBPasa2	2.5	0.05	80	4	3

Figura 1.5. Comparación de las propiedades cinéticas de varias isoformas PFK-2/FBPasa2. Adaptada de Pilkis et al. (1995).

Para identificar los dominios catalíticos fue necesario determinar la secuencia primaria de la proteína. Esto se realizó por secuenciación directa del enzima hepático purificado y por métodos de clonaje que implican el análisis con anticuerpos de una librería de ADNc de hígado de rata expresada en λ gt11 (Lively et al., 1988). La proteína madura se compone de 470 aminoácidos, siendo el residuo aminoterminal una serina acetilada. El análisis de la secuencia primaria reveló que los dominios quinasa y bisfosfatasa son estructuralmente similares a los enzimas glucolíticos PFK-1 y fosfoglicerato mutasa (PGM), respectivamente (Bazan et al., 1989). Este análisis confirma la hipótesis de que la PFK-2/FBPasa2 es producto de una fusión génica de unidades catalíticas quinasa y mutasa/fosfatasa.

2.1.1.- 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK-2)

La actividad quinasa cataliza la síntesis de Fru-2,6-P₂ a partir de Fru 6P y ATP-Mg²⁺. Transfiere el grupo γ -fosfato del ATP a la posición 2 de la Fru 6P, implicando un desplazamiento en línea en el cual el grupo 2-hidroxil del sustrato unido al enzima ataca directamente al grupo γ -fosfato del ATP (Kountz et al., 1988). La PFK-2 prefiere ATP como donador de fosfato aunque también puede utilizar GTP y (γ -S)ATP (Pilkis et al., 1995). La L-sorbose 6P puede servir también como fosfoceptor (Pilkis et al., 1985). El pH óptimo de la reacción quinasa está entre 8 y 9 (El-Maghrabi et al., 1984). El enzima hepático está saturado por ATP-Mg²⁺, es estimulado por fosfato y arsenato (Kountz et al., 1986) y es inhibido por los dos productos de la reacción ADP y Fru-2,6-P₂ (K_i=50 μ M), al igual que por citrato (K_i=0.5 mM), fosfoenolpiruvato (K_i=0.5 mM) y sn-glicerol 3P a concentraciones fisiológicas. La K_m de la PFK-2 por Fru 6P se ha descrito entre 50-140 μ M.

Los grupos sulfhidrilo son importantes para la actividad PFK-2. El tratamiento con iodoacetamida de la PFK-2/FBPasa2 de hígado de rata alquila las Cys 107, 160, 183 y 198 (El-Maghrabi et al., 1987), y supone un incremento de 10 veces en la actividad por Fru 6P y en la K_i para Fru-2,6-P₂. Todo ello implica a estos residuos de Cys como importantes en el mantenimiento de la conformación del sitio de unión de las hexosas fosfato (Crepin et al., 1993).

El alineamiento de la secuencia del dominio quinasa del enzima bifuncional hepático de rata con la secuencia de la PFK-1 de *E. coli* o *Bacillus stearothermophilus* (Shirakihara

y Evans, 1988), junto con experimentos de mutagénesis dirigida han permitido delimitar una serie de residuos claves estructural o funcionalmente en el dominio quinasa de la PFK-2/FBPasa2 (fig. 1.6). Los residuos Arg 195, Arg 225, Arg 230 y Arg 238 de la PFK-2 hepática estarían implicados en la unión con Fru 6P. Concretamente los residuos Arg 195 y Arg 225 son críticos en la unión al sustrato Fru 6P, mientras que los otros residuos de arginina, Arg 230 y Arg 238, estarían principalmente implicados en la unión al ATP (Li et al., 1992).

El sitio de unión a nucleótidos, también llamado nbf, fue primeramente descrito en la adenilato quinasa (Schulz et al., 1974). Nbf's similares se han identificado en los dominios de unión a nucleótidos en otras proteínas como, por ejemplo, p21 ras (Barbacid, 1987) y PFK-2/FBPasa2 (Hirst y Sternberg 1991). La secuencia Gly₄₈-Leu-Pro-Ala-Arg-Gly₅₃-Lys-Thr en el dominio quinasa de la PFK-2/FBPasa2 es similar al nbf presente en todas las PFK-1 dependientes de ATP (Bazan y Fletterick., 1990).

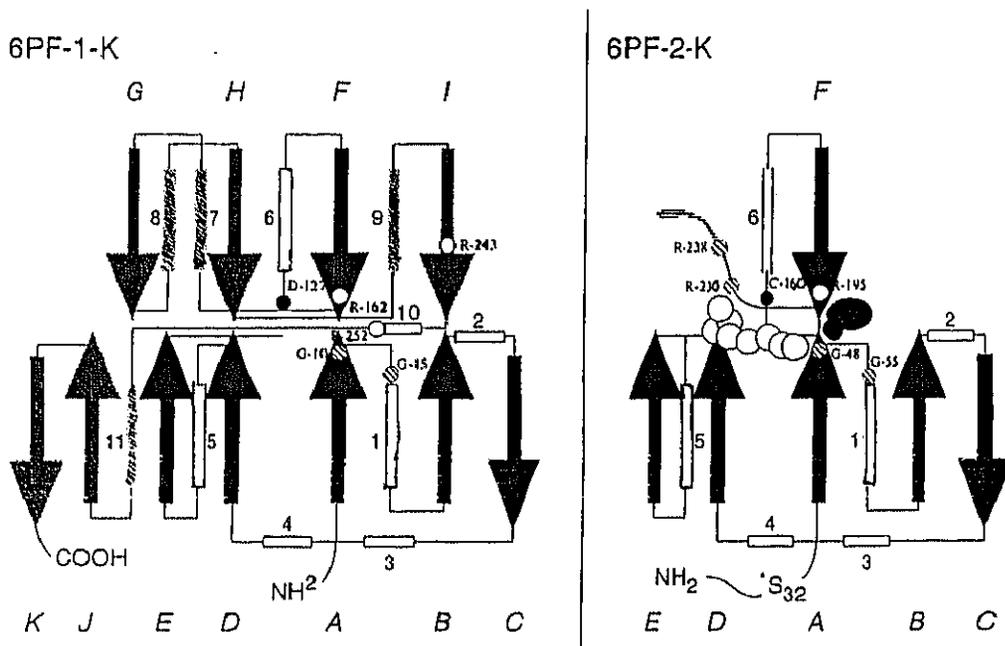


Figura 1.6. Comparación de la estructura de la PFK-1 de *B. stearothermophilus* con la hipotética topología del dominio quinasa de la PFK-2/FBPasa2 hepática. Adaptada de Pilkis et al. (1995). Las cadenas β y las regiones α -hélice se muestran como flechas cerradas y abiertas, respectivamente. Los elementos estructurales específicos de la PFK-2 aparecen en tramo rayado. Los residuos que unen ATP se indican como círculos rayados y aquellos que unen Fru 6P como círculos abiertos. La base catalítica Asp 127 en la PFK-1 y la correspondiente en la PFK-2 (Cys 160) se muestran como círculos cerrados.

2.1.2.- Fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa2)

La actividad bisfosfatasa cataliza la hidrólisis de la Fru-2,6-P₂ a Fru 6P y Pi. Es estimulada por Pi, sn-glicerol 3P y nucleósidos trifosfato. La reacción no requiere cationes divalentes, tiene un pH óptimo de 5.5-6.5 y es inhibida tanto por el sustrato (Fru-2,6-P₂) como por el producto de la reacción (Fru 6P) (Stewart et al., 1985). En contraste con la reacción quinasa, la hidrólisis de la Fru-2,6-P₂ se cataliza vía un intermedio fosfoenzima (EP) en un mecanismo clásico ping-pong (Pilkis et al., 1987). El intermedio fosforilado se ha confirmado recientemente por espectroscopía ³¹P RMN y contiene un residuo 3-fosfohistidina (Okar et al., 1995). La figura 1.7 muestra un esquema del mecanismo de reacción bisfosfatasa. La velocidad de formación del complejo EP es aproximadamente 100 veces la velocidad de hidrólisis, por lo que constituye el paso limitante de la reacción, como lo demuestra el hecho de que un exceso de Fru 6P inhibe la hidrólisis His-P en vez de su formación (Stewart et al., 1985).

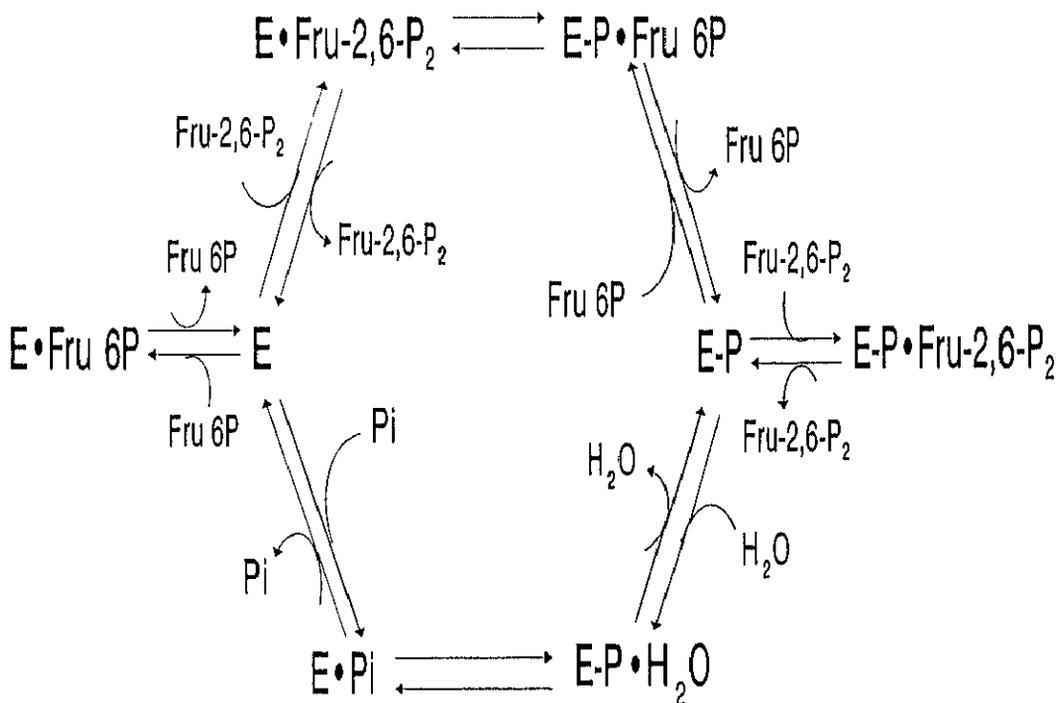


Figura 1.7. Mecanismo de la reacción bisfosfatasa de la PFK-2/FBPasa2

El dominio bisfosfatasa de la PFK-2/FBPasa2 comparte una secuencia homóloga con la familia de las fosfoglicerato mutasasas (PGM) (Lively et al., 1988). Al alinear la secuencia de la PGM de levadura y la secuencia de la PFK-2/FBPasa2 de hígado de rata, se comprobó que el centro catalítico del dominio bisfosfatasa implica la triada His 258, Glu 327 e His 392 (fig. 1.8). La His 258 es el fosfoceptor, como lo demuestra el hecho de que se marca al incubar el enzima con [2-³²P]Fru-2,6-P₂ (Stewart et al., 1985). La His 392 funciona como donador de protones al grupo saliente, Fru 6P (Tauler et al., 1990). Finalmente, el residuo Glu 327 estabiliza el estado protonado de la His 392 durante la formación del fosfoenzima (Lin et al., 1992a). Cualquier mutación en los residuos de His 392 y Glu 327 supone la disminución en la actividad bisfosfatasa y en la formación del intermedio fosforilado (Lin et al., 1992a), mientras que las mutaciones del residuo His 258 generan una forma de PFK-2/FBPasa2 carente de actividad bisfosfatasa al impedir la formación del fosfoenzima (Tauler et al., 1990).

Otros residuos importantes en el dominio bisfosfatasa de la L-PFK-2/FBPasa2 deducidos del análisis del modelo de la PGM de levadura son los residuos Arg 322, Lys 356 y Arg 360, que estarían implicados en la formación del sitio de unión sustrato/producto y los residuos Arg 257 y Arg 307 como sitios importantes para la unión del grupo 2-fosfato de la Fru-2,6-P₂ (Lin et al., 1992b) (fig. 1.8).

El modelo del dominio bisfosfatasa propuesto por Bazán y colaboradores basándose en la estructura de la PGM de levadura (Bazán et al., 1989), se confirmó gracias a la cristalización de una forma truncada de la PFK-2/FBPasa2 en los últimos 30 residuos carboxiterminales (residuos 251-440), forma que comparte esencialmente todas las propiedades cinéticas del dominio bisfosfatasa del enzima intacto a excepción de presentar una mayor V_{max} (Lee et al., 1995).

2.1.3.- Regulación de la PFK-2/FBPasa2 hepática

2.1.3.1.- Fosforilación de la L-PFK-2/FBPasa2

La isoforma de hígado de rata fue la primera forma del enzima bifuncional en la que se mostró la regulación por fosforilación catalizada por la PKA (El-Maghrabi et al., 1982b; Sakakibara et al., 1984; Rider et al., 1985).

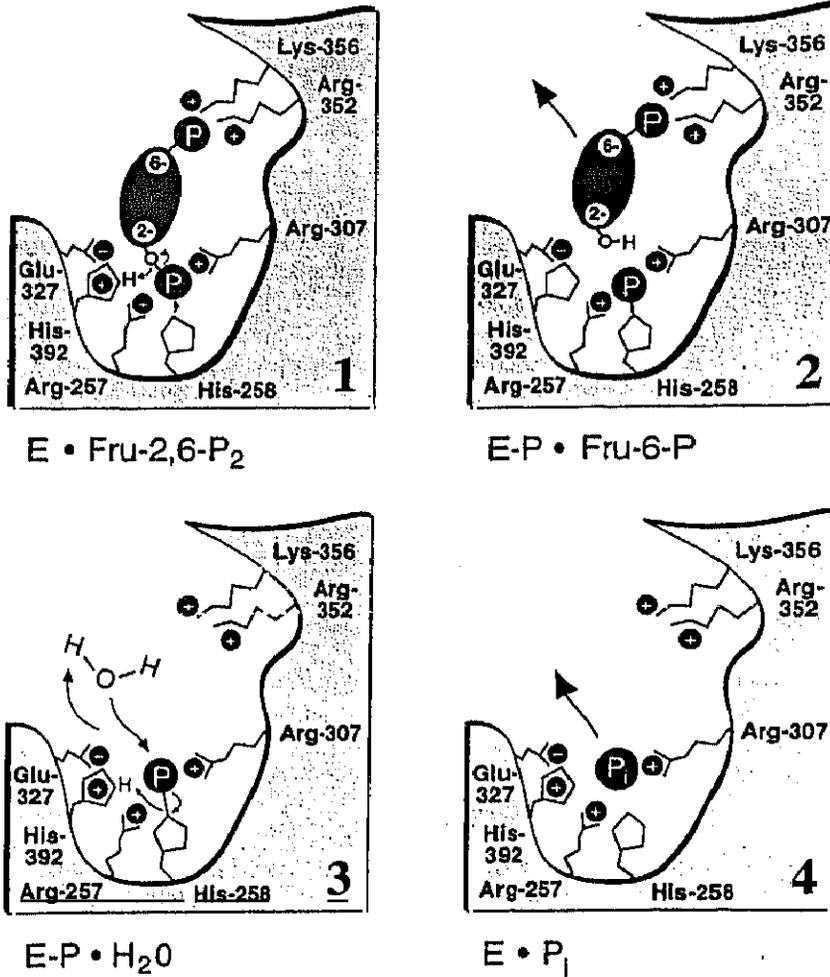


Figura 1.8. Esquema del mecanismo de reacción en la hidrólisis de la Fru-2,6-P₂, mostrando los residuos funcionalmente importantes. Adaptada de Pilkis et al. (1995). Paso 1: Durante la formación del E-P en la His 258, la His 392 actúa como donador de protones al oxígeno fosfoester del C2 del sustrato que se encuentra unido fuertemente a los residuos Arg 257 y Arg 307, mientras que el grupo 6-fosfato de la Fru-2,6-P₂ se une a la Lys 356. Paso 2: Tras la formación del intermedio 3-fosfohistidina, el grupo 6-fosfato de la Fru 6P se mantiene unido a los residuos Lys 356 y Arg 352. La carga negativa del grupo carboxilato del residuo Glu 327 mantiene a la His 392 en su estado protonado. Paso 3: Hidrólisis del fosfoenzima. El residuo Glu 327 podría actuar como base catalítica afectando la ionización del agua. Paso 4: El Pi es liberado de su unión a Arg 257 y Arg 307.

La PFK-2/FBPasa2 hepática es fosforilada por PKA en el residuo Ser 32, siendo el sitio de fosforilación (Arg-Arg-Arg-Gly-Ser) una clásica secuencia consenso para la actuación de la proteína quinasa (Murray et al., 1984). Los tres residuos de arginina en el extremo aminoterminal hacen a la PFK-2/FBPasa2 un sustrato extremadamente adecuado para la

fosforilación por PKA. Sin embargo, los estudios del efecto del glucagón sobre los hepatocitos sugieren que el enzima bifuncional es peor sustrato para la PKA que la fosforilasa o la PK (Bartrons et al., 1983).

El efecto de la fosforilación en la actividad quinasa a pH fisiológico es incrementar la K_m para Fru 6P y disminuir la V_{max} , sin afectar la K_m para la ATP (Kurland et al., 1992). La disminución en la afinidad por el sustrato podría deberse a la modificación de la interacción de la Fru 6P con el residuo al que se une, la Arg 195 (Kurland et al., 1993). El efecto de la fosforilación en la actividad PFK-2 es máximo a pH 6.5 y ausente a pH 8, quedando demostrado en hepatocitos de rata incubados con glucagón (Cascales et al., 1992).

La fosforilación también aumenta la V_{max} de la actividad bisfosfatasa, sin modificar la K_m para Fru-2,6-P₂, probablemente al incrementar la velocidad de disociación de la Fru 6P del complejo E-P·Fru 6P (fig. 1.7) (Stewart et al., 1986). Por tanto, la incorporación de 1 mol de fosfato/mol de subunidad enzimática implica la disminución de la actividad quinasa y el aumento de la actividad bisfosfatasa. Estos cambios explicarían la acción del glucagón a la hora de disminuir la concentración de la Fru-2,6-P₂ en el hígado (Bartrons et al., 1983).

Como en el caso del enzima isocitrato deshidrogenasa, la mutación del residuo de Ser 32 de la PFK-2/FBPasa2 hepática a Asp o Glu, mimetiza los efectos que produce la fosforilación en las actividades quinasa y bisfosfatasa (Kurland et al., 1992). Todo ello apoya la idea de que los efectos de la fosforilación están mediados a través de la introducción de una carga negativa en el residuo Ser 32 situado en el dominio quinasa de la PFK-2/FBPasa2. La orientación espacial del grupo fosfoserina es esencial para la transmisión del efecto, dado que la mutación Ser32Ala en el residuo de serina adyacente (Ser 33) tiene un efecto pequeño en la actividad quinasa y nulo en la actividad bisfosfatasa.

El análisis de distintos mutantes de la PFK-2/FBPasa2 hepática en los que se habían suprimido los primeros 22 aminoácidos del enzima bifuncional (Kurland et al., 1993) y/o los últimos 30 aminoácidos del enzima hepático (Lin et al., 1994), ha permitido desarrollar un modelo que explica el efecto de la fosforilación en la PFK-2/FBPasa2 de hígado (fig. 1.9). El homodímero bifuncional se postula que existe en una configuración antiparalela, con las regiones amino y carboxiterminales interactuando separadamente con los sitios activos de sus respectivos dominios, así como con los términos opuestos en el otro dominio tanto en la

forma defosforilada como en la fosforilada. La supresión de estas regiones supone el cese de las interacciones, lo que provoca la activación del dominio bisfosfatasa y, en el caso de la mutación en la región aminoterminal, una disminución en la actividad quinasa. La fosforilación por la PKA, al introducir una carga negativa en la Ser 32, también interrumpiría estas interacciones provocando cambios recíprocos en la actividad quinasa (inhibición) y en la bisfosfatasa (activación) (Pilkis et al., 1995).

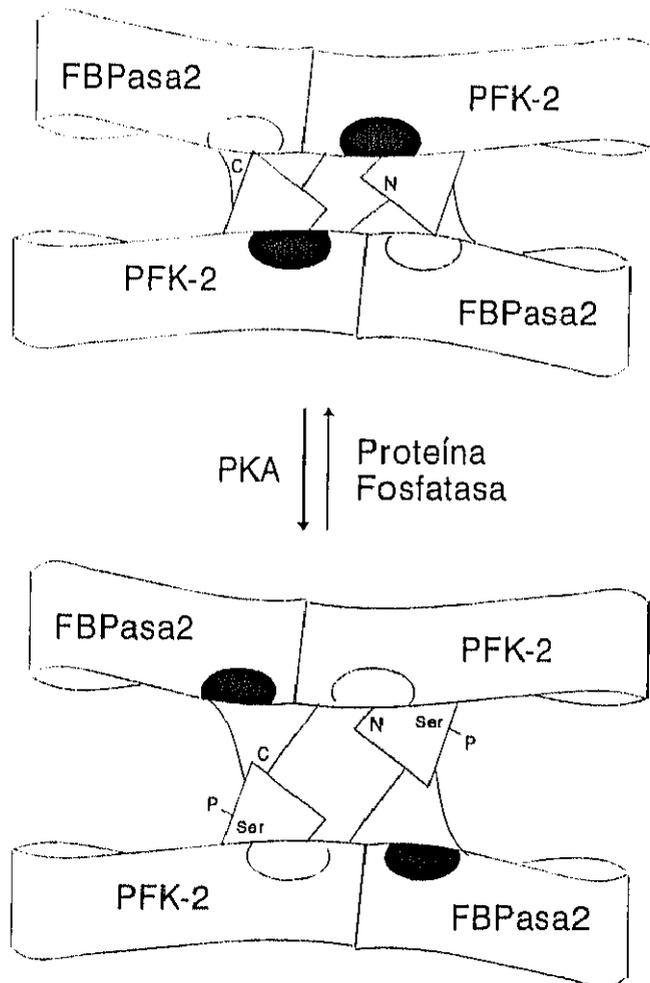


Figura 1.9. Interacción entre las regiones amino y carboxiterminales de la PFK-2/FBPase2 hepática. Efecto de la fosforilación dependiente de AMPc. Adaptada de Pilkis et al. (1995). El sitio activo de cada dominio se indica por un semicírculo negro (si está activado) o blanco (si está inhibido).

La L-PFK-2/FBPasa2 se defosforila por proteínas fosfatasas, que corresponden a las fosfatasas 2A y 2C en la clasificación de Cohen y colaboradores (Pelech et al., 1984). Estudios *in vivo* (Assimacopoulos y Renaud., 1990) y en cultivo de células de hepatoma de rata (Vargas et al., 1994) sugieren que la insulina mejora la actividad de proteína fosfatasas, probablemente la fosfatasa 2A, defosforilando al enzima hepático bifuncional vía un mecanismo independiente de AMPc.

2.1.3.2.- Regulación por ADP-ribosilación

La PFK-2/FBPasa2 hepática se ADP-ribosila (2 moles ADP-ribosa/mol subunidad) preferentemente en los residuos de Arg 29 y Arg 30 a través de la acción de una ADP-ribosil transferasa específica de arginina. La ADP-ribosilación disminuye la actividad quinasa sin alterar la actividad bisfosfatasa, bloquea la fosforilación por PKA y altera el reconocimiento por anticuerpos específicos frente al enzima bifuncional hepático (Rosa et al., 1995). La ADP-ribosilación constituye otro mecanismo de regulación postraduccional de la PFK-2/FBPasa2 hepática.

2.2.- PFK-2/FBPasa2 de corazón (Tipo H)

La PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino es, al igual que el enzima hepático, un enzima bifuncional. Resultado de un corte y empalme ("splicing") alternativo de un mismo transcrito primario (Rider et al., 1992), existen dos formas de PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino de masas moleculares 54 kDa y 58 kDa que presentan la misma actividad bisfosfatasa, diferenciándose en la actividad quinasa, tres veces superior en el componente de menor masa molecular. Uyeda y colaboradores sugieren que la forma de menor masa molecular es un producto de degradación proteolítico de la forma de 58 kDa. (Kitamura et al., 1988).

La secuencia de aminoácidos de la PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino se dedujo a partir de la caracterización de su ADNc (Sakata y Uyeda, 1990). El enzima consta de 530 aminoácidos con una subunidad de masa molecular de aproximadamente 60 kDa, ligeramente mayor que la determinada por electroforesis en SDS/PAGE (58 kDa). Su secuencia es similar a la PFK-2/FBPasa2 tipo L a excepción de las regiones amino y carboxiterminales que

contienen los sitios de fosforilación (fig. 1.4).

Con respecto a sus propiedades cinéticas, la principal diferencia entre la PFK-2/FBPasa2 tipo H y la PFK-2/FBPasa2 tipo L es la relativamente baja actividad bisfosfatasa del enzima de corazón. Mientras que el enzima presente en hígado de rata presenta un cociente de actividad PFK-2/FBPasa2 de 1, en el enzima de corazón bovino dicho cociente es de 80 (Rider et al., 1985). A pesar de ello, el enzima de corazón bovino es bifuncional.

Otra diferencia en las propiedades cinéticas de los isoenzimas tipo H y tipo L es la sensibilidad de la PFK-2 a la inhibición por sn-glicerol 3P. La actividad quinasa de la PFK-2/FBPasa2 hepática es casi completamente inhibida por concentraciones de sn-glicerol 3P en el rango mM. Por el contrario, el enzima presente en el corazón es relativamente insensible a la inhibición por este ligando (Rider et al., 1985).

La PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino se fosforila por PKC y PKA. La forma de 58 kDa contiene 2 sitios de fosforilación localizados en la región carboxiterminal del dominio bisfosfatasa (Ser 466 y Thr 475). La fosforilación mediada por PKA de la Ser 466 activa la quinasa al disminuir un 50% la Km para Fru 6P, sin alterar la actividad bisfosfatasa probablemente por la escasa actividad FBPasa2 presente en el isoenzima de corazón. La fosforilación mediada por PKC en el residuo Thr 475 no supone ningún cambio en la actividad quinasa (Rider et al., 1992a).

Mediante técnicas de electroblotting y microsecuenciación se ha podido comprobar que la forma de 54 kDa carece del péptido carboxiterminal (residuos 451-510), péptido que contiene los sitios de fosforilación descritos por Sakata y Uyeda. A la vista de estas discrepancias, se procedió a secuenciar la proteína fosforilada, identificándose un nuevo sitio de fosforilación por PKA en el residuo Ser 29 (Rider et al., 1992a).

Del análisis del isoenzima de rata se comprobó que la PFK-2/FBPasa2 de corazón es sustrato no sólo de la PKA y PKC sino también de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, identificándose otro sitio de fosforilación en el residuo Ser 483. Al igual que tras la fosforilación mediada por PKA, la fosforilación de la PFK-2/FBPasa2 de corazón por proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina provoca el aumento en la actividad quinasa al aumentar la afinidad hacia el sustrato. Este aumento de actividad explicaría el incremento del flujo glucolítico que tiene lugar al incrementar el trabajo del corazón (Depré

et al., 1993).

2.3.- PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético (Tipo M)

La secuencia aminoacídica del enzima bifuncional PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético de rata es idéntica a la secuencia del enzima de hígado a excepción del extremo aminoterminal. Los 32 primeros aminoácidos de la proteína hepática son reemplazados por un diferente nonapéptido en la PFK-2/FBPasa2 muscular de tal manera que el residuo Ser 32, sitio de fosforilación por PKA de la L-PFK-2/FBPasa2, se corresponde con un residuo de Ala. Este hecho explicaría porqué la PFK-2/FBPasa2 tipo M no es sustrato de la PKA (Kitamura et al., 1989).

Es interesante hacer notar que este enzima, al contrario de lo que ocurre en el isoenzima de corazón, es más una fosfatasa que una quinasa, ya que presenta un cociente de actividades PFK-2/FBPasa2 aproximadamente de 0.1-0.2. Esta elevada actividad bisfosfatasa sería la responsable de la baja concentración de Fru-2,6-P₂ que encontramos en músculo esquelético en comparación a otros tejidos. Además la actividad quinasa del enzima tipo M no es muy sensible a la inhibición por sn-glicerol 3P (Kitamura et al., 1989).

La PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético de rata se ha clonado, secuenciado y expresado en *E. coli*. El análisis del ADNc muestra que existen dos posibles sitios de iniciación de la transcripción y, por tanto, dos posibles ARNm que darían lugar a dos proteínas de masas moleculares 53 kDa (forma larga) y 52 kDa (forma corta). El isoenzima expresado *in vivo* en el músculo esquelético de rata y, en menor medida en el hígado, es la isoforma corta de 52 kDa (Crepin et al., 1992).

2.4.- PFK-2/FBPasa2 de cerebro

Las actividades quinasa y bisfosfatasa en el cerebro de rata coeluyen en las mismas fracciones sugiriendo que, como el resto de isoformas de mamíferos, el enzima es también bifuncional. Su actividad bisfosfatasa es 70 veces menor que la actividad quinasa siendo esta la causa de los niveles relativamente altos de Fru-2,6-P₂ presentes en cerebro.

Las propiedades cinéticas son similares a las que tiene la PFK-2/FBPasa2 de corazón: no es inhibido por sn-glicerol 3P, es más sensible al citrato que el isoenzima hepático y la

actividad PFK-2 no se modifica tras la incubación con PKA o PKC (Ventura et al., 1991).

También se ha aislado y caracterizado una PFK-2/FBPasa2 de cerebro bovino. Es un enzima homodímero bifuncional compuesto por una subunidad de 120 kDa de masa molecular, aproximadamente el doble que la masa molecular de las subunidades del resto de las PFK-2/FBPasa2 de mamíferos. Al igual que ocurre con el enzima de rata, la elevada relación de actividades quinasa y bisfosfatasa (cercana a 3) es la causa de la elevada concentración del metabolito bisfosfato en cerebro bovino (Ventura et al., 1991). El enzima de cerebro bovino no es sustrato de fosforilación por PKC aunque se fosforila por PKA con una estequiometría similar a la observada en el isoenzima hepático. Sin embargo, a diferencia de la PFK-2/FBPasa2 tipo L, las propiedades cinéticas de la PFK-2/FBPasa2 de cerebro bovino no se afectan por esta fosforilación (Ventura et al., 1992). La comparación de las secuencias del enzima de cerebro bovino y la PFK-2/FBPasa2 de hígado de rata mostró que el único residuo importante que no se conservaba en el enzima de cerebro era la Arg 307, residuo implicado en la interacción del enzima con el grupo 2 fosfato de la Fru-2,6-P₂. La sustitución de este residuo de arginina por una serina explicaría la menor afinidad por la hexosa bisfosfato mostrada por la PFK-2/FBPasa2 de cerebro bovino comparada con la que encontramos en el enzima hepático de rata (K_m Fru-2,6-P₂ 70 μM vs 5 nM) (Ventura et al., 1995).

2.5.- PFK-2/FBPasa2 de testículo

En 1991 Sakata y colaboradores aislaron, secuenciaron y expresaron en *E. coli* dos fragmentos de ADNc que codificaban la secuencia completa de 468 aminoácidos de la PFK-2/FBPasa2 de testículo de rata. El enzima mostró un 74%, 67% y 64% de homología con los isoenzimas de hígado de rata y corazón de rata y bovino, respectivamente.

La proteína expresada tiene una masa de 54 kDa y presenta la mayor actividad quinasa y la menor actividad bisfosfatasa de entre todas las isoformas de mamíferos. Dado que el nivel de Fru-2,6-P₂ en las células se controla por la relación entre ambas actividades, la elevada relación quinasa/bisfosfatasa de la PFK-2/FBPasa2 de testículo podría reflejar la importancia de la hexosa bisfosfato en este tejido eminentemente glucolítico.

Al igual que la PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino, la PFK-2/FBPasa2 de testículo

es sustrato de PKC siendo tres los posibles sitios de fosforilación, residuos Ser 2, Ser 28 y Thr 443 (Sakata et al., 1991).

2.6.- PFK-2/FBPasa2 de líneas celulares

La mayoría de las células tumorales presentan, en comparación con las células normales, una elevada capacidad glucolítica que se mantiene incluso bajo condiciones aeróbicas. La expresión de distintas PFK-2/FBPasa2 podría contribuir a los cambios en el metabolismo de la glucosa observados en células transformadas.

La línea desdiferenciada de hepatoma de rata HTC expresa 2 ARNm de la PFK-2/FBPasa2; uno de los mensajeros, presente a baja concentración, codifica el enzima bifuncional hepático (Crepin et al., 1989a), mientras que el expresado mayoritariamente podría corresponder al isoenzima de músculo esquelético (Crepin et al., 1989b). De acuerdo con esta hipótesis, las propiedades cinéticas tanto del enzima purificado (Loiseau et al., 1988) como las de la proteína expresada en *E. coli* (Crepin et al., 1989a) se asemejan a las de la PFK-2/FBPasa2 tipo M : mayor sensibilidad a la inhibición por citrato, no inhibición por sn-glicerol 3P y ausencia de fosforilación por PKA. A pesar de conservar la secuencia del dominio bisfosfatasa, la PFK-2/FBPasa2 purificada de células HTC no contiene detectable actividad FBPasa2 (Loiseau et al., 1988), probablemente debido a una modificación postraduccional.

Las propiedades de la PFK-2/FBPasa2 presente en la línea celular FAO-1, entre ellas la masa molecular (55 kDa) y la relación de actividades quinasa/bisfosfatasa (cerca a 1.4), junto con el reconocimiento del enzima por un anticuerpo frente al isoenzima de hígado de rata, nos indican que el enzima bifuncional de las células FAO-1 es similar a la PFK-2/FBPasa2 hepática. Estudios a nivel de la expresión del mensajero en esta línea celular, han demostrado que, aunque en menor medida, la PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético también se expresa en las células FAO-1 (Espinet et al., 1993).

Finalmente, la PFK-2/FBPasa2 presente en células FTO2B, una línea de hepatoma de rata altamente diferenciada, es un enzima bifuncional de 55 kDa de masa molecular que presenta una relación de actividades quinasa/bisfosfatasa cercana a 4. Este valor se diferencia claramente de la relación existente en los isoenzimas de hígado (≈ 1), músculo esquelético

(≈ 0.1) y corazón (≈ 80), por lo que la PFK-2/FBPasa2 presente en esta línea celular sería similar pero no idéntica al enzima presente en estos tejidos (Cifuentes et al., 1991). Sin embargo, de la caracterización del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de la línea FTO2B, transcrito a partir de un tercer promotor del gen de la PFK-2/FBPasa2 de hígado/músculo esquelético, se deduce que la proteína traducida a partir de este ARNm corresponde a la PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético (Dupriez et al., 1993).

2.7.- Otros isoenzimas PFK-2/FBPasa2

Las mayores diferencias entre el enzima bifuncional de hígado de pollo y el enzima hepático de rata se encuentran a nivel del dominio quinasa, destacando la cooperatividad negativa para la unión a ATP, al presentar el enzima avfár una secuencia nbf ($G_{46}LRRPGKT_{53}$) distinta a la del isoenzima de rata ($G_{48}LPARGKT_{55}$), y la inhibición por Mg^{2+} debido a la presencia en su secuencia de dos residuos de aspártico (Asp 160 y Asp 161). Además, los residuos Cys no son esenciales en la actividad quinasa de la PFK-2/FBPasa2 de hígado de pollo (Li et al., 1993).

Se han clonado los ADNc correspondientes a la PFK-2/FBPasa2 de hígado y músculo esquelético de rana. Codifican proteínas de 469 (tipo L) y 455 aminoácidos (tipo M) que, al igual que en los isoenzimas de mamíferos, se diferencian en sus extremos aminoterminales. Los 30 aminoácidos del extremo amino del isoenzima hepático se reemplazan por una secuencia única de 16 aminoácidos en el isoenzima de músculo esquelético de rana (Sakai et al., 1994).

En levaduras, las actividades quinasa y bisfosfatasa residen en proteínas independientes (Kretschmer et al., 1987). La PFK-2 está compuesta por subunidades de 93.5 kDa y no presenta prácticamente actividad fosfatasa, aunque la región interna de su secuencia presenta homologías con los isoenzimas bifuncionales de mamíferos (Kretschmer y Fraenkel., 1991). La PFK-2 de levaduras es el único enzima cuya fosforilación porr PKA provoca, al contrario de lo que ocurre con la quinasa hepática de mamíferos, su activación debido al aumento en la V_{max} y en la afinidad por el sustrato Fru 6P. Con respecto a la FBPasa2, existen también dos formas enzimáticas; una de ellas, compuesta por 2 subunidades de 50 kDa, es inhibida por Fru 6P y fosforilada por PKA lo que supone su inactivación

(Kretschmer et al., 1987). La otra bisfosfatasa, purificada de *S. cerevisiae*, defosforila la Fru-2,6-P₂ en la posición 6, siendo, por tanto, el producto de su reacción la Fru 2P (Purwin et al., 1987).

La relación entre las actividades quinasa y bisfosfatasa en plantas no está clara. Los primeros estudios, realizados principalmente por Larondelle y colaboradores, sugieren que en las plantas, como en los animales, las dos actividades residen en la misma proteína (Larondelle et al., 1986). Sin embargo, MacDonald y colaboradores mostraron que en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*) el enzima que catalizaba la hidrólisis de la Fru-2,6-P₂ residía en una proteína distinta a la que catalizaba su síntesis. Esta actividad bisfosfatasa independiente se caracterizaba por su alta especificidad y baja afinidad hacia el sustrato y una gran sensibilidad tanto a la inhibición por Pi como por Mg²⁺ (MacDonald et al., 1987).

3.- Los genes de las isoenzimas PFK-2/FBPasa2

Al descubrimiento de la Fru-2,6-P₂ y el isoenzima de hígado de rata (El Maghrabi et al., 1982a, 1982b) le siguió el aislamiento del gen que lo codifica (gen A) (Darville et al., 1989; Lange et al., 1992) y su correspondiente ADNc (Colosia et al., 1987; Darville et al., 1987; Colosia et al., 1988). Actualmente, se conoce también la estructura del gen que codifica la isoforma de corazón (gen B) (Kitamura y Uyeda, 1987; Tsuchya y Uyeda 1994) y la de los ADNc correspondientes a las isoformas de testículo (Sakata et al., 1991) y cerebro (Ventura et al., 1992). De la comparación de la estructura de estos ADNc con la estructura de los ADNc correspondientes a las isoformas de hígado/músculo esquelético y corazón, se deduce que las isoformas de testículo y cerebro son productos de genes distintos a los caracterizados hasta el momento, aunque su estructura aún no han sido determinada.

Hay al menos dos genes distintos que codifican las isoformas presentes en levaduras (Kretschmer y Fraenkel, 1991; Paravicini y Kretschmer, 1992) y, teniendo en cuenta la presencia de Fru-2,6-P₂, podrían existir otros genes en otros tipos de eucariotas unicelulares.

3.1.- Gen A de la PFK-2/FBPasa2

El gen A (\approx 60 Kb) se localiza en el cromosoma X de rata (Darville et al.,

1989) y humanos (Olson et al., 1989), y da lugar a los ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado (L) (Darville et al., 1989; Olson et al., 1989; Lange et al., 1992), músculo esquelético (M) (Colosia et al., 1988; Darville et al., 1989) y tipo F (FTO2B) (Dupriez et al., 1993), por el uso alternativo de tres promotores. El promotor muscular se encuentra 4.3 Kb por delante del promotor hepático mientras que el denominado promotor F se localiza 1.5 Kb por delante del promotor muscular (fig. 1.10).

Los ARNm comparten 13 exones consecutivos (exones 2 al 14) (Darville et al., 1989) y difieren en sus extremos 5'. Un exón adicional 1M ó 1L está presente en los ARNm tipo muscular y hepático, respectivamente, mientras que el ARNm tipo F contiene dos exones no codificantes (1af y 1bf). Los isoenzimas tipo M y tipo F tienen la misma secuencia que el isoenzima L a excepción de la región aminoterminal, en la que los primeros 32 aminoácidos que contienen el sitio reconocido por la PKA son sustituidos por un nonapéptido completamente distinto.

Con respecto a los otros 13 exones comunes a los tres tipos de ARNm codificados por el gen A, el exón 2 codifica el elemento estructural que contiene la secuencia consenso nbf, los exones 4, 6 y 7 corresponden a las regiones de la PFK-2/FBPasa2 que contienen los residuos esenciales de Cys y en el exón 8 se encuentra localizado el residuo de His fosforilado durante la reacción bisfosfatasa.

3.1.1.- Promotor L

Se han identificado en la cromatina hepática 5 sitios hipersensibles a la ADNasaI por delante (-1500 y -200 bp) y por detrás (+3000 y +3500 bp) del sitio de iniciación de la transcripción del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 hepática, implicados presumiblemente en la regulación de la actividad transcripcional del promotor L (Zimmermann y Rousseau, 1994).

Ensayos de transfección con promotores a los que se les van suprimiendo distintas regiones, han demostrado que la máxima actividad del promotor hepático del gen A de la PFK-2/FBPasa2 se encuentra dentro de las 360 bp por delante del sitio de iniciación de la transcripción (Lemaigre et al., 1991). En esta región se han identificado seis secuencias cis que contribuyen a la actividad transcripcional y especificidad tisular del promotor L

(Lemaigre et al., 1993).

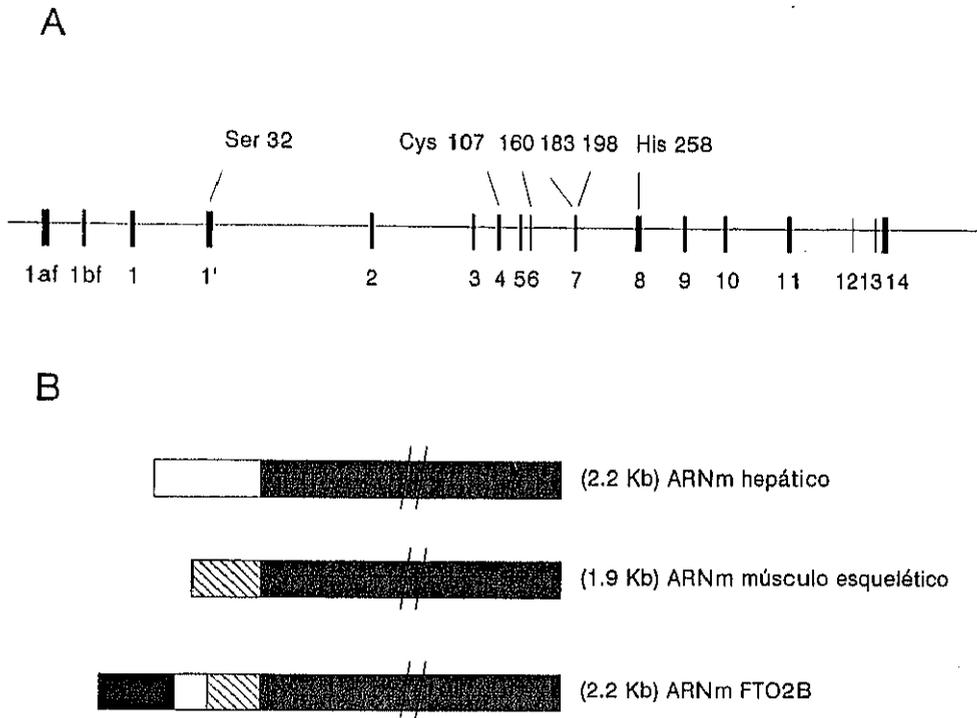


Figura 1.10. Organización del gen A de la PFK-2/FBPasa2: localización y tamaño de los 17 exones indicando la posición de los residuos esenciales para la actividad (panel A). Estructura de los tres ARNm transcritos a partir de este gen (panel B). Adaptada de Darville et al. (1989) y Dupriez et al. (1993). En el esquema de los ARNm los exones específicos 1L, 1M, 1af y 1bf se representan como rectángulos abierto, rayado, cerrado y punteado, respectivamente.

El factor nuclear I (NF-I), relacionado con el control transcripcional de genes expresados en el hígado (Paonessa et al., 1988), se une a los sitios I (-43 a -66 bp), II (-78 a -102 bp) y V (-225 a -273 bp). El sitio III (-112 a -132 bp), que contribuye

aproximadamente, al igual que el sitio IV, a la mitad de la actividad del promotor, une el factor ubicuo oct-1 y el factor hepático nuclear 3 (HNF-3), de una manera mutuamente exclusiva. Las proteínas específicas de hígado presentes en el sitio IV (-200 a -216 bp) confieren especificidad tisular y podrían corresponder a factores relacionados con las proteínas C/EBP así como al factor Tf-LF2. Por último, el sitio VI (-267 a -283 bp) contiene una secuencia poly(dG) reconocida probablemente por proteínas implicadas en la interacción en el nucleosoma (Lewis et al., 1988).

Además del hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético, que expresan el mensajero muscular (Crepin et al., 1989a; Darville et al., 1989), contienen también una pequeña cantidad de mensajero hepático. El hígado fetal, incluso desde el día 19 de gestación, contiene también ARNm tipo L. Por tanto, el promotor L debe ser activo no sólo en el hígado adulto sino también en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado fetal (Zimmeman y Rousseau, 1994).

3.1.2.- Promotor M

En el promotor muscular también se ha identificado un sitio hipersensible a la ADNasaI en la posición -4500 bp con respecto al sitio cap del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 hepática (Zimmermann y Rousseau, 1994).

En un primer momento se identificaron dos regiones en el promotor muscular del gen A de la PFK-2/FBPasa2. La región promotora propiamente dicha se extiende 200 bp por delante del sitio cap del ARNm del isoenzima bifuncional de músculo esquelético (Lemaigre et al., 1991). Esta región contiene la caja TATA, dos sitios de unión a NF-I y dos sitios de unión para dos factores transcripcionales pertenecientes a la denominada familia de factores de cremallera de leucina (DBP y NFIL6/LAP). También incluye tres sitios hexaméricos que constituyen el receptor de la hormona tiroidea y que además unen otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares (ácido retinoico, vitamina D₃ y los receptores para estrógenos) (Brent et al., 1991).

La otra región del promotor tipo M es un fragmento de 200 bp (-1615/-1807) que estimula hasta 12 veces la actividad de este promotor. Este fragmento distal tiene todas las propiedades de un intensificador ("enhancer") y comprende 6 sitios de unión para dos tipos

de factores: Sp1 y EF-1A (Lemaigre et al., 1991). Si bien esta región se caracterizó en un primer momento como un intensificador del promotor muscular, recientemente se ha comprobado que constituye el promotor F caracterizado en la línea celular de hepatoma de rata FTO2B (Dupriez et al., 1993).

Entre las secuencias reguladoras de genes expresados en músculo (MEF-2, CarG, M-CAT y cajas E) (Tuil et al., 1990), sólo se han identificado 5 posibles cajas E en el promotor M.

Se ha identificado también una región de 150 bp en el promotor muscular que contiene una secuencia consenso Ap-1 esencial para la activación transcripcional (Darville et al., 1989). Esta región une heterodímeros Jun/Fos, proteínas importantes en la regulación de la proliferación y ciclo celular. De esta forma, la cantidad de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 es dependiente del ciclo celular, alcanzando su valor máximo en la fase S del ciclo (Salvadó et al., 1994).

3.1.3.- Promotor F

Dupriez y colaboradores demostraron recientemente que las células de hepatoma de rata FTO2B expresan un ARNm distinto al mensajero hepático, que es transcrito a partir de un tercer promotor localizado 1.5 Kb por delante del promotor muscular del gen A de la PFK-2/FBPasa2. El promotor es activo en hígado y músculo fetal, placenta y en varias líneas celulares de rata (Dupriez et al., 1993). Carece de caja TATA y contiene varios sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 y para factores pertenecientes a la familia de oncogenes *ets*, algunos de los cuales son tejido-específicos o están implicados en la respuesta a señales extracelulares (Seth et al., 1992).

Se ha identificado una región de respuesta al suero en el primer exón del ARNm tipo F que contiene una secuencia consenso para el factor de transcripción E2F que controla la expresión de genes inducidos en la transición G1/S en el ciclo celular, por lo que el promotor F pertenecería a la familia de genes de respuesta tardía al suero. El promotor es inhibido en procesos de diferenciación, se activa por mitógenos y oncoproteínas v-src y se regula por oncoproteínas *ets* y, vía E2F, antioncogenes de la familia Rb/p107 (Darville et al., 1995).

3.2.- Estructura del gen B que codifica al isoenzima de corazón

La PFK-2/FBPasa2 de corazón de rata es codificada por el gen B de 22 Kb, localizado en el cromosoma 13 (Hilliker et al., 1991). El gen se compone de 16 exones y, aunque los exones 3-14 que codifican los dominios quinasa y bisfosfatasa son similares a los que conforman el gen A, contiene exones distintos en ambos extremos 5' y 3', hecho que está en concordancia con las diferencias existentes en los extremos amino y carboxilo de los isoenzimas de corazón, músculo esquelético e hígado (Darville et al., 1991).

La región promotora del gen B de rata tiene una organización estructural y funcional inusual. El gen contiene realmente 4 exones más de los 16 previamente descritos y al menos 3 promotores (R1, R3 y R4), dos de los cuales (R3 y R4) corresponden a secuencias exónicas. Da lugar a 4 ARNm (R1-R4) que difieren en la secuencia 5' por delante del exón 2 común que contiene el sitio de iniciación de la traducción (Chikri y Rousseau, 1995) (fig. 1.11).

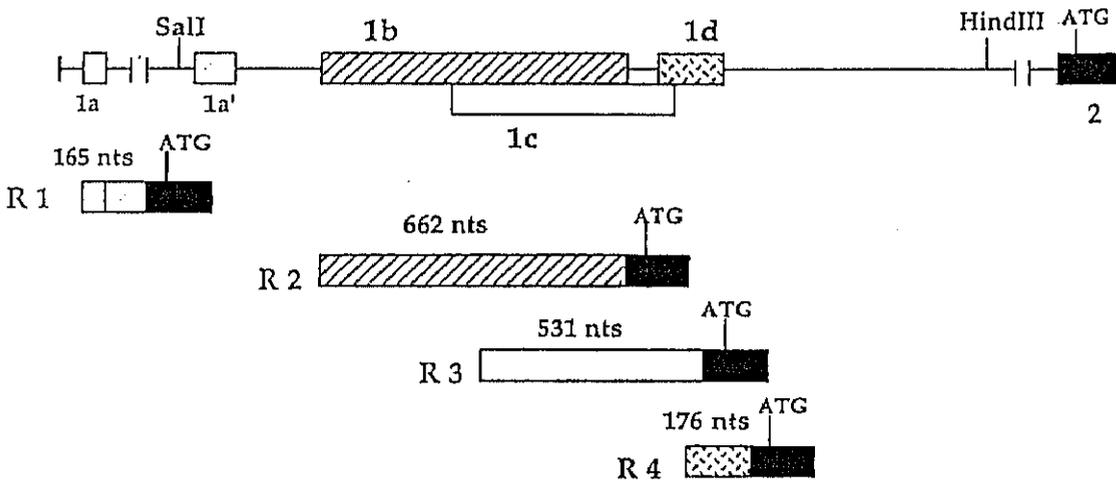


Figura 1.11. Organización de la región promotora del gen B y estructura del extremo 5' de los ARNm R1, R2, R3 y R4 de la PFK-2/FBPasa2 de corazón de rata. Adaptada de Chikri y Rousseau (1995). El tamaño en nucleótidos (nts) se refiere a la longitud de los mensajeros por delante del exón 2.

El gen B también codifica al isoenzima de corazón bovino. En este caso, el gen (de aproximadamente 27 Kb) comprende 16 exones similares a los encontrados en el gen de rata a excepción del primer exón no codificante, de tan sólo 28 bp en el gen de corazón bovino, y el exón 16 que codifica la secuencia carboxiterminal de la PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino (fig. 1.12).

La región promotora del gen bovino (-1 a -261) carece de caja TATA y contiene 3 secuencias ricas en GC, potenciales sitios de unión a Sp1, una caja invertida CCAAT y potenciales cajas E que reconocen factores de transcripción tipo hélice básica-lazo-hélice y que se sabe están implicadas en el control de otros genes expresados en corazón tales como las cadenas α y β pesadas de miosina (Thompson et al., 1991; Molquentin et al., 1993) y α -actina (French et al., 1991).

Al menos 5 ARNm son codificados por el gen de la PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino: 3 se traducen en la proteína de 58 kDa con variaciones en el número de aminoácidos codificados por el exón 15, otro de los ARNm da lugar a la proteína de 54 kDa al no contener el exón 15 y, finalmente, del quinto ARNm surge una forma truncada del enzima en la que el exón 8 se ha suprimido y que carece de actividad quinasa y bisfosfatasa (Vidal et al., 1993).

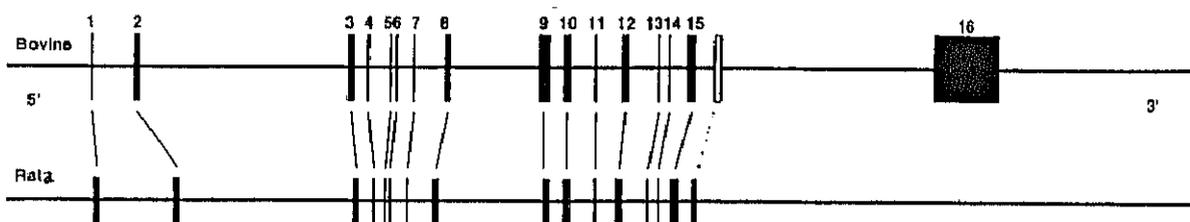


Figura 1.12. Organización estructural del gen B de la PFK-2/FBPasa2 de corazón bovino. Comparación con el gen de la isoforma de corazón de rata. Adaptada de Tsuchiya y Uyeda (1994). Las cajas cerradas representan los exones mientras que las líneas horizontales representan los intrones y secuencias de flanqueo 5' y 3'. La caja abierta representa la región del exón 16 similar a la presente en el gen de corazón de rata.

4.- Control hormonal de la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa2

La regulación hormonal del gen de la PFK-2/FBPasa2 se ha estudiado principalmente a nivel del isoenzima hepático de rata, tanto *in vivo* como en cultivos celulares y en líneas establecidas de hepatoma de rata. No se han llevado a cabo estudios acerca de la expresión génica del isoenzima bifuncional en cerebro, corazón o testículo.

4.1.- Glucocorticoides

La concentración de Fru-2,6-P₂, actividad y contenido de la PFK-2/FBPasa2 hepática así como los niveles de su correspondiente ARNm, disminuyen en los hígados de ratas adrenalectomizadas. Todos los niveles se normalizan tras la administración de glucocorticoides debido a la estimulación de la transcripción del gen (Marker et al., 1989). La concentración del mensajero de la isoforma de músculo esquelético también aumenta tras la administración hormonal, aunque el grado de activación es menor que el observado en el ARNm hepático (Lange et al., 1989).

El efecto de los glucocorticoides en el mensajero de la PFK-2/FBPasa2 tipo L observado *in vivo* se reproduce en hepatocitos de rata en cultivo primario. Los niveles prácticamente indetectables del mensajero del enzima bifuncional en ausencia de hormonas aumentan en los hepatocitos en cultivo tras el tratamiento con dexametasona. El efecto de la hormona es bloqueado por actinomicina D y cicloheximida, lo que nos indica la necesidad de la síntesis de proteínas (Lange et al., 1989). La inducción por dexametasona es potenciada por insulina o tiroxina e inhibida a tiempos cortos por el AMPc (Kummel y Pilkis, 1990).

La regulación de la expresión del enzima bifuncional por glucocorticoides ha sido también establecida en las líneas celulares de hepatoma de rata FTO2B, FAO-1 y en su progenitor HII4E. La línea celular HTC, una línea mucho más desdiferenciada, no está sometida a regulación hormonal (Crepin et al., 1989b). La exposición de células FTO2B a dexametasona o insulina incrementa los niveles de ARNm tipo F al afectar la transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa2 (Pilkis et al., 1995). La inducción es bloqueada por el AMPc y, en el caso de la provocada por la insulina, se pierde al eliminar la glucosa del medio (Cifuentes et al., 1991). Las células FTO2B, aunque minoritariamente, también expresan la isoforma hepática cuya inducción por dexametasona es suprimida por insulina (Lemaigre et

al., 1994).

En la línea de hepatoma FAO-1, que expresan mayoritariamente la forma de ARNm de la forma hepática, la dexametasona e insulina inducen la expresión del mensajero del enzima bifuncional, efecto antagonizado por el AMPc (Espinete et al., 1993).

Finalmente, la adición de dexametasona y/o insulina incrementa de una manera sinérgica y dependiente de tiempo y dosis, el contenido de Fru-2,6-P₂, enzima y ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en la línea de hepatoma HII4E. El efecto es independiente de AMPc y es mediado tanto por la estimulación de la expresión del gen como por la modulación del estado de fosforilación del enzima bifuncional por la insulina (Vargas et al., 1994).

Los genes cuya transcripción se estimula por glucocorticoides contienen secuencias cis, denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), que se unen y son activados por el receptor de glucocorticoides (Rousseau y Hue., 1993). En el gen A de la PFK-2/FBPasa2 se han identificado 3 posibles GRE localizados en la zona promotora (Lange et al., 1989) y un potente GRE localizado en el primer intrón, entre el exón 1 hepático y el exón 2, a 3.5 y 8.5 Kb de los sitios de iniciación de la transcripción hepático y muscular, respectivamente (Lange et al., 1992). Este GRE intrónico, compuesto de 2 sitios de unión en tándem para receptores de glucocorticoides, es similar a la unidad de respuesta a glucocorticoides (GRU) descrita para el gen de la PEPCK (Imai et al., 1990). Además, coincide con el sitio hipersensible a ADNasaI más distal identificado en la cromatina hepática (posición +3500) (Zimmermann y Rousseau, 1994), si bien este sitio hipersensible es independiente a glucocorticoides, hecho similar al observado en el gen de la PEPCK (Ip et al., 1989).

4.2.- Hormonas tiroideas

La actividad quinasa hepática, contenido de PFK-2/FBPasa2 y niveles de su ARNm disminuyen en ratas tiroidectomizadas, efecto revertido por la administración de la hormona tiroidea (Wall et al., 1989). La inducción en los niveles de mensajero no se detectó en hepatocitos de rata en cultivo primario, incluso tras 5 días de cultivo en presencia de la hormona, lo que sugiere un efecto postranscripcional (Kummel y PilKis, 1990).

4.3.- Insulina y glucagón

La cantidad de PFK-2/FBPasa2 hepática disminuye en el hígado de ratas ayunadas y diabéticas, alcanzando niveles normales tras la realimentación con una dieta rica en carbohidratos o tras la administración de insulina o vanadato, respectivamente. El incremento en la cantidad de enzima bifuncional se correlaciona con un aumento en los niveles del ARNm correspondiente (Colosia et al., 1988). Si bien Crepin y colaboradores no detectaron cambios en el contenido de ARNm, sugiriendo que se producía una disminución en la traducción del mensajero (Crepin et al., 1988), Miralpeix y colaboradores observaron una disminución significativa de los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 con la diabetes (Miralpeix et al., 1992).

La estimulación de la transcripción por la insulina podría estar relacionada con la presencia de una secuencia en el promotor L (posición -293) similar a la que media la inhibición por insulina en el gen de la PEPCK. Esta secuencia también está presente en los genes de la GK y enzima málico, cuya transcripción es estimulada por insulina (O'Brien y Granner, 1990). Además podría actuar también a nivel del procesamiento del ARNm y/o a nivel de la degradación proteica.

El glucagón disminuye *in vivo* la cantidad de proteína y ARNm de la PFK-2/FBPasa2 hepática debido a una inhibición en la velocidad de transcripción y, en menor medida, a que acelera la degradación del mensajero (Rosa et al., 1993). Este efecto del glucagón se observa en hepatocitos adultos en cultivo tratados con su segundo mensajero el AMPc (Lange et al., 1989). Otros agentes o condiciones que al igual que el glucagón elevan la concentración de AMPc también causan una disminución en la concentración de Fru-2,6-P₂, entre los que se pueden citar el agente β -adrenérgico isoproterenol (Hue et al., 1981) o la adenosina (Bartrons et al., 1984).

La vasopresina, angiotensina II y el agente α -adrenérgico fenilefrina, al incrementar la concentración citosólica de calcio, activan la fosforilasa y, por consiguiente, la degradación del glucógeno. Ello implica una elevación en la concentración de hexosas 6P, lo que provoca el incremento en los niveles de Fru-2,6-P₂ y una estimulación de la glucólisis. La estimulación de la glucólisis por fenilefrina también ha sido observada en corazón y músculo esquelético. En ausencia de calcio, la fenilefrina actuaría como agente β -adrenérgico

incrementando los niveles de AMPc y, por tanto, estimulando la gluconeogénesis (Hue et al., 1981). En hepatocitos de ratas ayunadas, dada la ausencia de glucógeno, el efecto predominante de catecolaminas, vasopresina y angiotensina es estimular la gluconeogénesis por un mecanismo dependiente de AMPc (Hers y Hue, 1983).

4.4.- Factores de crecimiento, ésteres de forbol y oncogenes

El factor de transcripción TGF β disminuye los niveles de proteína, actividad y mensajero de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos adultos en cultivo primario, al inhibir la expresión del gen A (Joaquín et al., 1994). El efecto opuesto lo causaría la exposición de hepatocitos a su mitógeno más potente, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La acción del HGF podría explicar los cambios metabólicos que tienen lugar durante la regeneración hepática. Tras una hepatectomía parcial, los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L disminuyen hasta niveles indetectables, incrementándose durante la fase proliferativa de la regeneración hepática (Rosa et al., 1992a, 1992b).

Concentraciones mitogénicas de insulina, el factor de crecimiento epidérmico y los ésteres de forbol incrementan el contenido en Fru-2,6-P₂, actividad quinasa y flujo glucolítico en una serie de células como fibroblastos de embrión de pollo (Boscá et al., 1985) y células HT29 de adenocarcinoma de colon humano (Denix-Pouxviel et al., 1990). Estos cambios en el flujo glucolítico y actividad quinasa se han descrito también tras la transformación de fibroblastos de embrión de pollo por retrovirus que expresan los oncogenes v-src o v-fps (Marchand et al., 1992). En la mayoría de estos casos no se han determinado los niveles de ARNm y transcripción del gen durante la proliferación celular. Sin embargo, 4 pequeñas regiones de la PFK-2/FBPasa2 presentan un 62-64 % de homología al antígeno T producido por el virus del polioma de ratón y la proteína E1 sintetizada por el virus del papiloma humano. Esas similitudes abren la posibilidad de que algunas regiones del enzima bifuncional puedan ser un producto de un protooncogen (Hue y Rousseau, 1993).

Objetivos

Durante la transición del período fetal al neonatal tienen lugar importantes cambios en el metabolismo hepático de carbohidratos. Estos cambios se inducen por factores hormonales y nutricionales (Blázquez et al., 1974) y por modificaciones en la expresión de enzimas e isoenzimas específicos de tejido (Lyonnet et al., 1988).

El metabolismo de carbohidratos en el hígado fetal se caracteriza por tener una elevada actividad de la vía glucolítica y de la vía de las pentosas fosfato con el fin de mantener una intensa biosíntesis. Los enzima gluconeogénicos no están presentes o muestran bajas actividades por lo que la síntesis de glucosa es limitada. Esta elevada capacidad glucolítica del hígado fetal disminuye a lo largo del desarrollo paralelamente a la disminución en la actividad máxima de los enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa. Tres días antes del nacimiento, la síntesis del glucógeno se intensifica para permitir al neonato subsistir durante las primeras horas de vida postuterina en las que todavía no se ha iniciado la gluconeogénesis (Schubert et al., 1983).

El contenido de Fru-2,6-P₂ en el hígado fetal de rata es bajo (alrededor de 1 nmol/g) y disminuye transitoriamente tres días antes del nacimiento, cuando comienza la síntesis del glucógeno. Al nacer, el nivel del azúcar bisfosfato disminuye nuevamente y se mantiene por debajo de 1 nmol/g durante los primeros quince días de vida. Esta relativamente baja concentración, comparada con la presente en hepatocitos adultos (8 nmol/g células), es suficiente, sin embargo, para activar la PFK-1 y conferir al hígado fetal su elevada capacidad glucolítica (Martín-Sanz et al., 1987).

El hígado fetal de rata expresa una forma de PFK-2/FBPasa2 que presenta importantes diferencias con respecto al enzima de hígado adulto. Aunque ambas isoformas se componen de subunidades de similar masa molecular (55 kDa), presentan tamaños distintos en filtración en gel (89 kDa y 100 kDa para el enzima fetal y adulto, respectivamente) y el reconocimiento por un anticuerpo específico frente a un decapeptido aminoterminal de la proteína adulta es mínimo en la proteína fetal. Por otra parte, la PFK-2/FBPasa2 fetal, aunque se fosforila por la PKA, no presenta ningún cambio cinético en su actividad, en contraste con la inhibición de la actividad quinasa y la activación de la fosfatasa que ocurre en el enzima adulto. Además, el perfil peptídico que muestran la forma fetal y adulta de la PFK-2/FBPasa2 tras ser fosforiladas por la PKA y digeridas posteriormente con CNBr es

diferente. Por tanto, los sitios de fosforilación por PKA de la PFK-2/FBPasa2 adulta y fetal son distintos y están localizados en diferentes péptidos. Otra diferencia importante es la fosforilación por PKC del enzima fetal, ausente en la forma adulta (Martín-Sanz et al., 1992). El efecto del glucagón en el hígado adulto conduce a una disminución en la cantidad de proteína y ARNm de la PFK-2/FBPasa2 así como a la fosforilación del enzima bifuncional catalizada por la PKA, lo que provoca la inhibición de la actividad quinasa al disminuir la afinidad hacia su sustrato, y la activación simultánea de la actividad bisfosfatasa al aumentar la V_{max} de la reacción (Pilkis et al., 1995). La incubación de hepatocitos fetales con glucagón no afecta la actividad quinasa ya que no se observa ningún cambio en la relación de actividad medida a pH 8.5/6.6, incluso a concentraciones de la hormona por encima de $1 \mu\text{M}$. Además, el enzima parcialmente purificado de hepatocitos fetales de 21 días no experimenta cambios en la afinidad por Fru 6P tras la exposición a la hormona y exhibe una inhibición por sn-glicerol-3P marcadamente menor a la descrita para el enzima adulto (Martín-Sanz et al., 1987). Todos estos resultados sugieren que el hígado fetal de rata contiene un tipo de PFK-2/FBPasa2 distinto al presente en el hígado adulto.

Teniendo en cuenta estas consideraciones nos propusimos los siguientes objetivos:

1.- Estudiar la regulación hormonal a nivel de la expresión del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en el hígado fetal.

2.- Caracterizar el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado fetal para comprobar si nos encontramos efectivamente ante un isoenzima distinto al expresado en el tejido adulto.

3.- Estudiar los cambios que se producen en la PFK-2/FBPasa2 durante la transición fetal-neonatal para entender las alteraciones metabólicas que tienen lugar durante este período.

Capítulo 2: Material y Métodos

1.- Materiales

1.1.- Equipo instrumental

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes aparatos:

- Balanzas de precisión y granatarios de Sartorius modelos 1203 MP y 1207 MP-2.
- pHmetros de Radiometer Copenhagen, modelo 52.
- Bomba de perfusión Miniplus-2 de Gilson.
- Baños: Heto-Denmark y Unitronic 320 OR de Selecta.
- Microscopio óptico Nikon.
- Campana de flujo laminar Telstar modelo PV-100.
- Incubador Heraeus.
- Ultraturrax Janke-Kunkel modelo TR 50.
- Homogeneizador para pistilo de teflón modelo K 43 de Tri-R Instruments (Rockville, N.Y., Estados Unidos).
- Sonicador Vibra Cell™ (Modelo 100 W). Sonics & Material inc. Danbury. Connecticut. Estados-Unidos.
- Centrífugas: Heraeus modelo Minifuge T, Kontron modelo Centrikon H-401, Heraeus Biofuge 13 y ultracentrífuga Centrikon T-2080 de Kontron.
- Contador de centelleo líquido 1209 Rackbeta LKB (Wallac).
- Densitómetro láser Molecular Dynamics (Kemsing, Reino Unido).
- Espectofotómetro Hitachi modelo U-2000.
- Cubetas y fuentes de electroforesis (Power pac 300 y 3000) de Bio-Rad (Richmond C.A., Estados Unidos).
- Cubeta para geles de secuenciación Jordan Scientifics (Bloomington in.).
- Secador de geles modelo 583. Bio-Rad.
- Bomba Aspirator A-3S Eyela (Tokio, Japón).
- Sistema de transferencia de proteínas de Bio-Rad.
- Sistema de transferencia VacuneGene™ XL de Pharmacia.
- Aparato de PCR ADN Thermal Cycler 480 de Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, Estados Unidos).
- Bloque térmico Tembloc de Selecta.

- Transiluminador de U.V.: Ultravioleta Products Co. Chromatowe C-61.

1.2.- Reactivos

Los substratos, antibióticos, hormonas, coenzimas y enzimas, se obtuvieron de Boehringer (Manheim, Alemania) o de Sigma (St. Louis, U.S.A.). Los reactivos de laboratorio de grado analítico fueron de Merck (Darmstadt, Alemania), y los reactivos para la técnica de electroforesis fueron suministrados por Bio-Rad (Richmond, CA, U.S.A.). La agarosa y los medios para el crecimiento de bacterias fueron de Hispanagar (Barcelona, España).

Los reactivos y material plástico para cultivos celulares fueron de Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel), Bio-Whittaker (Walkersville, Estados Unidos), Tecno Plastic Products (Trasadingen, Suiza) y Becton Dickinson (Plymouth, Inglaterra).

Los reactivos radioquímicos y el líquido de centelleo BetaMax™ fueron suministrados por ICN.

Los reactivos de biología molecular fueron de Perkin-Elmer Cetus, Stratagene (La Jolla, Estados Unidos), Promega (Boehringer Ingenehm, Alemania) y Schleicher y Schvell (Darmstadt, Alemania).

La síntesis de péptidos se ordenó a Neosystem y las películas autorradiográficas Hyperfilm MP fueron de Amersham (Bucks, Reino Unido).

1.3.- Material biológico

1.3.1.- Animales

Se trabajó con ratas Albino Wistar preñadas (300-350 g), a las que se alimentó con una dieta estandar de laboratorio (Sanders H-28) y agua *ad libitum*. La edad gestacional se determinó por criterios estandar (Di Marco et al., 1976). En el día 19, 20 ó 21 de gestación, los fetos se obtuvieron por cesárea y el hígado se utilizó inmediatamente o se congeló en N₂ líquido. Ratas Albino Wistar macho (180-200 g) se alimentaron y mantuvieron en las mismas condiciones que las hembras, con el fin de comparar los hígados fetales y adultos.

Los animales tratados con dexametasona se inyectaron intraperitonealmente durante

cuatro días con una solución salina esteril que contenía 50 μg del glucocorticoide.

Para el estudio *in vivo* del efecto del AMPc en la regulación de la PFK-2/FBPasa2, ratas Albino Wistar macho se inyectaron intraperitonealmente con 2 ml de solución salina esteril que contenía el derivado 8-(4-clorofeniltio)AMPc (ph-AMPc) y teofilina, ambos a una concentración de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso. En el caso de los fetos, tras anestesiarse a la hembra con éter y exponer el útero, los fetos de 21 días de uno de los cuernos del útero se inyectaron subcutáneamente a través de la pared uterina con una solución salina (100 μl) que contenía 50 μg del derivado ph-AMPc y la misma cantidad de teofilina. Los fetos localizados en el cuerno opuesto, considerados como controles, se inyectaron únicamente con la solución salina.

1.3.2.- Preparación de homogeneizados hepáticos

Los hígados se homogeneizaron en ultraturrax con 4 volúmenes (p:v) de un medio que contenía fosfato potásico 20 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM y leupeptina 10 μM (pH 7.4 a 4°C), al que se añadió NaF 50 mM para inhibir la actividad de proteínas fosfatasa. Tras centrifugar los homogeneizados a 105000g durante 30 min, se llevó a cabo una purificación parcial mediante un doble fraccionamiento con polietilenglicol (PEG 6000) al 2-15%. El precipitado se resuspendió en 0.25 volúmenes del medio de homogeneización sin NaF.

Para determinar la concentración de Fru 2,6-P₂, los hígados se homogeneizaron en NaOH 50 mM (1:20, p/v), y se mantuvieron a 80°C durante 10 min.

1.3.3.- Aislamiento de hepatocitos

1.3.3.1.- Aislamiento de hepatocitos adultos

Los hepatocitos se obtuvieron por perfusión *in situ* del hígado de rata con un medio que contenía colagenasa, según el método descrito por Hue y colaboradores en 1978.

Las ratas se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de Nembutal a la dosis de 7 mg/100g de peso. Una vez anestesiado, se inyectó al animal en la vena femoral 0.5 ml de heparina (Leo) al 1% para evitar la coagulación sanguínea y facilitar el lavado del hígado de su contenido hemático. La canulación se llevó a cabo en la vena porta de manera

que se empezó a perfundir el hígado con 40 ml/min de medio Hepes sin calcio (Hepes 20 mM, KCl 1 mM, MgSO₄ 1 mM, fosfato potásico 5 mM, NaCl 150 mM y glucosa 10 mM, pH 7.4). Para facilitar el drenaje, se abrió una salida provisional en la vena cava inferior por debajo de la desembocadura de las venas renales. Rápidamente se abrió la cavidad torácica y se introdujo un catéter de plástico en la porción torácica de la vena cava inferior recogiendo el catéter a partir de este momento todo el flujo de salida procedente del hígado.

Los primeros 300 ml de medio se desecharon, agregando a los restantes 100 ml 40 mg de colagenasa (0.15 U/mg) y CaCl₂ 1 mM. Tras 20 min de perfusión con colagenasa, la suspensión celular se filtró a través de varias capas de gasas y se centrifugó durante 1 min a 50g. El precipitado se resuspendió en medio Hepes sin colagenasa y se centrifugó de nuevo para eliminar los restos de membranas. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en el medio de cultivo. La viabilidad de la suspensión de hepatocitos obtenida, determinada mediante el ensayo de tinción con el colorante Azul de tripan y a través de la medida de la actividad lactato deshidrogenasa, fue superior al 90%.

1.3.3.2.- Aislamiento de hepatocitos fetales

Los hepatocitos fetales se prepararon por el método de digestión con colagenasa (Martín-Sanz et al., 1987). En el día 19, 20 ó 21 de gestación, ratas Albino Wistar preñadas se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los fetos por cesárea. Se tomaron en total 12 g de hígado fetal que, tras trocear para hacer una papilla homogénea, se distribuyeron en erlenmeyers (3g/erlenmeyer) y se incubaron en un baño con agitación (40 ciclos/min) a 37°C, durante 30 min, bajo gaseo continuo (O₂/CO₂, 19:1), con 15 ml/erlenmeyer de medio Krebs bicarbonato sin calcio (NaCl 0.12 M, NaHCO₃ 0.02 M, glucosa 10 mM, KCl 0.48 M, MgSO₄ 0.12 M y fosfato potásico 0.12 M) y EGTA 0.5 mM. La suspensión celular resultante se centrifugó a 50g durante 2 min. El precipitado se resuspendió e incubó de nuevo durante 60 min en 15 ml/erlenmeyer de medio Krebs bicarbonato suplementado con calcio 2.5 mM y colagenasa 0.5 mg/ml.

Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión se pasó a través de un filtro de 500 µm y se centrifugó durante 4 min a 35g. Tras aspirar el sobrenadante, el precipitado de células se resuspendió en 10 ml de medio Krebs bicarbonato sin calcio y se filtró a través de

una membrana de nylon de 200 μm . El filtrado se centrifugó a 35g durante 4 min y el precipitado se resuspendió de nuevo en 10 ml de medio Krebs, filtrándose a través de una membrana de 100 μm . Tras centrifugar a 35g durante 4 min la operación se repitió una vez más, filtrando en esta ocasión a través de una membrana de 60 μm .

La contaminación con células hematopoyéticas se determinó por observación microscópica siendo menor del 5%. La viabilidad celular, determinada por el ensayo de tinción con el colorante Azul de tripan y a través de la medida de la actividad lactato deshidrogenasa, fue superior al 90%.

1.3.3.3.- Condiciones de cultivo

Los hepatocitos aislados adultos y fetales de 21 días ($3-4 \times 10^6$) se sembraron en platos de cultivo de 6 cm empleando un medio de cultivo que contenía 2.5 ml de DMEM suplementado con 10% (v:v) de suero bovino fetal. Después de 4h de incubación para facilitar que las células quedasen adheridas a los platos, se aspiró el medio y se lavaron las células dos veces con PBS para eliminar los hepatocitos no adheridos.

El medio se reemplazó por 2 ml de DMEM conteniendo un 0.2% de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (Fracción V). Las hormonas y ligandos empleados en los distintos experimentos, preparados bajo condiciones estériles, se adicionaron al medio de cultivo de tal manera que el volumen del medio no se vió afectado en más de un 2%. Cuando se investigó el efecto de la actinomicina D o la cicloheximida, las células se incubaron 30 min con los inhibidores antes de la adición de hormonas o ligandos.

Se eligieron los cultivos de hepatocitos fetales de 21 días debido a que la máxima diferencia en la respuesta hormonal de la PFK-2/FBPasa2 observada en cultivo primario se producía en esta edad gestacional.

Para medir la concentración de Fru 2,6-P₂, las células (platos de 1 cm) se recogieron con 1 ml de NaOH 50 mM, manteniéndose a 80°C durante 10 min.

Para determinar las actividades enzimáticas los hepatocitos se lavaron una vez con medio DMEM sin albúmina y se extrajeron con 1 ml de un medio que contenía fosfato potásico 20 mM, DTT 1 mM, NaF 50 mM, PMSF 0.5 mM y leupeptina 10 μM , pH 7.4. La suspensión celular se sometió a la acción de los ultrasonidos durante cuatro períodos de

20s para romper las células e inmediatamente se centrifugó 15 min a máxima velocidad en una centrifuga eppendorf para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se fraccionó con polietilenglicol al 15 % para precipitar la PFK-2/FBPasa2. El precipitado se resuspendió en el medio de extracción sin NaF.

1.3.4.- Transformación de bacterias competentes. Preparación de plásmidos. Obtención de insertos.

Bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α se hicieron competentes por el método de Hanahan modificado (Sambrook et al., 1989), transformándose posteriormente con 1 ng de plásmido, que contenía el inserto empleado en el análisis por Northern Blot.

Las bacterias transformadas se crecieron en placas de medio LB a las que se añadió el antibiótico al que eran resistentes en virtud del plásmido introducido.

Las bacterias transformadas con el plásmido se dejaron crecer en 100 ml de medio LB+antibiótico, manteniéndose durante toda la noche a 37 °C con agitación constante. El cultivo de bacterias se centrifugó a 3000g durante 3-5 min, tras lo cual se añadió lisozima con el fin de digerir la pared bacteriana. Tras 15 min a temperatura ambiente, se añadió la solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%), se mantuvo a esta temperatura 5 min y se llevó finalmente a 4 °C. Para precipitar las proteínas y el ADN cromosómico, se añadieron 4.5 ml de acetato potásico 5M pH 4.5 y se incubó a 4 °C durante 15 min, eliminándose posteriormente por filtración. El ADN plasmídico se precipitó del sobrenadante con isopropanol y para eliminar los ARN de la preparación, se añadieron 50 μ /ml de ARNasa A 10 mg/ml, incubando a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 250 μ g/ml de proteinasa K y se incubó 2h a 50 °C.

Finalmente, se extrajo el ADN plasmídico con 500 μ l de una mezcla 1:1 (v/v) de fenol/cloroformo. El proceso de extracción se repitió hasta que no se apreció interfase. El ADN se precipitó a -20 °C durante toda la noche con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4.5 y 2 volúmenes de etanol absoluto. La cantidad de plásmido obtenido se analizó espectrofotométricamente y por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris 0.02 M pH 8.5, EDTA 0.4 mM, ácido bórico 0.2 M).

Los insertos se obtuvieron por digestión de los plásmidos con el/los enzimas de

restricción adecuados. Para ello, se incubó, durante toda la noche a la temperatura adecuada, una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 150 μ l, tampón de restricción 1x, 200 μ g del plásmido a digerir y una unidad/ μ g de plásmido del enzima de restricción. El inserto se separó del plásmido digerido por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y extracción con fenol/cloroformo.

Los plásmidos e insertos utilizados fueron los siguientes:

	PFK-2/FBPasa2	PEPCK	L-PK	α -CREB	β -actina
Plásmido	pEMBL	pBR322	pBR322	pGEM	pUC18
Resistencia	Amp	Tetr	Tetr	Amp	Amp
Enzima de restricción	EcoRI	PstI	PstI	EcoRI/ HindIII	EcoRI/ HindIII
Inserto	1.4 Kb	1 Kb	1.8 Kb	1.25 Kb	0.6 Kb

Ribosonal 18S	
Plásmido	pBR322
Resistencia	Tetr
Enzima de restricción	-----
Inserto	200 bp

2.- Métodos

2.1.- Determinación de Fru-2,6-P₂

La cantidad de Fru 2,6-P₂ se determinó por el procedimiento descrito por Van Schaftingen y colaboradores basado en la medida de la actividad de la PPI-PFK de patata, enzima que cataliza el paso de Fru 6P y PPI a Fru 1,6-P₂ y Pi en presencia de Fru 2,6-P₂ (Van Schaftingen et al., 1982). El ensayo contenía, en un volumen final de 0.2 ml, Tris-HCl 20 mM, acetato magnésico 5 mM, DTT 5 mM, NADH 0.15 mM, ALD 10 µg/ml, TIM/GDH 20 µg/ml, Fru 6P 1 mM, PPI-PFK 0.4 unidades/ml y 20 µl de los homogenados hepáticos en NaOH 50 mM (1:20, p/v). La reacción se inició por la adición de pirofosfato 0.5 mM, midiéndose la absorbancia a 340 nm. La disminución de la absorbancia a 340 nm es proporcional a la cantidad de Fru 2,6-P₂ presente en los extractos.

2.2.- Determinación de la actividad quinasa de la PFK-2/FBPasa2

La medida de la actividad PFK-2 se basa en la formación de Fru 2,6-P₂ a partir de ATP y Fru 6P, según el método descrito por Bartrons y colaboradores (Bartrons et al., 1983). La actividad PFK-2 "total" y la actividad PFK-2 "activa", correspondiente a la forma no fosforilada del enzima, fueron medidas a pH 8.5 y 6.6, respectivamente. Basándose en las características cinéticas del enzima, a pH 8.5 las dos formas tienen la misma actividad, mientras que a pH 6.6 la forma fosforilada es prácticamente inactiva en las condiciones del ensayo.

Para la medida de la actividad PFK-2 total la muestra se incubó a 30°C en un volumen final de 200 µl de un medio compuesto por Tris-HCl 50 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 7 mM, Fru 6P 5 mM, MgATP 5 mM y fosfato potásico 1 mM, pH 8.5. La forma activa de la PFK-2 se midió en un medio de incubación que contenía PIPES 50 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 7 mM, Fru 6P 1 mM, MgATP 5 mM y fosfato potásico 5 mM, pH 6.6. La cantidad de Fru 6P estaba en relación 1:3 con la Glu 6P para prevenir cambios en su concentración por la acción de la fosfoglucoisomerasa. Las incubaciones se pararon añadiendo un volumen de NaOH 50 mM y calentando a 80°C durante 10 min. La Fru 2,6-P₂ formada se determinó basándose en el poder estimulador del metabolito bisfosfato sobre la PPI-PFK de patata. Una unidad de actividad PFK-2 se definió como la cantidad de enzima que catalizó

la formación de 1 pmol de Fru 2,6-P₂ por minuto a 30°C.

2.3.- Detección con anticuerpos de la PFK-2/FBPasa2

2.3.1.- Preparación de anticuerpos

Se prepararon dos anticuerpos policlonales: un primer anticuerpo frente a un decapeptido correspondiente al dominio aminoterminal de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto (GELTQTRLQK) (**anticuerpo específico**), y un segundo anticuerpo frente al enzima adulto purificado (**anticuerpo común**). Para ello, conejos blancos macho, raza New Zealand, se inmunizaron con inyecciones intradérmicas múltiples de una emulsión compuesta por 300 µg de antígeno en 1 ml de adyuvante Freund's completo (1:1). La inmunización se completó cada dos semanas con inyecciones de recuerdo (inyecciones "booster") que contenían 100 µg de antígeno en adyuvante Freund's incompleto. El péptido se acopló con glutaraldehído y hemocianina dializada según el método descrito por Reichlin en 1980.

Una vez inmunizados los conejos, se recogió la sangre y se mantuvo toda la noche a 4°C para que se formara el coágulo. Al día siguiente y con el fin de separar el suero del coágulo, se centrifugó a 4°C, durante 15 min, a 1500g. El suero se guardó a -70°C hasta el momento de ser utilizado.

2.3.2.- Análisis por Western blot

Las proteínas se fraccionaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en un gel al 10% de acrilamida/bisacrilamida (29.2/0.8) (SDS/PAGE), según el método descrito por Laemmli en 1970. Previa a su aplicación en el gel, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min en el tampón de muestras Laemmli (5:1), cuya composición es Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 2% SDS, glicerol al 10%, 5% β-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol. El tampón de electroforesis está compuesto por Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.01%.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno difluoruro Hybond™-PVDF (Amersaham) aplicando, durante 15h, un voltaje de 0.5 mA/cm. El medio de transferencia contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3. Después de la transferencia y con el fin de saturar los puntos de unión

inespecíficos, las membranas se mantuvieron durante 2h en una solución de leche en polvo desnatada al 3% en TBS (Tris 10 mM pH 7.5 y NaCl 0.1 M). Transcurrido este tiempo y tras lavar 4 veces con TBS y Tween 20 al 0.1% (TTBS) (5 min/lavado), las membranas se incubaron durante 90 min con los anticuerpos común y específico de la PFK-2/FBPasa2. Tras la incubación, las membranas se lavaron de nuevo con TTBS y se expusieron durante otros 90 min a un segundo anticuerpo, una inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa.

Tras los 90 min de incubación con el segundo anticuerpo, se volvieron a realizar 4 lavados con TTBS y, finalmente, se reveló el antígeno empleando el sistema ECL (Amersham). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría láser empleando como control muestras de PFK-2/FBPasa2 purificadas transferidas en las mismas membranas.

2.4.- Extracción de ARN total

El ARN total presente en 100 mg de hígado se obtuvo por el método de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las muestras se homogeneizaron en un medio que contenía 4 ml de solución D (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7.0, sarcosil 0.5% y β -mercaptoetanol 0.1 M), 0.4 ml de acetato sódico 2 M y 4.4 ml de fenol bidestilado pH 7, solución en la que las proteínas quedan desnaturalizadas evitando de este modo que las ARNasas puedan degradar al ARN.

El medio de homogeneización se repartió en tubos eppendorf añadiendo 100 μ l/ml de mezcla Chisam (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1). Para solubilizar el ARN, los tubos se agitaron vigorosamente durante 30s y se mantuvieron en hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 4°C en una centrífuga Eppendorf, tomando la fase superior. Para precipitar el ARN, se añadió un volumen de isopropanol, manteniendo las muestras como mínimo 1h a -20°C.

Después de la precipitación, las muestras se centrifugaron nuevamente durante 15 minutos a 4°C. El precipitado de ARN se lavó dos veces con etanol al 75%, centrifugando durante 5 min entre cada lavado. En el caso de que se partiera de tejido, el ARN se reextrajo siguiendo el mismo procedimiento.

Para determinar la cantidad y calidad del ARN, se eliminó el etanol y el precipitado se resuspendió en EDTA 1 mM en agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC). La muestra se valoró en el espectofotómetro y se midió su absorbancia a 260, 280 y 310 nm, valores que corresponden, respectivamente, a la cantidad de ARN, proteínas e impurezas presentes en la preparación. La relación entre DO_{260}/DO_{280} es un índice de la calidad del ARN, considerándose buenos los valores comprendidos entre 1.9 y 2.

Para la extracción del ARN total de los cultivos de hepatocitos fetales y adultos, las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en 1 ml de solución D, 0.1 ml de acetato sódico 2 M y 1.1 ml de fenol bidestilado pH 7, procesándose de la misma manera que la indicada para la extracción del ARN total de las muestras de tejido.

2.5.- Obtención de poliA-ARN

Los ARNm se separaron del resto de ARNs por cromatografía de afinidad en oligo (dT)-celulosa (Sambrook et al., 1982). En primer lugar, se pesaron 75 mg de oligo (dT)-celulosa (Stratagene), se disolvieron en 2 ml de agua DEPC y se mantuvieron a 4°C durante 1-2h para que se hidratara la resina.

Las columnas (poly-prep chromatography columns, Bio-Rad) se lavaron varias veces con NaOH 0.1 N preparada en agua DEPC, se llenaron con 10 ml de esta solución, y se mantuvieron durante aproximadamente 1h. Transcurrido este tiempo, se lavaron dos veces con agua DEPC y se añadió la resina ya hidratada, empaquetándola hasta aproximadamente 0.5 cm. Las columnas se lavaron de nuevo con 1 ml de agua DEPC y se equilibraron con tampón de unión BB1x hasta pH neutro (medio BB2x: Tris-HCl 0.02 M, NaCl 1 M, EDTA 2 mM y SDS al 1% pH 7.5; el tampón se diluye con agua DEPC).

1 mg de ARN total se resuspendió en 500 μ l de agua DEPC y, tras calentar durante 10 min a 65°C con el fin de desnaturalizar el ARN y enfriar posteriormente a 4°C, se completó el volumen de resuspensión a 1 ml con tampón BB2x. Una vez resuspendido, el ARN se aplicó a la columna. El eluato se recogió inmediatamente en un tubo estéril, se calentó a 65°C durante 5 min y, tras enfriar a 4°C, se aplicó de nuevo a la columna. Para mejorar el rendimiento, el proceso se repitió en otras dos ocasiones.

Tras añadir el ARN, la columna se lavó con tampón BB1x hasta que la absorbancia

a 260 nm del eluato fue indetectable. En este punto los ARNm se eluyeron con 4 ml de tampón de elución (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 1 mM, SDS 0.05 %, pH 7.5), precalentado a 37°C. Las fracciones con mayor D.O. a 260 nm, normalmente las dos primeras fracciones, se precipitaron a -20°C durante toda la noche con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M y un volumen de isopropanol.

Transcurrido el tiempo de precipitación, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 4°C en una centrífuga Eppendorf. El ARNm precipitado se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en 5-10 µl de agua DEPC. En condiciones normales, la cantidad de poliAs extraídos corresponde a un 10% del total de ARN a partir del cual se obtienen.

2.6.- Análisis por Northern blot

Alícuotas de ARN total (20-30 µg) se desnaturalizaron a 65°C durante 15 min en formaldehído 5%, formamida 50%, glicerol 8%, azul de bromofenol 0.4% y cianol xileno 0.4%. Tras la desnaturalización, el ARN total se fraccionó por electroforesis (20 mA, 15h) en un gel de agarosa al 0.9% que contenía formaldehído al 2% y tampón MOPS 1x (MOPS 10x: MOPS 0.2 M, acetato sódico 0.05 M y EDTA 5 mM pH 7.4) (Maniatis et al., 1982). Después de transferir el ARN del gel a membranas Nytran NY-13N con SSC 10x (NaCl 1.5 M y citrato sódico 0.3 M pH 7.4) mediante un sistema de vacío a baja presión, las membranas se prehibridaron durante al menos 6h a 42°C, en un medio que contenía formamida 50%, NaCl 0.25 M, fosfato sódico 0.1 M pH 7.2, SDS 7% y ADN de esperma de salmón 0.1%. Transcurrido el tiempo de prehibridación y después de marcar los fragmentos de ADN empleados como sondas con [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) por el método random primed (eficiencia del 37-55%), las membranas se hibridaron durante 16h a 42°C.

Tras la hibridación, las membranas se lavaron una vez a temperatura ambiente durante 10 min y una o dos veces a 42°C durante 30 min con SSC 0.1x y SDS 0.1% (relación señal/fondo, 3:1), exponiendo la membrana a una película Hyperfilm-MP (Amersham). Para corregir las deficiencias de carga y comprobar que las diferencias en la expresión de los ARNm eran específicas, cada membrana se rehibridó con un fragmento de 0.6 Kb EcoRI/HindIII, aislado de un vector VC18, que reconoce específicamente el ARNm de la β -actina (amablemente cedida por José Gonzalez Castaño. Instituto de Investigaciones

Biomédicas. CSIC. Madrid), o bien, en los casos en los que el ARNm de la β -actina variase, una sonda que reconocía al ARN ribosomal 18S (amablemente cedida por la Dra. Isabel Fabregat. Universidad Complutense de Madrid), marcado en este caso mediante el método del desplazamiento de mella ("nick-translation"). La cuantificación de las señales obtenidas se realizó por densitometría (Molecular Dynamics, Kemsing, U.K). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias como el cociente de la expresión del ARNm a estudio/ β -actina o ribosomal.

Las sondas empleadas en el análisis Northern blot fueron:

- Sondas que reconocen al ARNm de la PFK-2/FBPasa2

* **Sonda común:** Fragmento de 1.4 Kb EcoRI aislado del ADNc de la PFK-2/FBPasa2 (exones 3-14), que reconoce específicamente el ARNm expresado en hígado, músculo esquelético y línea celular FTO2B (Colosia et al., 1988; Darville et al., 1989; Dupriez et al., 1993), amablemente cedida por el Dr. Tauler, Universidad Autónoma de Barcelona.

* **Sonda 0.5 kb:** Fragmento de 480 bp correspondiente a los exones 1, 2 y parte del 3 de la secuencia de la PFK-2/FBPasa2 de hígado de rata (nucleótidos 172-649 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción (+1)) (Lange et al., 1989), aislado del plásmido pBS(SK)500 (amablemente cedido por el Dr. Tauler, Universidad Autónoma de Barcelona) tras la digestión con los enzimas PstI/HindIII.

* **Sonda 1L:** Fragmento de 310 bp correspondiente al exón 1L que reconoce específicamente el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto (nucleótidos 182-469) (Crepin et al., 1988), preparada por PCR a partir de ADN genómico (par de cebadores sentido: 5'GCG/GCC/G AA/TTC/TAC/ATC/TGG/GAG/CAG/AAG3', antisentido 5'GCG/GCC/GAA/TTC/GCC/CCT/TCG/CCG/TTG/CAG3'). A partir de esta sonda y mediante digestión con el enzima XhoI, eliminamos los últimos 90 nucleótidos empleando también este fragmento como sonda (sonda 1L-90).

* **Sonda 1M:** Fragmento de 170 bp correspondiente al exón 1M que reconoce específicamente el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético (nucleótidos 33-178) (Darville et al., 1989), preparada por PCR a partir de ADN genómico (par de cebadores: sentido 5'GCG/GCC/GAA/TTC/AGG/GCG/CTT/CCT/CAG/CCT/TCC3', antisentido 5'GC

G/GCC/GAA/TTC/TGT/TCT/CTT/AGA/GGC/TTT/TTC3').

* **Sonda FTO2B:** Fragmento de 227 bp correspondiente al exón 1af de la secuencia del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en células FTO2B (nucleótidos 69-271) (Dupriez et al., 1993), preparada por PCR a partir de ADN genómico (par de cebadores: sentido 5'GCG/GCC/AAG/CTT/CGG/AGC/TGA/GGT/GGA/GGC/TGT3', antisentido 5'GCG/GC C/AAG/CTT/GCT/AGC/GTG/CGG/CCA/GAA/GAG3').

- El análisis del ARNm de la PEPCK se llevó a cabo con un fragmento de 1 Kb PstI aislado de un vector pBR322 (Friedman et al., 1993), amablemente cedida por la Dra. Predestinación García Ruiz, Universidad Autónoma de Madrid.

- Los niveles de ARNm de la L-PK se determinaron con un fragmento de 1.8 Kb PstI aislado de un vector pBR322 (Lone et al., 1986), amablemente cedida por el Dr. Axel Kahn, Instituto Cochin. París.

- Los niveles de ARNm de la proteína α -CREB se determinaron con un fragmento de 1.25 Kb aislado de un vector pGEM, amablemente cedido por el Dr. José Ramón Naranjo, Instituto Cajal. Madrid.

2.7.- Hibridación en solución/Ensayo de protección con ARNasas

Otra de las técnicas que se empleó en el análisis del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 presente en hígado fetal de rata fue la técnica de hibridación en solución/ensayo de protección con ARNasas (Zinn et al., 1983). El fragmento que comprendía los exones 1L, 2 y parte del exón 3 de la secuencia de hígado adulto de rata (nucleótidos 171-650, con respecto al sitio de iniciación de la transcripción (+1)) (Lange et al., 1989), se insertó en el sitio de policlonaje del plásmido pBS (SK) entre los promotores del bacteriófago T7 y T3 de tal forma que permitió la síntesis de ARN antisense.

El ensayo consta de tres etapas:

a) Síntesis de la ribosonda: Después de linearizar el plásmido con el enzima de restricción Hind III, se llevó a cabo la reacción de transcripción *in vitro* en una mezcla que contenía, en un volumen final de 20 μ l, Tris-HCl 40 mM pH 7.9, MgCl₂ 6 mM, espermidina 2 mM, NaCl 10 mM (tampón de transcripción 1x), DTT 10 mM, 40 unidades de inhibidor de ribonucleasas pancreático, 0.5 mM de ribonucleótidos (rATP, rGTP y rCTP), rUTP 24

μM , 500 ng del plásmido linearizado, 50 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (600 Ci/mmol) y 15 unidades del enzima T3 ARN polimerasa. La incubación se hizo a 37°C durante 1h, transcurrida la cual se incubó el ADN a 37°C durante 15 min, con una solución que contenía 1 μl de inhibidor de ARNasas VRC, 10 unidades del enzima ADNasaI y 7.5 μg de ARNt.

La ribosonda sintetizada se extrajo primero con fenol/chisam (1/1, v/v) y, posteriormente, con chisam. Se precipitó a -20°C durante 45 min en 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.075 volúmenes de acetato sódico 3 M. Transcurridos los 45 min, se centrifugó durante 30 min a velocidad máxima en una centrífuga Eppendorf, el precipitado se resuspendió en 30 μl de agua DEPC y se reprecipitó a -20°C durante otros 45 min, con 1.5 μl de acetato sódico 3 M y 75 μl de etanol absoluto. Finalmente, y tras centrifugar durante 30 min en una centrífuga Eppendorf, el precipitado se resuspendió en la cantidad apropiada de agua DEPC para que la ribosonda sintetizada tuviera 10^6 cpm/ μl , manteniéndose a 4°C hasta su uso.

b) Hibridación en solución: 40 μg de ARN total se resuspendieron en 29 μl del tampón de hibridación 1x (precalentado a 42°C), formado por un volumen de tampón de hibridación 4x (Tris 80 mM pH 7.6, EDTA 4 mM, NaCl 1.6 M, 0.4% SDS) y 3 volúmenes de formamida desionizada. Tras añadir 1 μl de ribosonda (10^6 cpm/reacción), la mezcla de reacción se calentó a 85°C durante 5 min, con el fin de evitar estructuras secundarias que impidiesen una correcta hibridación ARNm-ribosonda, se enfrió lentamente hasta 42°C y se mantuvo la hibridación a esta temperatura durante toda la noche. También se incubaron dos tubos adicionales sin ARN que sirvieron como control del funcionamiento posterior de las ARNasas (control positivo) y como control del estado de la ribosonda (control negativo).

c) Ensayo de protección frente a ARNasas: Después de 18h de hibridación, el ARN no hibridado y el control positivo se digirieron a 30°C durante 1h con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARNasa A y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARNasa T, en un tampón formado por Tris 10 mM pH 7.6, EDTA 5 mM y NaCl 300 mM. El control negativo se trató con el mismo tampón sin contener ARNasas. Tras el período de incubación, las muestras se trataron con 20 μl de SDS 10% y 50 μg de proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), durante 15 min a 37°C . Los híbridos se extrajeron con fenol/chisam y se precipitaron a -20°C , por espacio de 1h, con acetato sódico 4 mM, 2.2 volúmenes de etanol absoluto y 20 μg de ARNt.

Finalizada la precipitación, se centrifugó a 4°C, a máxima velocidad durante 30 min utilizando una centrífuga Eppendorf. El ARN protegido se resuspendió en agua DEPC y se añadió el tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM y 0.03 ng/μl de una mezcla de cianol xileno 1 ng/μl y azul de bromofenol 1 ng/μl). Tras desnaturalizar a 95°C durante 3 min, los productos se analizaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida (19/1) al 8% conteniendo urea 8M. El gel se secó y se expuso a una película autorradiográfica Hyperfilm-MP (Amersham).

2.8.- Reacción de extensión con cebador ("Primer extension")

El estudio del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en el hígado fetal se amplió utilizando la técnica de la reacción de extensión con cebador (Primer extension), que se utiliza para determinar la localización del extremo 5' de ARNm específicos. Esta técnica emplea un oligonucleótido específico, marcado en el extremo 5', que se hibrida al ARNm y actúa, en presencia de deoxinucleótidos, como cebador para el enzima transcriptasa en reverso. De esta forma, el ARNm se transcribe a ADNc, producto que se analiza en un gel desnaturizante de poliacrilamida. La longitud del ADNc refleja el número de bases existentes entre el nucleótido marcado del cebador y el extremo 5' del ARNm (Sambrook et al., 1989).

El análisis consta de tres etapas:

a) Marcaje del oligonucleótido: El oligonucleotido se marca en su extremo 5' empleando el enzima polinucleótido quinasa T4, enzima que cataliza la transferencia del (γ)fosfato terminal del ATP al 5'-hidroxil terminal del ADN y ARN. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante 1h, en un medio que contiene, en un volumen final de 25 μl, 40 pmoles del oligonucleótido a marcar, tampón quinasa 1x (tampón 10x: Tris-HCl 0.5 M, MgCl₂ 0.1 M, DTT 50 mM, espermidina 1 mM y EDTA 1 mM, pH 7.6), 150 μCi [γ-³²P]ATP y 25 unidades del enzima polinucleótido quinasa T4. La incubación se para añadiendo al volumen de reacción 1 μl de EDTA 0.5 M pH 8, completando hasta 100 μl con agua bidestilada y calentando a 70°C durante 10 min. En nuestro ensayo se utilizó el oligonucleótido antisense P 5'ATT/AGT/GAA/CTG/TGG/TAT/GGA/G3' complementario a los nucleótidos 471-492 de la secuencia de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto (Lange et

al., 1989), marcado con una actividad específica de $0.5-1 \times 10^9$ cpm/ μ g (fig. 2.2).

b) Hibridación del oligonucleótido marcado al ARNm: 5 μ g de poliA-ARN se hibridaron con el oligonucleótido marcado (10^6 cpm/reacción de hibridación) durante 30 min a $58-60^\circ\text{C}$, en un volumen de reacción de 16 μ l formado por Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM y DTT 10 mM (tampón 1x del enzima transcriptasa en reverso, RTB).

c) Transcripción en reverso: La extensión del cebador se llevó a cabo durante 1h a 37°C en 30 μ l de tampón RTB suplementado con los cuatro deoxinucleótidos a una concentración de 1 mM, 25 unidades de inhibidor de ARNasas pancreático y 50 unidades del enzima transcriptasa en reverso (StratascriptTM, Stratagene). Transcurrida la hora de incubación, la mezcla se trató a 37°C durante 20 min con 30 μ g/ml de ARNasa A para digerir el ARN no transcrito y, posteriormente, con proteinasa K (50 μ g/ml) durante 15 min a la misma temperatura. Tras la extracción con un volumen de fenol/chisam, los productos de la reacción se precipitaron con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto y se analizaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida (19/1) al 8% conteniendo urea 8 M.

2.9.- Análisis por RT-PCR del ARN de la PFK-2/FBPasa2

Otra técnica empleada en el estudio del extremo 5' del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 fue la técnica RT-PCR (transcripción en reverso-reacción de la polimerasa en cadena). Mediante esta técnica el ARNm se transcribe a ADNc que se amplifica *in vitro* a partir de oligonucleótidos específicos (McPherson et al., 1992).

En la transcripción en reverso del ARN y posterior amplificación por PCR se utilizó el sistema GeneAmp ARN PCR (Perkin-Elmer Cetus), diseñado para el análisis de la expresión génica a nivel de ARN. ARN total (5 μ g) se transcribió en reverso a ADNc con 2.5 unidades/ μ l de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina tipo Moloney (MuLV), en presencia de oligo dT₁₆ 2.5 μ M como cebador y dNTPs 1 mM. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 80 μ l, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3 (tampón PCR 1x), MgCl_2 5 mM y 80 unidades de inhibidor de ARNasas pancreático. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 45 min y se paró calentando la mezcla a 99°C

durante 5 min y enfriando las muestras finalmente a 5°C durante otros 5 min.

La síntesis de la segunda cadena de ADN y posterior amplificación se realizó en un volumen de 50 µl de tampón PCR 1x (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8.3), MgCl₂ 2.5 mM, 10 µl de la mezcla de reacción en la que se sintetizó el ADNc, dNTPs 0.2 mM, 1.25 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq y 25 pmoles del par de cebadores escogidos para la amplificación. En las PCRs semicuantitativas, el cebador antisense se marcó con [γ -³²P]ATP empleando el enzima polinucleotido quinasa T4 (eficiencia 16-32%). Tras un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 min, la amplificación constó de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación de los cebadores a sus respectivas cadenas de ADN a 55°C durante 2 min y extensión de la cadena a 72°C durante 3 min, seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 min.

Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en tampón TBE y, en el caso de las PCRs semicuantitativas, por electroforesis en un gel de acrilamida/bisacrilamida (19/1) al 8% conteniendo urea 8M, que tras secarse se expuso a una película autorradiográfica Hyperfilm-MP (Amersham).

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en el análisis por RT-PCR se diseñaron en base a las secuencias publicadas de la PFK-2/FBPasa2 del enzima hepático (Colosia et al., 1988, Lange et al., 1989), músculo esquelético (Crepin et al., 1992) y línea de hepatoma de rata FTO2B (Dupriez et al., 1993) (fig. 2.1):

* **Oligonucleótido H (hígado):** Sentido 5'GGA/GAA/CTC/ACT/CAA/ACC/AGG/TTA/CAG/AA3', correspondiente a los nucleótidos 388-416 de la L-PFK-2/FBPasa2.

* **Oligonucleótido M (músculo):** Sentido 5'AAG/CCT/CTA/AGA/GAA/CAG/CC3', nucleótidos 109-129 de la secuencia de la PFK-2/FBPasa2 específica de músculo esquelético.

* **Oligonucleótido 1af:** Sentido 5'GAG/CTG/AGG/TGG/AGG/CTG/TA3' (nucleótidos 71-90), **oligonucleótido F** Sentido 5'CAA/AAC/TTG/GGA/AGA/GTA/AC3' (nucleótidos 199-218) y **oligonucleótido 1 bf** Sentido 5'GAT/AAA/CCA/GGA/AGA/GGC/AC3' (nucleótidos 221-240), de la secuencia del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 presente en células FTO2B.

* **Oligonucleótido N (normalización):** Sentido 5'TCC/CAC/GAT/GGT/GAT/CAT/GGT3' (nucleótidos 495-515), y **Oligonucleótido C (común)** Antisentido 5'ATC/TTG/ATG/

TAG/GAC/AGG/TGG/CTG/TCC/TGT/CCA/ATT/CCT/C3'(complementario a los nucleótidos 997-1031), pertenecientes a la secuencia de la PFK-2/FBPasa2 común a las formas presentes en músculo esquelético, células FTO2B e hígado adulto.

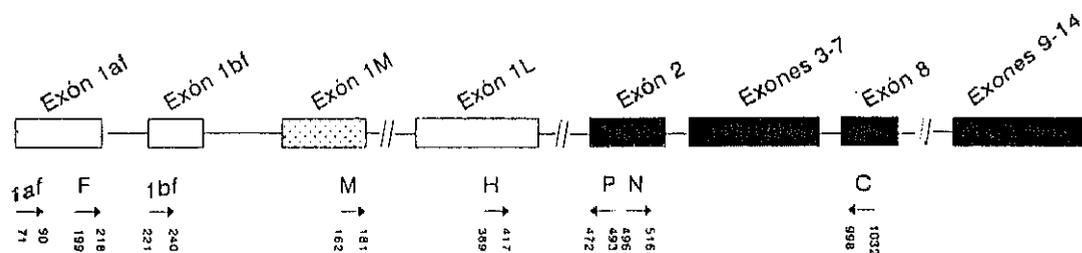


Figura 2.1. Estructura esquemática del gen A de la PFK-2/FBPasa2 en la que se indican la localización de los oligonucleótidos empleados en la técnica RT-PCR. Las cajas representan los exones: 1L, exón específico de hígado adulto; exón 1M, exón específico de músculo esquelético; exones 1af y 1bf, exones específicos de células FTO2B. Las flechas representan los oligonucleótidos diseñados, indicando la punta de flecha el extremo 5' del cebador. Los nucleótidos se numeran con respecto al sitio de iniciación de la transcripción de cada uno de los tres ARNm de la PFK-2/FBPasa2 codificados por este gen.

2.10.- Secuenciación de los productos amplificados por PCR

La naturaleza de todos los productos obtenidos mediante la técnica de PCR se determinó mediante secuenciación. En primer lugar y con el fin de poder disponer de más cantidad de fragmento sin necesidad de realizar nuevas amplificaciones, se procedió a su ligación a vectores de expresión. Se emplearon dos tipos de vectores:

a) Vector pGEM-T (Promega) para los fragmentos obtenidos en el análisis RT-PCR:

Este vector presenta desoxinucleótidos de timina en los extremos del sitio de inserción que mejoran la eficiencia de la ligación de productos obtenidos por PCR, dado que es normal que las polimerasas termoestables utilizadas en esta técnica introduzcan desoxinucleótidos de adenina en los extremos de los productos amplificados.

b) Plásmido pBS(SK) en la ligación de los fragmentos utilizados como sondas en el análisis Northern blot: Los oligonucleótidos empleados como cebadores en la reacción de PCR presentan en sus extremos sitios de digestión EcoRI o HindIII con el fin de facilitar la ligación. Antes de la reacción, el vector debe ser digerido con el enzima adecuado y tratado

con fosfatasa alcalina para evitar la unión de los extremos del sitio de inserción.

La reacción de ligación contenía, en un volumen de 25 μ l, 10 ng del fragmento amplificado por PCR, tampón ligasa 1x (tampón ligasa 10x: Tris-HCl 300 mM pH 7.8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM y ATP 5 mM), 60 ng de vector y 3 unidades de enzima ligasa T4. La mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche. Finalizada la reacción, se transformaron por choque térmico 200 μ l de bacterias competentes E.coli, NM522 ó 71/18. Las bacterias ya transformadas se crecieron a 37°C durante toda la noche en placas de medio LB con ampicilina, a las que se habían añadido X-GAL e IPTG como indicadores de color. Las bacterias que habían integrado el vector conteniendo el fragmento de PCR a secuenciar, presentaban color blanco mientras que los clones no transformados tenían color azul.

A partir de las colonias positivas, se obtuvo el plásmido que contenía el fragmento de PCR a secuenciar mediante el sistema de purificación a pequeña escala de ADN plasmídico (Magic™ Minipreps ADN purification system, Promega). 50-100 ng del ADN purificado se secuenció por PCR empleando dideoxinucleótidos de terminación fluorescentes (ABIPRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystem), siguiendo las instrucciones del proveedor y utilizando como cebadores oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de los vectores. Los dideoxinucleótidos de terminación fluorescentes se detectaron y procesaron por ordenador.

2.11.- Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó según el método descrito por Bradford (1978), utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Los cambios de absorción a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

2.12.- Métodos estadísticos

Los valores presentados son la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por triplicado de un número variable de experimentos, que se especifican en cada caso.

La significación estadística de las diferencias entre distintos valores de determinados experimentos se expresa mediante el test de la t de Student.

Capítulo 3: Resultados

1.- Estudio de la regulación hormonal de la PFK-2/FBPasa2 en el hígado fetal.

1.1.- Efecto del glucagón y del AMPc en la actividad quinasa y en la cantidad de PFK-2/FBPasa2 en cultivo primario de hepatocitos fetales y adultos.

Como se ha mencionado en el capítulo 1, trabajos previos habían demostrado que la PFK-2/FBPasa2 de hígado fetal de rata presentaba importantes diferencias con respecto al enzima bifuncional adulto, especialmente a nivel del efecto de la fosforilación en la actividad quinasa, tanto tras la incubación del enzima purificado con la subunidad catalítica de la PKA (Martín-Sanz et al., 1992), como tras el tratamiento de hepatocitos con glucagón (Martín-Sanz et al., 1987). Teniendo en cuenta estos hechos decidimos comprobar si, en cultivo primario de hepatocitos fetales y adultos, el efecto del AMPc en la actividad quinasa podría deberse a variaciones en la cantidad del enzima bifuncional presente en los hepatocitos. Para ello, hepatocitos fetales de 21 días y hepatocitos adultos se incubaron bien con glucagón (100 nM) o bien con el derivado 8-(4-clorofeniltio)AMPc (ph-AMPc, 100 μ M), analizando mediante Western blot la cantidad de proteína que contenían los hepatocitos. El Western blot se llevó a cabo empleando el anticuerpo preparado frente a la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta.

Previamente medimos la actividad quinasa en las muestras a analizar por Western blot. La tabla 1 muestra la actividad PFK-2 ensayada a pH 8.5 en presencia de concentraciones saturantes de sustratos, situación en la que la actividad es independiente del estado de fosforilación del enzima. En los hepatocitos fetales la incubación con ph-AMPc provocó un 129% de incremento en la actividad PFK-2, mientras que dicha actividad disminuyó un 54% en las células adultas incubadas en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos en las muestras incubadas con la hormona fueron similares a los obtenidos con el derivado del AMPc, confirmando los resultados mostrados por Martín-Sanz y colaboradores en 1987.

Una vez confirmados los datos de actividad pasamos a analizar por Western blot la cantidad de proteína que presentaban las mismas muestras. De acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad PFK-2 total, la cantidad de proteína inmunodetectada mediante el anticuerpo frente a la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto se incrementó en los hepatocitos fetales por efecto de la incubación con el derivado ph-AMPc

<u>Tratamiento</u>	<u>Actividad PFK-2, pmol x min⁻¹ x (mg de proteína)⁻¹</u>	
	<u>Hepatocitos fetales</u>	<u>Hepatocitos adultos</u>
Ninguno	24 ± 2	51 ± 4
ph-AMPC (100 μM)	31 ± 2	27 ± 3

Tabla 1. Actividad PFK-2 en cultivo de hepatocitos fetales y adultos.

Las células (3×10^6) se incubaron durante 6h en ausencia o presencia de ph-AMPC 100 μM. Transcurrido el tiempo de incubación, los hepatocitos se homogeneizaron y fraccionaron con polietilenglicol al 15%. La actividad quinasa se determinó a pH 8.5 en presencia de concentraciones saturantes de sustratos. Los resultados son la media ± EEM (Error estándar de la media) de tres cultivos.

(179% de incremento después de 6h de incubación). Para evaluar la posibilidad de que este aumento pudiera deberse a un incremento en la síntesis de alguna proteína que estabilizase a la PFK-2/FBPasa2, los hepatocitos fetales se incubaron durante 30 min antes de la adición del ph-AMPC, con un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida). En presencia de cicloheximida y ph-AMPC (fig. 3.1, línea C), el contenido del enzima bifuncional fue mayor que en las células no tratadas (fig. 3.1, línea A) o que en los hepatocitos incubados solamente con el derivado del AMPc (fig. 3.1, línea B). Ello parece indicar que el AMPc pudiera activar la degradación de alguna proteína que estuviera desestabilizando a la PFK-2/FBPasa2 presente en los hepatocitos fetales.

1.2.- Efecto del glucagón y del AMPc sobre los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales.

Una vez establecido mediante la utilización de anticuerpos frente al enzima adulto que los niveles de PFK-2/FBPasa2 variaban por efecto del AMPc de manera distinta en los hepatocitos fetales que en los hepatocitos adultos, decidimos comprobar si ello se debía a una regulación diferente de la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa2 por AMPc en ambas etapas del desarrollo. Para ello se estudió, mediante la técnica de Northern blot, el efecto del glucagón y de su segundo mensajero en los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en

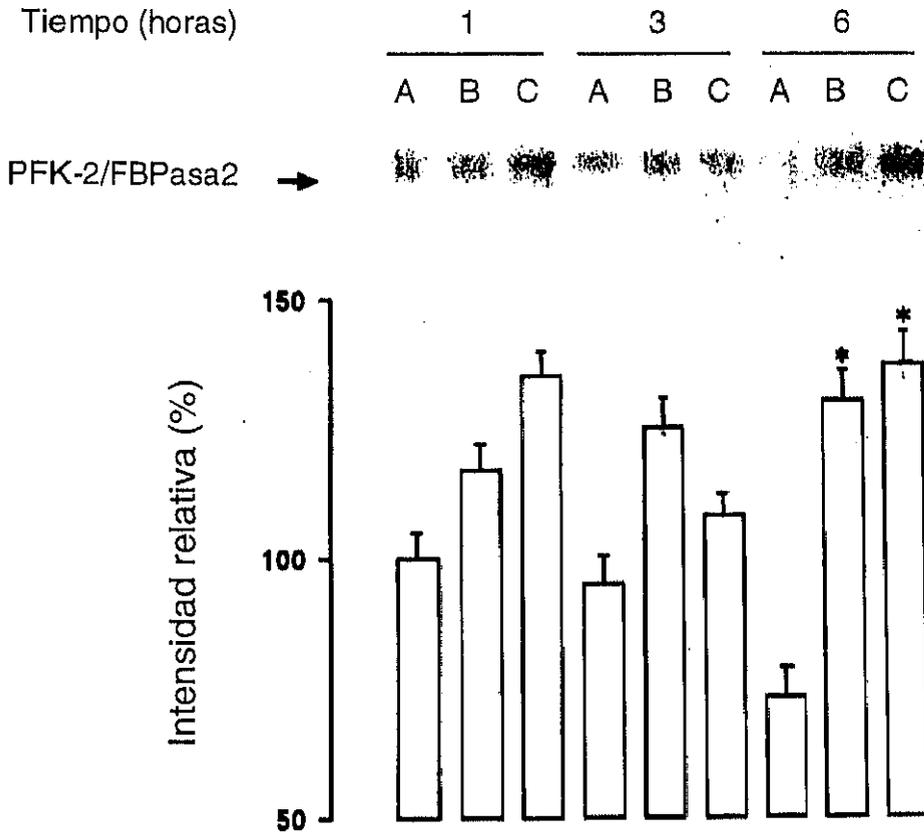


Figura 3.1. Análisis por Western blot del contenido de PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales en cultivo primario.

Adaptada de Casado et al. (1995). Los hepatocitos se cultivaron según se ha descrito en el apartado 2.1.3.2 de Material y Métodos. Tras homogeneizar las células, la PFK-2/FBPasa2 se purificó parcialmente por fraccionamiento con polietilenglicol (15%) y se sometió a electroforesis SDS-PAGE (10%) (20 μ g proteína/carril). El enzima bifuncional se identificó mediante un anticuerpo contra la proteína hepática adulta. El análisis corresponde a la media \pm EEM de tres experimentos. A, control; B, ph-AMPc 100 μ M; C, ph-AMPc 100 μ M y cicloheximida 5 μ M. *P < 0.01 vs control.

hepatocitos fetales de 21 días incubados durante 6h bien con la hormona (100 nM) o bien con el derivado ph-AMPC (100 μ M). Utilizamos la sonda de la PFK-2/FBPasa2 de 1.4 Kb común a los distintos isoenzimas descritos (Colosia et al., 1988).

En la figura 3.2 podemos observar como la sonda reconoció en los hepatocitos fetales un ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de igual tamaño que el mensajero adulto (2.1 Kb). También se puede apreciar que la incubación de los hepatocitos fetales con el análogo permeable del AMPc (ph-AMPC) supuso un incremento en los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 dependientes de tiempo y de dosis (170% respecto al valor obtenido en ausencia del derivado). Por el contrario, y de acuerdo con trabajos previos (Rosa et al., 1993), los niveles del mensajero del enzima bifuncional disminuyeron en los hepatocitos adultos incubados con ph-AMPC (60% de los valores control) (fig. 3.2; tabla 2). El efecto del tratamiento de los hepatocitos con glucagón sobre la expresión génica del enzima bifuncional fue similar al observado con el derivado del AMPc.

Se conocen otros dos enzimas claves de las vías glucolítica y gluconeogénica, la L-PK y la PEPCK, respectivamente, en los que la expresión génica es regulada por el glucagón. En el caso de la L-PK ocurre una situación muy similar a la descrita para la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto. La administración de glucagón, actuando vía AMPc, inhibe la transcripción del gen y acelera la degradación del ARNm de la L-PK (Noguchi et al., 1985; Vaultont et al., 1986; Decaux et al., 1989). La situación opuesta ocurre con el gen de la PEPCK, en el que la presencia de elevados niveles de AMPc supone un aumento en la transcripción (O'Brien y Granner, 1990) y en la estabilidad de su ARNm (Hod y Hanson, 1988). Como se aprecia en la figura 3.2 y en la tabla 2, los niveles de ARNm de la PEPCK se incrementaron rápidamente tras la incubación con el derivado ph-AMPC tanto en los hepatocitos fetales como en los hepatocitos adultos. En relación a los niveles de ARNm de la L-PK, los resultados obtenidos se asemejan a los exhibidos por el enzima bifuncional, con un incremento en los niveles del mensajero en las células fetales y la variación opuesta en los hepatocitos adultos. Dado que el efecto del AMPc en la expresión de la PEPCK en ambos tipos celulares es similar, los resultados obtenidos parecen indicar que deben existir señales específicas que participan en la respuesta de la PFK-2/FBPasa2 y L-PK al AMPc en el hígado fetal.

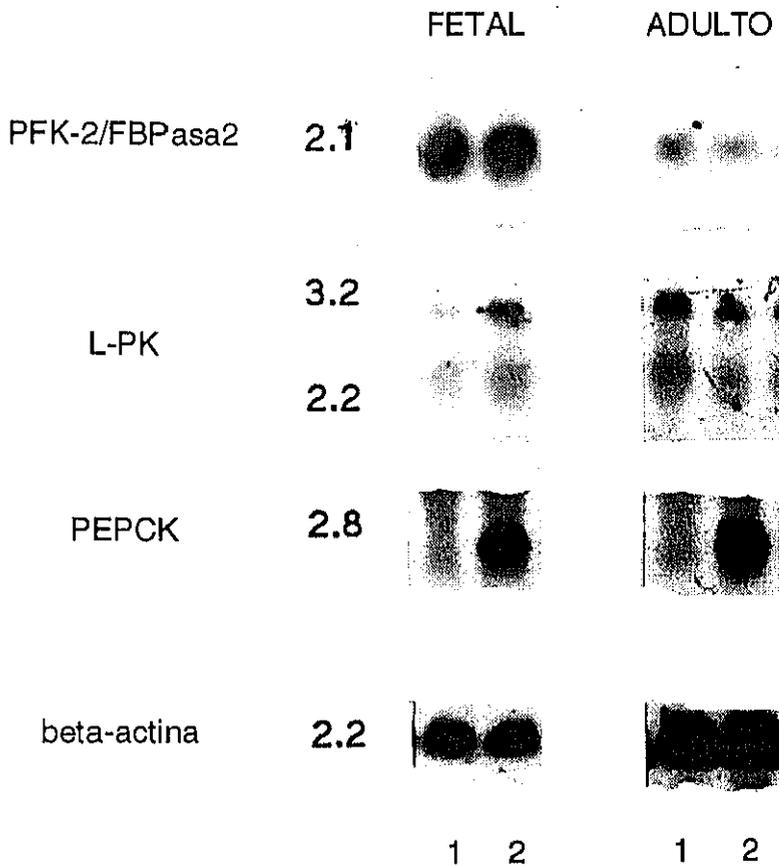


Figura 3.2. Efecto del AMPc sobre los niveles de ARNm de la L-PFK-2/FBPasa2, PEPCK y L-PK en hepatocitos fetales.

Autorradiograma representativo del análisis por Northern Blot del ARN total extraído de hepatocitos fetales de 21 días y hepatocitos adultos incubados en ausencia (línea 1) o presencia de ph-AMPc 100 μ M (línea 2). En el análisis se emplearon sondas específicas para la PFK-2/FBPasa2, PEPCK y L-PK, normalizando con la sonda específica de la β -actina. Con la sonda utilizada se distinguen dos tipos de ARNm de la L-PK con diferente longitud en la cola poli-A (3.2 y 2.2 Kb). La variación en los niveles de las dos especies de ARNm es similar, según lo descrito por Vaulont et al. (1986).

ARNm	(% Control)	
	<u>Hepatocitos Fetales</u>	<u>Hepatocitos Adultos</u>
PFK-2/FBPasa2	160 ± 19	60 ± 9
PEPCK	585 ± 67	700 ± 95
L-PK	270 ± 32	61 ± 9

Tabla 2. Efecto del AMPc en los niveles de ARNm de los enzimas reguladores de la glucólisis y gluconeogénesis en hepatocitos fetales.

El ARN total extraído de hepatocitos fetales de 21 días y hepatocitos adultos en cultivo primario ($3-4 \times 10^6$ células) incubados durante 6h en ausencia o presencia de ph-AMPc, se analizó por Northern blot empleando sondas específicas para la PFK-2/FBPasa2, PEPCK y L-PK, normalizando con la sonda específica de la β -actina (sección 2.6 de Material y Métodos). Se utilizaron las mismas membranas para la hibridación con cada una de las sondas ensayadas. Los niveles de ARNm fueron medidos por densitometría láser, corregidos por el valor correspondiente a la sonda de β -actina y expresados según la cantidad presente en los hepatocitos incubados en ausencia del derivado del AMPc, valor considerado como el 100%. Los resultados son la media \pm BEM de cuatro experimentos.

El incremento en los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 observados en los hepatocitos fetales podría ser atribuido a las condiciones de cultivo en vez de a procesos fisiológicos iniciados en respuesta al aumento en la concentración intracelular de AMPc. Para descartar esta posibilidad, analizamos los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en los hígados de fetos de 21 días inyectados transplacentalmente con una solución que contenía el derivado ph-AMPc y teofilina, un inhibidor de fosfodiesterasas que evita la degradación del derivado (fig. 3.3). Se llevó como control animales adultos inyectados intraperitonealmente con la misma solución. Los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 aumentaron un 140% en el hígado de los fetos inyectados con el derivado del AMPc, mientras que disminuyeron en el hígado adulto (77% de disminución). Por tanto, el efecto del AMPc observado en los cultivos se mantuvo *in vivo*.

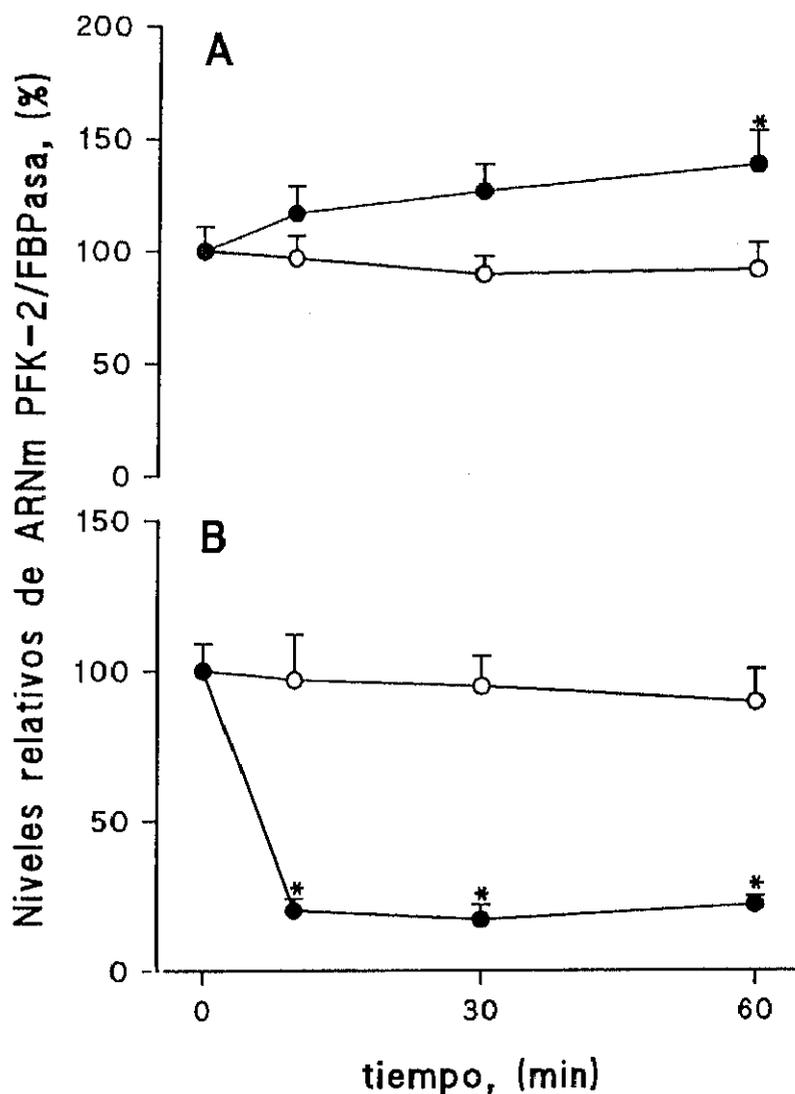


Figura 3.3. Efecto *in vivo* del AMPc sobre los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hígado fetal y adulto de rata.

Adaptada de Casado et al. (1995). Análisis por Northern Blot del ARN total extraído de hígados de fetos de 21 días inyectados transplacentalmente (panel A) o animales adultos inyectados intraperitonealmente (panel B) con una solución que contenía ph-AMPc y teofilina (50 $\mu\text{g}/\text{feto}$ ó 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso en los animales adultos) (●) o con una solución de salino (○). Los valores corresponden a la cuantificación densitométrica de las señales obtenidas por análisis Northern blot usando la sonda de la PFK-2/FBPasa2 de 1.4 Kb tras la normalización según el contenido en ARN de la β -actina. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de tres experimentos en los que se procesaron 2-3 hígados. * $P < 0.05$ vs control.

El efecto del AMPc está mediado, en parte, por la interacción específica entre CREB (proteínas que se unen al elemento de respuesta a AMPc) y secuencias CRE (elemento de respuesta a AMPc) presentes en los genes que codifican los enzimas cuya expresión se modula por el segundo mensajero (Lee, K, 1991). Decidimos comprobar, determinando los niveles de su correspondiente mensajero, si la diferente regulación de la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa2 por AMPc en hepatocitos fetales y adultos se debía a variaciones en los niveles de proteínas CREB. Como se aprecia en la figura 3.4, los niveles del ARNm de la proteína α CREB fueron similares en ambos tipos celulares.

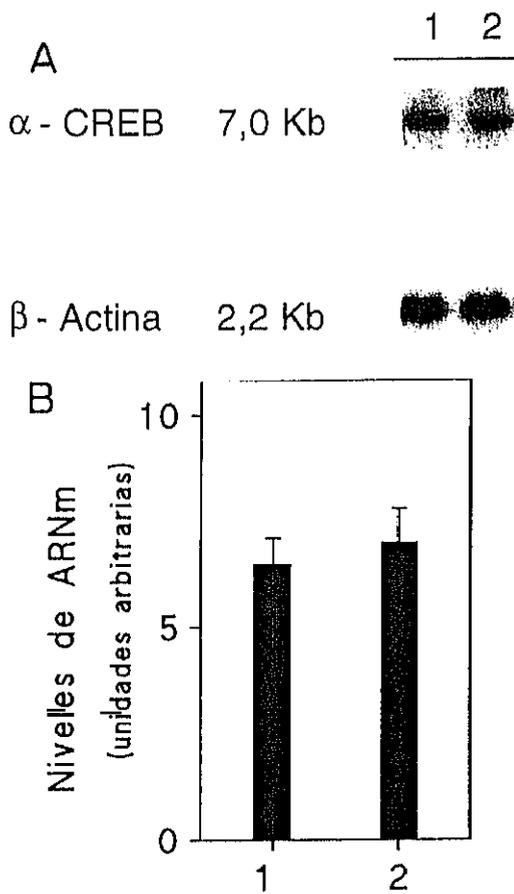


Figura 3.4. Niveles de ARNm de la proteína α -CREB en el hígado fetal y adulto.

Autorradiograma representativo del análisis por Northern Blot del ARN total extraído de hepatocitos fetales de 21 días (línea 1) e hígado adulto (línea 2). En el análisis se empleó una sonda de 1,25 Kb específica para la proteína α -CREB (panel A). Los valores corresponden a la cuantificación densitométrica de las señales obtenidas tras la corrección según el contenido en β -actina, expresado en unidades arbitrarias (panel B). Los resultados son la media \pm EEM de tres experimentos.

La sonda de ADNc de la PFK-2/FBPasa2 (1.4 Kb) comprende los exones 3 al 14 comunes a las secuencias de los ARNm de los distintos isoenzimas descritos hasta el momento. Para determinar con mayor precisión las especies afectadas por el glucagón o el AMPc en el hígado fetal, el ARN extraído de los hepatocitos fetales y adultos tras la incubación con la hormona o el derivado ph-AMPc se analizó mediante el ensayo de protección frente a ARNasas. En el ensayo se utilizó una ribosonda que comprende el exón 1L, exón 2 y parte del exón 3 de la secuencia del gen A de la PFK-2/FBPasa2, lo que permite una clara distinción entre los ARNm tipo L y tipo M, así como el presente en la línea celular de hepatoma de rata FTO2B (fig. 3.5).

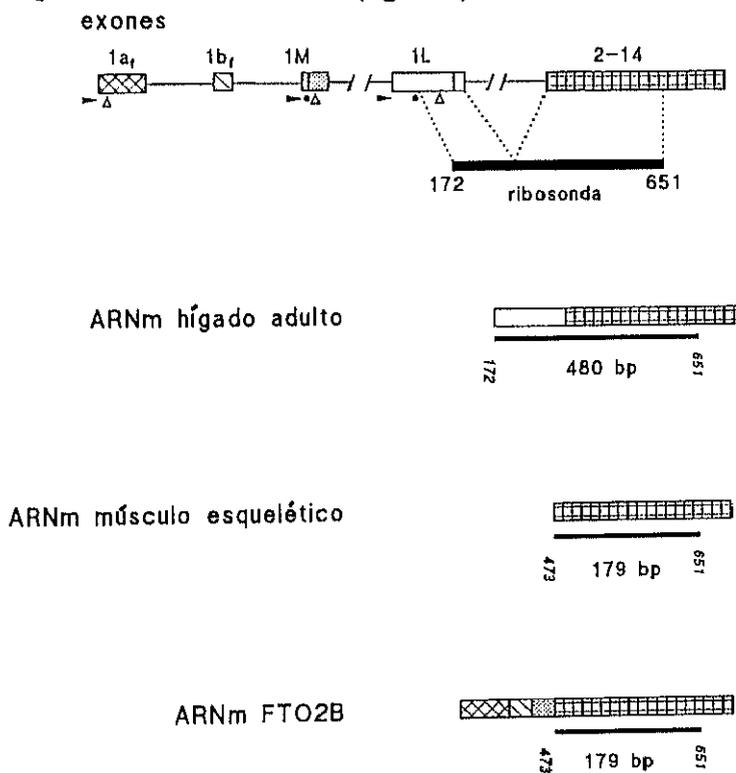


Figura 3.5. Estructura esquemática del gen de la PFK2/FBPasa2 de rata.

Adaptada de Dupriez et al. (1993). Los exones se representan como: 1L, exón específico de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto; 1M, exón específico de la PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético; 1af y 1bf, exones específicos de la PFK-2/FBPasa2 presente en la línea celular de hepatoma de rata FTO2B. El esquema incluye la localización de la ribosonda empleada en el análisis de protección frente a ARNasas, así como los fragmentos que se espera que proteja la ribosonda en las muestras de hígado adulto, músculo esquelético y en la línea celular de hepatoma de rata FTO2B. ►, sitios de iniciación de la transcripción; ●, extremos 5' del ARNm (cap sites); Δ, extremo 5' del ADNc; |, sitios de splicing.

En los hepatocitos fetales, el fragmento protegido de 480 bp correspondiente al ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L se incrementó tras la incubación con el derivado del AMPc (210%), mientras que la intensidad de este fragmento claramente disminuyó en las células adultas procesadas en paralelo (44%) (fig. 3.6; tabla 3). La intensidad del fragmento correspondiente al isoenzima de músculo esquelético y la línea celular FTO2B no varió en las muestras incubadas con ph-AMPc, de acuerdo con el diferente modelo de regulación que presenta el enzima bifuncional tipo M (Kitamura et al., 1989).

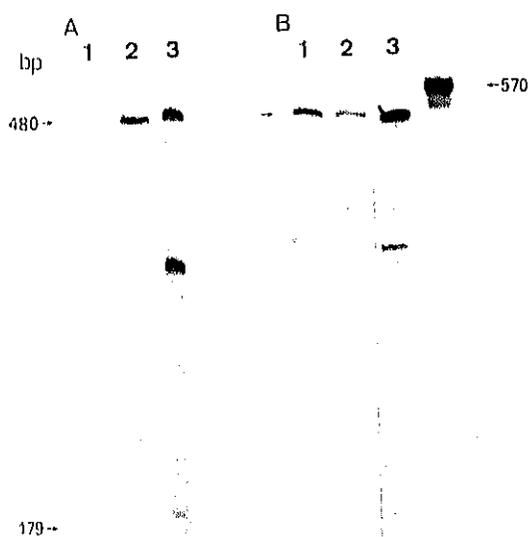


Figura 3.6. Ensayo de protección frente a ARNasas del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales y adultos incubados con AMPc.

Adaptada de Casado et al. (1995). 40 μ g de ARN total extraído de hepatocitos fetales de 21 días (panel A) y hepatocitos adultos (panel B) incubados durante 6h en ausencia (línea 1) o presencia de ph-AMPc 100 μ M (línea 2) o durante 24h con dexametasona 1 μ M (línea 3), se analizaron por el ensayo de protección frente a ARNasas tal y como se ha descrito en la sección metodológica. El autorradiograma es representativo de tres experimentos.

<u>PFK-2/FBPasa2 tipo L (% fragmento 480 bp)</u>			
	<u>Control</u>	<u>ph-AMPC (100 μM)</u>	<u>Dex (1 μM)</u>
Hepatocitos fetales	100	210	370
Hepatocitos adultos	100	56	275

Tabla 3. Cuantificación del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto expresado en hepatocitos fetales y adultos en cultivo incubados con AMPC o dexametasona detectado mediante el ensayo de protección frente a ARNasas.

Cuantificación de los autorradiogramas obtenidos en tres experimentos de protección frente a ARNasas del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L en cultivo primario de hepatocitos fetales y adultos incubados en presencia o ausencia de ph-AMPC o dexametasona. Los niveles de ARNm fueron medidos por densitometría láser y expresados según la cantidad presente en los hepatocitos control (100%).

Se ha demostrado ampliamente que los glucocorticoides activan la expresión del gen A de la PFK-2/FBPasa2 a través de un elemento de respuesta a glucocorticoides localizado en el primer intrón (Lange et al., 1992). Por ello, como control interno del ensayo, se incubaron los hepatocitos durante 24h con dexametasona 1 μ M. El glucocorticoide incrementó los niveles del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto y, en menor medida, el mensajero correspondiente al enzima específico de músculo esquelético y línea celular FTO2B, tanto en hepatocitos adultos como en hepatocitos fetales (fig. 3.6; tabla 3).

Los resultados obtenidos en el ensayo de protección frente a ARNasas parecen indicar que el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en los hepatocitos fetales, regulado de manera diferente por glucagón o AMPC, es la forma específica de hígado adulto. Esta diferente regulación podría deberse a la presencia de factores de transcripción específicos para cada etapa del desarrollo, que modularían de manera distinta la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa2 con el fin de adaptarla a las peculiares condiciones metabólicas de cada tipo celular.

1.3.- Regulación por glucocorticoides de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales.

En el ensayo de protección frente a ARNasas llevado a cabo en las muestras de hepatocitos fetales incubados en presencia de dexametasona se demostró que, al igual que en las células adultas, los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L (y ligeramente el tipo M) se incrementan tras la exposición al glucocorticoide (fig. 3.6). El estudio del efecto de la dexametasona se completó determinando los niveles de Fru 2,6-P₂, actividad quinasa y cantidad de enzima bifuncional presente en el cultivo de hepatocitos fetales incubados durante 24h con distintas concentraciones de dexametasona. Como se aprecia en la figura 3.7, los niveles del metabolito, actividad quinasa total y proteína inmunodetectada con el anticuerpo común frente a la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto, aumentaron de una manera dosis-dependiente en concordancia con el efecto del glucocorticoide a nivel del mensajero de la PFK-2/FBPasa2.

Kummel y Pilkis en 1990 y Espinet y colaboradores en 1993 mostraron, respectivamente, que tanto en hepatocitos adultos en cultivo como en la línea celular de hepatoma de rata FAO-1, el AMPc antagonizaba los efectos de la dexametasona en los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2. Evaluamos esta posibilidad en los hepatocitos fetales incubando simultáneamente las células con dexametasona y ph-AMPc y analizando los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 mediante la técnica de Northern blot empleando la sonda de 1.4 Kb. Como puede apreciarse en la figura 3.8 (panel A, líneas 3 y 4), los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 aumentaron un 200% en relación a los obtenidos en la incubación exclusivamente con el glucocorticoide (línea 2). El efecto observado por Kummel y Pilkis se reprodujo en el ensayo realizado en paralelo con hepatocitos adultos (fig. 3.8, panel B). Estos resultados confirman plenamente el efecto diferencial que el AMPc tiene sobre la regulación de la expresión de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales y adultos.

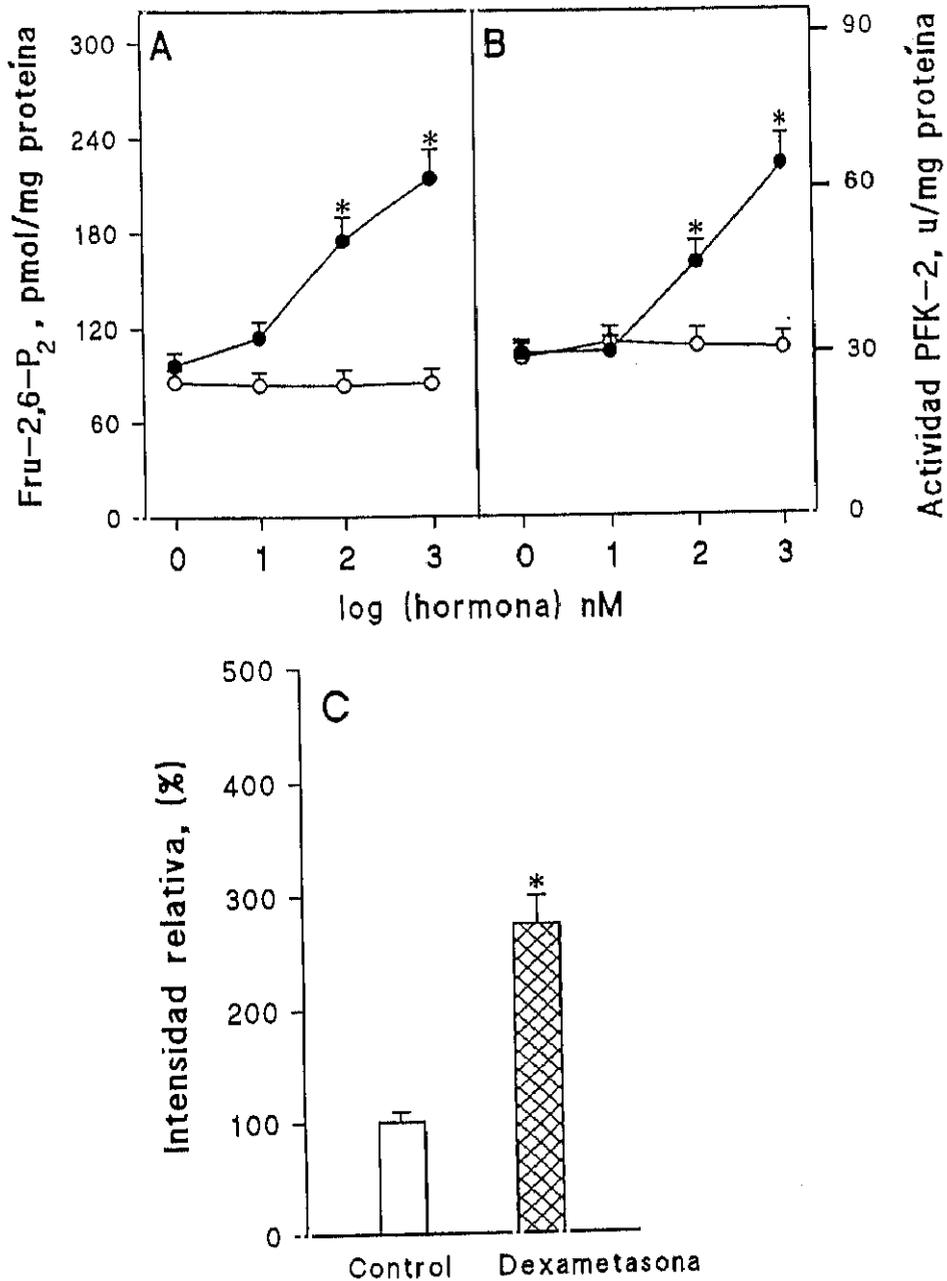


Figura 3.7. Cambios a largo plazo en la concentración de Fru-2,6-P₂, actividad quinasa y cantidad de PFK-2/FBPasa2 presente en hepatocitos fetales tratados con dexametasona.

Adaptada de Casado et al. (1995). Resultados del cultivo de hepatocitos fetales incubados durante 24h con (●) o sin (○) distintas concentraciones de dexametasona. Panel A: Contenido en Fru 2,6-P₂; Panel B: Actividad PFK-2 total; Panel C: Cuantificación densitométrica del contenido de proteína en hepatocitos fetales incubados durante 24h con dexametasona 1 μM, analizado por Western blot empleando el anticuerpo preparado a partir de la proteína de hígado adulto. * P < 0.01 vs control. Los valores corresponden a la media ±EEM de tres cultivos.

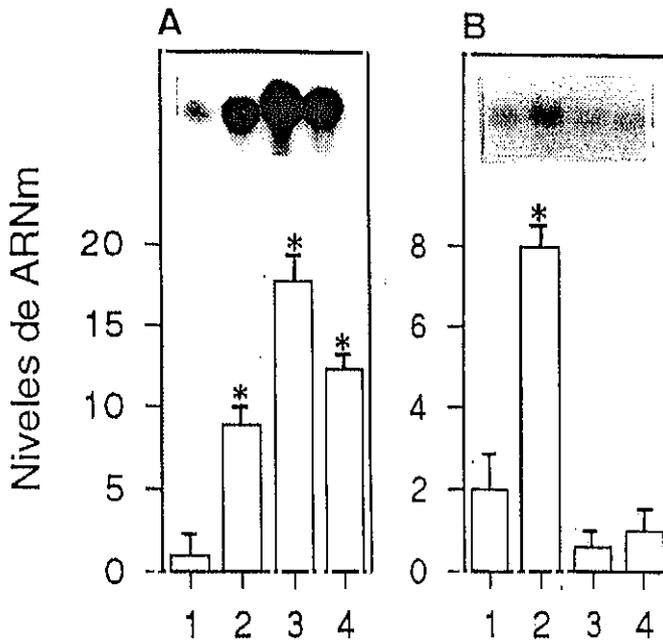


Figura 3.8. Efecto del AMPc sobre los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales tratados con dexametasona.

Adaptada de Casado et al. (1995). 30 μg de ARN total extraído de hepatocitos fetales (panel A) o adultos (panel B) en cultivo incubados durante 24h en ausencia (línea 1) o presencia de dexametasona 1 μM (línea 2) suplementada con ph-AMPC 100 μM (línea 3) o ph-AMPC 10 μM (línea 4), se analizaron por Northern blot con la sonda común de 1.4 Kb de la PFK-2/FBPasa2. Los resultados obtenidos tras la normalización respecto al contenido en β-actina y expresados en unidades arbitrarias, son la media ±EEM de tres experimentos. * P < 0.01 vs control.

1.4.- Regulación por insulina y tiroxina de la PFK-2/FBPasa2 presente en hepatocitos fetales.

Como se ha mencionado en la sección 3.4, tanto la insulina como las hormonas tiroideas no tienen efecto en la regulación de la expresión de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos adultos en cultivo (Kummel y Pilkis, 1990). Para comprobar si las dos hormonas ejercían el mismo efecto en los hepatocitos fetales, células de 21 días se incubaron a distintos tiempos y con distintas concentraciones de insulina y tiroxina determinando la concentración de Fru-2,6-P₂, actividad quinasa, cantidad de proteína y niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2.

En primer lugar, incubamos los hepatocitos fetales durante 18h con distintas concentraciones de insulina y tiroxina. Como se puede apreciar en la figura 3.9, solamente la hormona tiroidea elevó los niveles del metabolito y la actividad quinasa de una manera dosis-dependiente, aunque la respuesta fue marcadamente menor que la producida por la dexametasona (fig. 3.7). La insulina no modificó ninguno de los parámetros determinados, incluso a elevadas concentraciones (10 μ M).

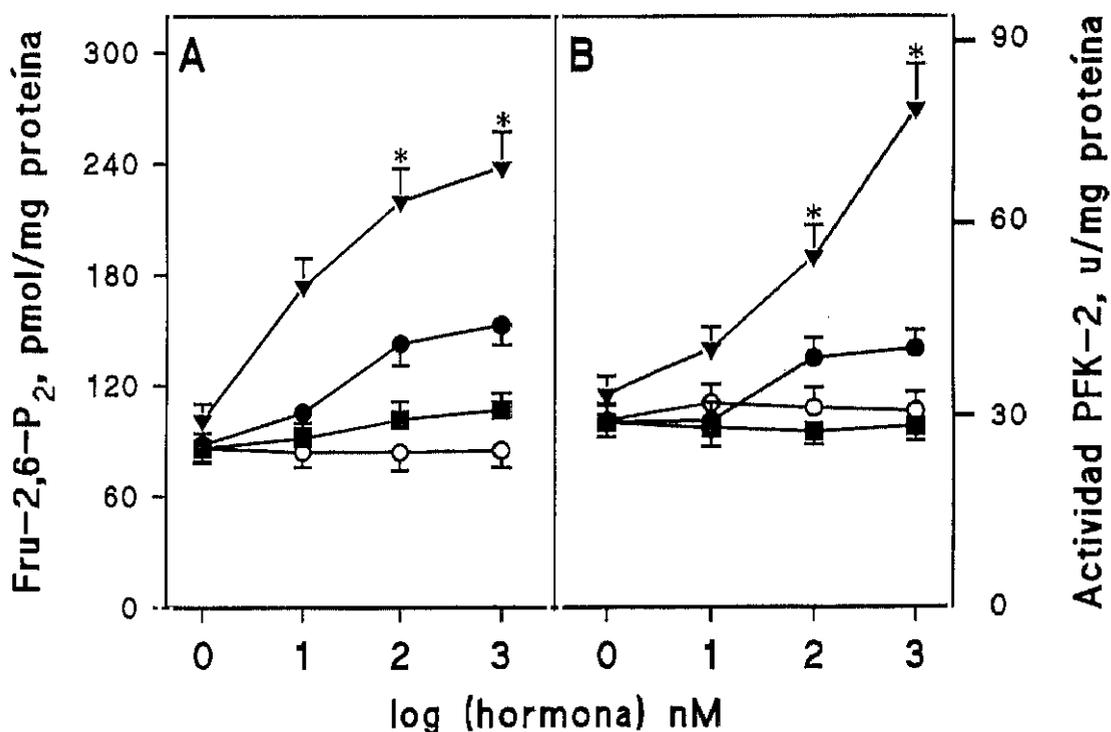


Figura 3.9. Concentración de Fru-2,6-P₂ (panel A) y actividad quinasa (panel B) en hepatocitos fetales incubados con insulina y tiroxina.

Resultados promedio \pm EEM de tres cultivos de hepatocitos fetales de 21 días incubados durante 18h en ausencia (○) o presencia de distintas concentraciones de insulina (■) o tiroxina (●). * P < 0.01 vs control.

Posteriormente, determinamos los niveles de Fru-2,6-P₂ y actividad quinasa en los hepatocitos fetales incubados durante distintos tiempos (0, 6, 15 y 24h) con las dos hormonas a la concentración de 1 μM, concentración en la que la tiroxina ejercía un efecto mayor (fig. 3.10). En los hepatocitos fetales incubados con insulina no se observó efecto alguno en los parámetros determinados. La tiroxina aumentó ligeramente el nivel del metabolito bisfosfato y actividad quinasa, mostrando la máxima inducción transcurridas 24h de incubación con la hormona. Se aumentó el tiempo de incubación hasta las 48h aunque no se observó ninguna modificación significativa a los resultados obtenidos tras 24h de incubación.

En este experimento también incubamos, durante distintos tiempos, los hepatocitos fetales de 21 días con dexametasona 1 μM y, como se observa en la figura 3.10, la concentración de Fru-2,6-P₂ y actividad quinasa aumentaron tras la acción del glucocorticoide, siendo el efecto ejercido por la dexametasona mucho mayor que el observado en las células fetales incubadas con insulina o tiroxina.

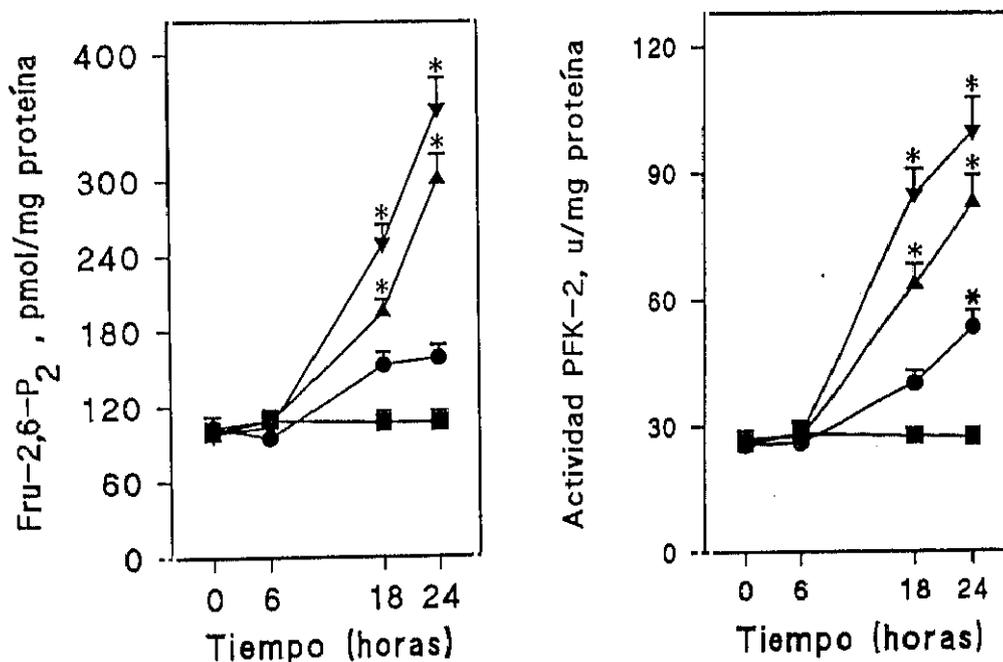


Figura 3.10. Concentración de Fru-2,6-P₂ y actividad quinasa en hepatocitos fetales de 21 días tratados con insulina, tiroxina y dexametasona.

Hepatocitos fetales de 21 días se incubaron con insulina 1 μM (■), tiroxina 1 μM (●) o dexametasona 1 μM (▲), recogiendo a los tiempos indicados muestras para determinar la concentración de Fru-2,6-P₂ (panel A) o actividad quinasa (panel B). Los resultados corresponden a la media ± EEM de tres cultivos. * P < 0.01 vs control.

Ya que el efecto máximo sobre los niveles de Fru-2,6-P₂ y actividad quinasa se produjo a una concentración de hormonas de 1 μ M tras 24h de incubación, determinamos mediante la detección con el anticuerpo común frente a la proteína adulta, la cantidad de PFK-2/FBPasa2 presente en los hepatocitos fetales incubados durante 24h con esa concentración de hormonas (fig. 3.11). La tiroxina aumentó ligeramente la cantidad del enzima bifuncional en los hepatocitos fetales (120% vs 100% del valor control), si bien está muy por debajo de la inducción ejercida por la dexametasona (353%). Al no detectar un cambio significativo en la cantidad de proteína, el efecto ejercido por la tiroxina en la regulación de la expresión de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales, al igual que ocurre en los hepatocitos adultos, debe producirse a nivel postraducciona

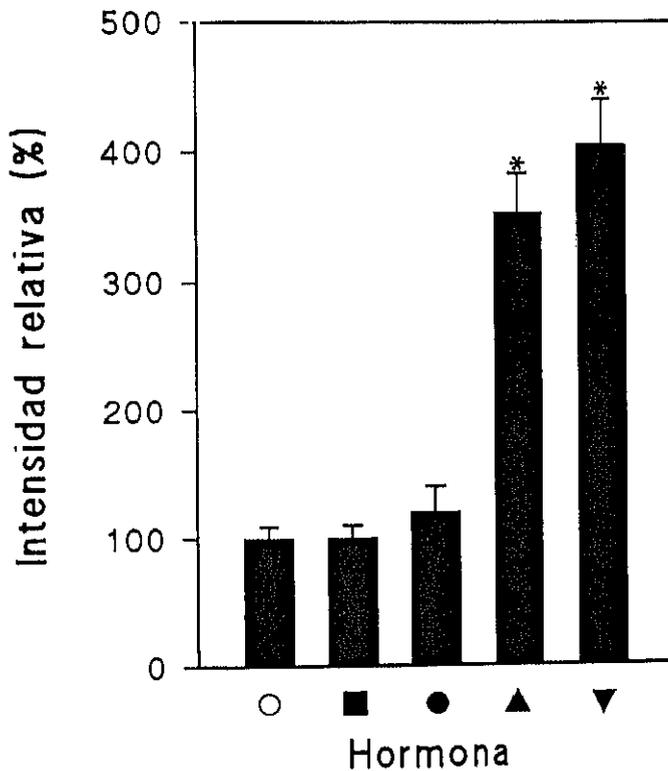


Figura 3.11. Análisis de la cantidad de PFK-2/FBPasa2 presente en hepatocitos fetales incubados con insulina, tiroxina y dexametasona.

Cuantificación densitométrica del contenido de proteína en hepatocitos fetales de 21 días incubados durante 24h en ausencia (○) o presencia de insulina 1 μ M (■), tiroxina 1 μ M (●) o dexametasona (▲), inmunodetectada con el anticuerpo preparado a partir de la proteína de hígado adulto. Los resultados son la media \pm EEM de tres cultivos. * P < 0.01 vs control.

Kummel y Pilkis (1990) mostraron que si bien la insulina y la tiroxina no tenían ningún efecto en la regulación de la expresión de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos adultos en cultivo, potenciaban la inducción ejercida por la dexametasona. En los hepatocitos fetales de 21 días, la insulina y la tiroxina también potenciaron el efecto del glucocorticoide (figs. 3.9, 3.10 y 3.11, ▼).

A nivel del mensajero de la PFK-2/FBPasa2, únicamente la dexametasona o la combinación de dexametasona-insulina-tiroxina induce la expresión del enzima bifuncional, corroborando los resultados obtenidos a nivel de la proteína (figs. 3.12 y 3.13).

Todos estos resultados nos indican que la regulación de la expresión de la PFK-2/FBPasa2 ejercida por la insulina y la tiroxina, al contrario de lo que ocurre con el AMPc, es similar en ambos tipos de hepatocitos.

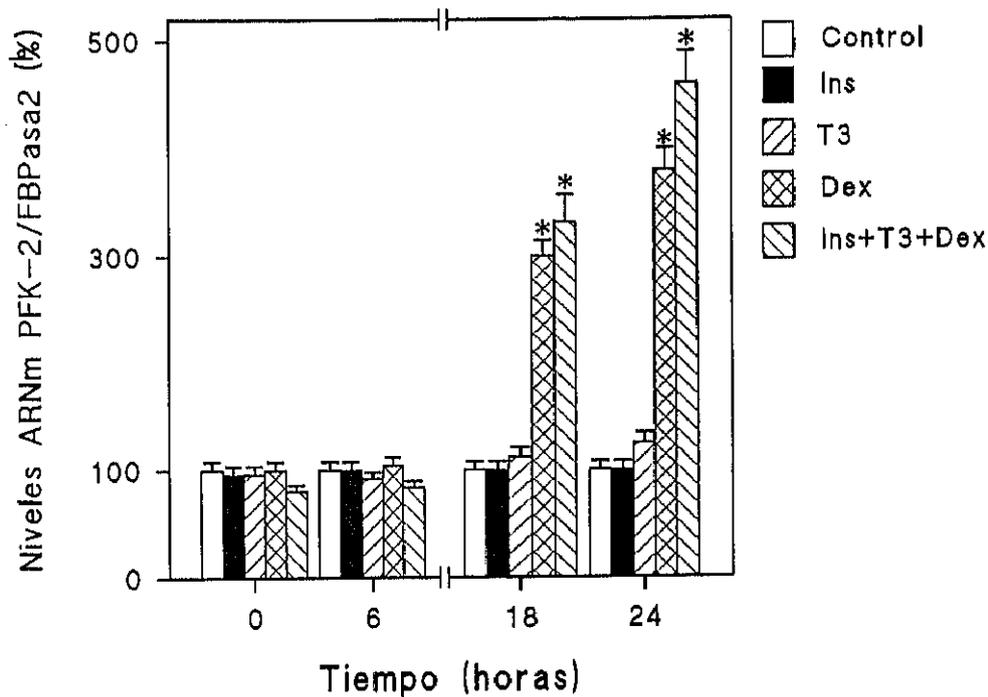


Figura 3.12. Análisis del efecto de dexametasona, insulina y tiroxina en los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales.

Los niveles de ARNm del enzima bifuncional en hepatocitos fetales incubados durante distintos tiempos en ausencia o presencia de 1 μ M de cada una de las hormonas se determinaron por Northern blot empleando la sonda común 1.4 Kb de la PFK-2/FBPasa2. La cuantificación se llevó a cabo por densitometría láser tras la corrección según el contenido de β -actina. Los resultados son la media \pm EEM de tres cultivos. * P < 0.01 vs control.

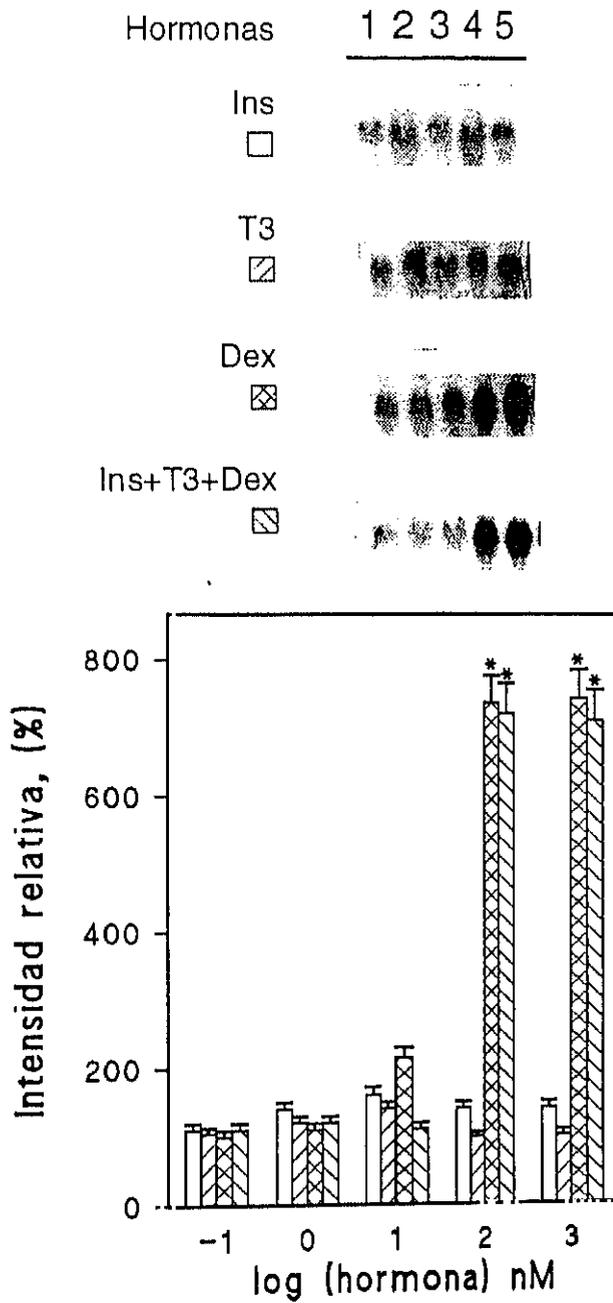


Figura 3.13. Análisis del efecto de distintas concentraciones de dexametasona, insulina y tiroxina en los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales.

Los niveles de ARNm del enzima bifuncional en hepatocitos fetales incubados durante 24h en ausencia (línea 1) o presencia de 1 nM (línea 2), 10 nM (línea 3), 100 nM (línea 4) o 1 μM (línea 5) de hormona se determinaron por Northern blot empleando la sonda común 1.4 Kb de la PFK-2/FBPasa2 (panel A). La cuantificación se llevó a cabo por densitometría láser tras la corrección según el contenido de β-actina (panel B). Los resultados son la media ± EEM de tres cultivos. * P < 0.01 vs control.

1.5.- Estudio de la estabilidad del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales de rata.

La regulación transcripcional del gen de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos no excluye otros mecanismos pretraduccionales, entre los cuales se encuentra la estabilidad del mensajero.

Una de las características de la PFK-2/FBPasa2 en cultivo primario de hepatocitos es que tanto los niveles de proteína como de mensajero disminuyen en ausencia de glucocorticoides y/o insulina (Kummel y Pilkis, 1990). Esta característica nos permite determinar la estabilidad del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos en cultivo.

La vida media del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en cultivo primario de hepatocitos fetales de 21 días y hepatocitos adultos se evaluó por análisis Northern blot usando la sonda común de 1.4 Kb de la PFK-2/FBPasa2. Se consideró como tiempo 0 al momento en el que la cantidad de mensajero es máxima, es decir, el momento en el que el medio con suero se reemplazó por el medio suplementado con albúmina. La disminución de los niveles de ARNm fue más acusada en los hepatocitos adultos que en los hepatocitos fetales, mostrando una vida media de 4 y 8-10h, respectivamente (fig. 3.14).

La estabilidad del ARNm también se estudió empleando inhibidores de la transcripción y de la síntesis proteica. Cuando los hepatocitos se incubaron durante 6h en presencia de actinomicina D 5 μ M, los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 disminuyeron un 52% en las muestras fetales mientras que fueron indetectables en las células adultas (fig. 3.15, línea 3). La incubación de los hepatocitos fetales con cicloheximida 5 μ M prácticamente no afectó los niveles del mensajero del enzima bifuncional (70% del valor control). Sin embargo, los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos adultos tras la incubación con la cicloheximida fueron, como en el caso del inhibidor transcripcional, indetectables (fig. 3.15, línea 4).

No se pudo realizar la normalización con la sonda de la β -actina ya que la actinomicina D disminuye el contenido de ese mensajero (fig. 3.14, línea 2). Sin embargo, como la disminución fue similar en los dos tipos de hepatocitos y con el fin de comparar los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en ausencia y presencia del inhibidor transcripcional, se consideraron también los resultados obtenidos tras la normalización según

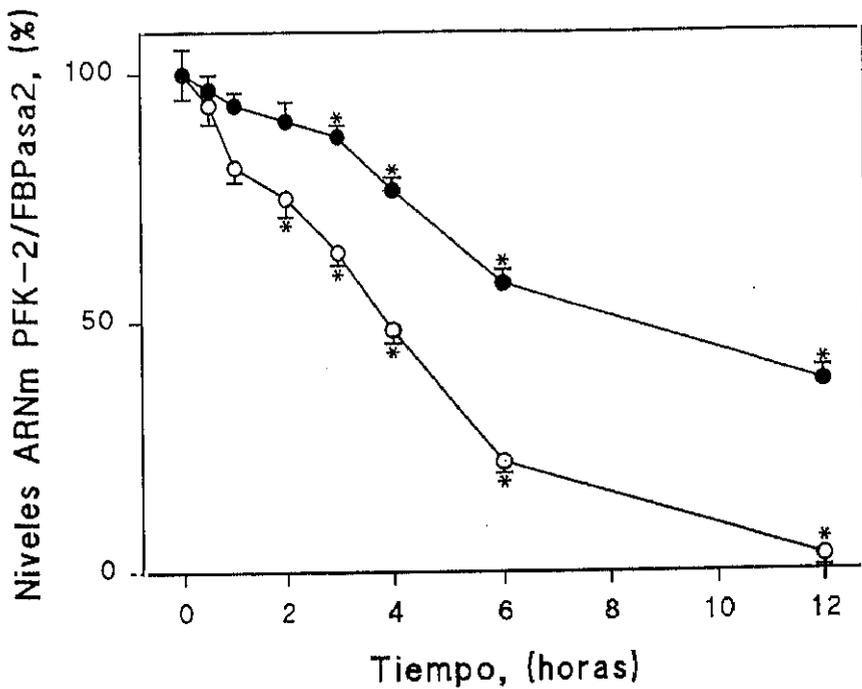


Figura 3.14. Estabilidad del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en cultivo primario de hepatocitos fetales.

Hepatocitos fetales de 21 días (●) y hepatocitos adultos (○) se incubaron en presencia de suero bovino fetal al 10% y, tras sucesivos lavados, se continuó la incubación en presencia de un 0.2% de albúmina libre de ácidos grasos. A los tiempos indicados, las muestras se analizaron por Northern blot con la sonda de ADNc 1.4 Kb de la PFK-2/FBPasa2. Las autorradiografías se cuantificaron por densitometría láser y se normalizaron de acuerdo con el contenido en β -actina. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de tres experimentos.

* P < 0.05 vs control.

el contenido en ARN de la β -actina de las muestras, aunque hay que tener presente que los valores están sobreestimados. Como se aprecia en la figura 3.16, al considerar los valores obtenidos tras la normalización los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales incubados con actinomicina D 5 μ M son tres veces superiores a los determinados en ausencia del inhibidor. Por el contrario, los niveles del mensajero del enzima bifuncional disminuyeron en los hepatocitos adultos incubados con la actinomicina D, siendo la vida media del ARNm de tan solo 25 minutos. En cualquier caso, tanto si se consideran los valores obtenidos antes o después de la normalización, el estudio realizado con los inhibidores pone de manifiesto un mecanismo diferente de regulación de la estabilidad del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en ambas etapas del desarrollo.

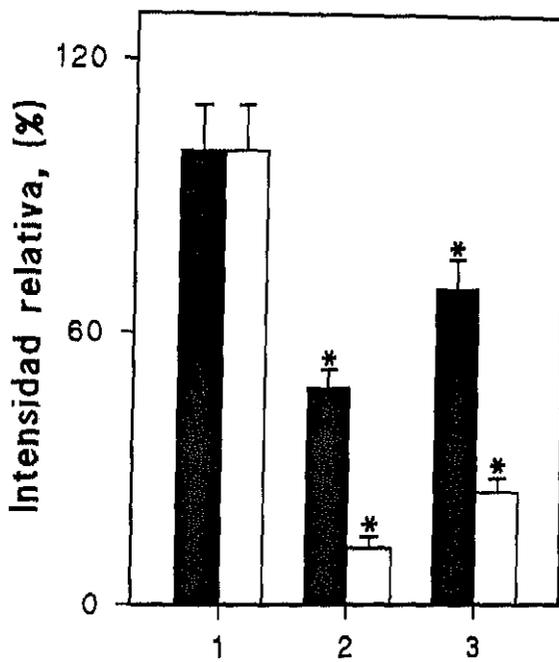
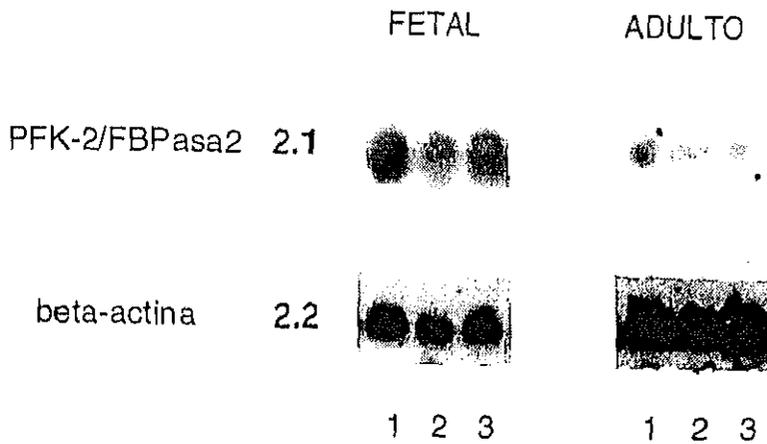


Figura 3.15. Efecto de cicloheximida y actinomicina D sobre la estabilidad del ARNm de la L-PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales.

Panel A: Autorradiograma representativo del análisis Northern Blot del ARN total extraído de hepatocitos fetales y adultos incubados en ausencia (línea 1), o en presencia de actinomicina D 5 μ M (línea 2) o cicloheximida 5 μ M (línea 3). En el análisis se empleó la sonda de la PFK-2/FBPasa2 de 1.4 Kb. Panel B: Análisis densitométrico sin considerar la corrección con el valor correspondiente a la sonda de la β -actina. Los rectángulos abiertos se corresponden con las muestras de hepatocitos adultos. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de cuatro experimentos. * P < 0,05 vs control.

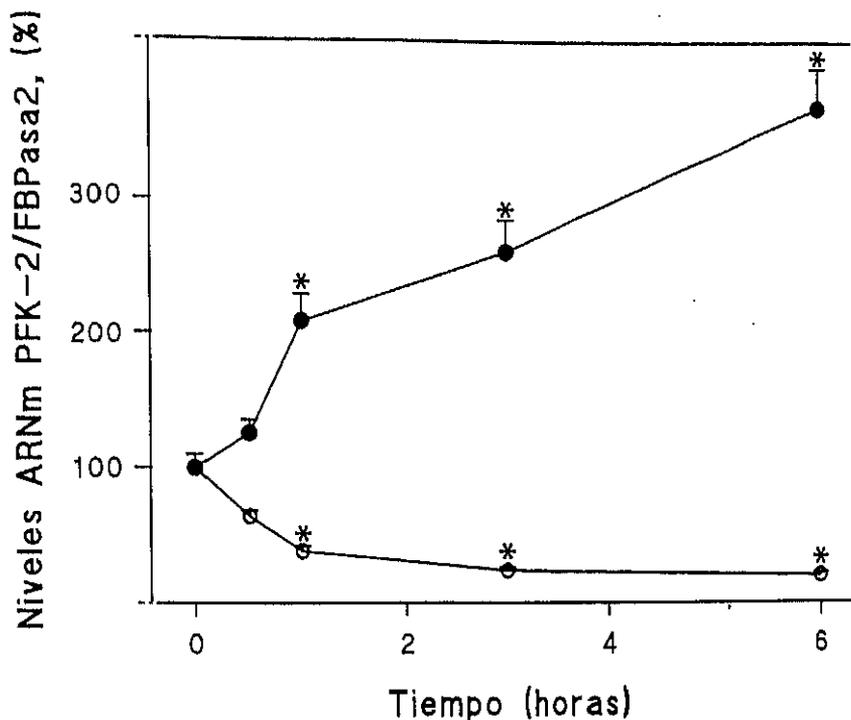


Figura 3.16. Efecto de la actinomicina D sobre la estabilidad del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en cultivo primario de hepatocitos fetales.

Hepatocitos fetales de 21 días (●) y hepatocitos adultos (○) se incubaron en presencia de suero bovino fetal al 10% y, tras sucesivos lavados, se continuó la incubación en presencia de un 0.2% de albúmina libre de ácidos grasos suplementada con actinomicina D 5 μ M. A los tiempos indicados, las muestras se analizaron por Northern blot con la sonda de ADNc de la PFK-2/FBPasa2 de 1.4 Kb. Las autorradiografías (se muestra un autorradiograma representativo en la figura 3.15), se cuantificaron por densitometría láser y se normalizaron de acuerdo con el contenido en β -actina. Los resultados son la media \pm EEM de tres experimentos. * P < 0.05 vs control.

2.- Caracterización de la PFK-2/FBPasa2 durante la transición fetal-neonatal en el hígado de rata.

Una de las características del período perinatal es la expresión de isoenzimas hepáticas del metabolismo de carbohidratos diferente de la que prevalece en el tejido adulto. Así, por ejemplo, el ARNm de la PEPCK no se detecta en fetos de 18-20 días, incrementándose rápidamente durante las primeras horas tras el nacimiento (Munnich et al., 1988). El modelo de expresión del gen de la PEPCK difiere del de otros enzimas gluconeogénicos, como la piruvato carboxilasa, FBPasa y glucosa 6-fosfatasa, sintetizados

antes del nacimiento (McGrane et al., 1992). En todos los enzimas mencionados, el momento en el que se produce la activación transcripcional del gen es la causa de las diferencias entre el período fetal y neonatal. Hay otro tipo de genes, entre los que cabe citar el gen de la L-PK, en los que la diferencia estriba en la expresión de ARNm diferentes a lo largo del desarrollo, debido al uso de distintos promotores. Así, durante el período fetal se expresa en el hígado la forma L' de la PK, forma típica de células eritroideas (abundantes en esta etapa del desarrollo), mientras que es la forma L la que predomina en la etapa adulta (McGrane et al., 1992).

El estudio de la regulación hormonal de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales en cultivo que hemos expuesto en el apartado anterior así como resultados a nivel de proteína descritos previamente (Martín-Sanz et al., 1987, 1989 y 1992), parecen indicarnos que el enzima bifuncional pertenece a este grupo de enzimas hepáticas cuya expresión es diferente a lo largo del desarrollo. Para poder verificar esta hipótesis abordamos un estudio riguroso de la PFK-2/FBPasa2 durante la transición fetal-neonatal en el hígado de rata. El estudio se llevó a cabo a nivel de actividad enzimática, cantidad de proteína y niveles de mensajero de la PFK-2/FBPasa2.

2.1.- Actividad quinasa durante la transición fetal-neonatal

El estudio de la actividad enzimática PFK-2/FBPasa2 lo centramos únicamente en la actividad quinasa ya que el enzima bifuncional de hígado fetal presenta una escasa actividad bisfosfatasa (Martín-Sanz et al., 1987).

A nivel de la actividad quinasa, una de las principales diferencias entre el isoenzima presente en el tejido fetal y la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta es la distinta respuesta tras la fosforilación por la PKA (Martín-Sanz et al., 1992). Por ello, determinamos la actividad PFK-2 *total* medida en condiciones de V_{max} (pH 8.5) y la actividad quinasa de la forma *activa* del enzima, es decir, la forma no fosforilada determinada a pH 6.6, en homogeneizados hepáticos fraccionados con polietilenglicol (2-15%) e incubados en ausencia o presencia de una unidad de la subunidad catalítica de la PKA.

La actividad total PFK-2 en el hígado fetal fue aproximadamente 120 unidades/mg de proteína, aumentó un 40% 12h después del nacimiento, y disminuyó posteriormente hasta

alcanzar valores estables 2 días más tarde (50 unidades/mg proteína, valor correspondiente a la muestra de hígado adulto) (fig. 3.17). La actividad medida a este pH representa la actividad del enzima independiente de su estado de fosforilación. De acuerdo con ello, la actividad no varió al realizar la incubación en presencia o ausencia de la subunidad catalítica de la PKA. Sin embargo, cuando se determinó la actividad a pH 6.6, que si muestra diferencias dependiendo del estado de fosforilación de la PFK-2/FBPasa2, se observó una clara disminución de la actividad quinasa en los homogeneizados hepáticos de ratas postnatales.

El cociente de actividades total/activa refleja el estado de fosforilación del enzima. El aumento del cociente implicaría la aparición de una forma de PFK-2/FBPasa2 que mostraría ante su fosforilación la inhibición de la actividad quinasa, propiedad exclusiva del isoenzima hepático adulto. En la figura 3.17 se puede observar como los valores del cociente se incrementaron 3h después del nacimiento, sin observarse cambios durante el período fetal (días 20-22 de gestación). Estos resultados sugieren que el isoenzima fetal es progresivamente reemplazado después del nacimiento por una forma que exhibe cambios cinéticos en respuesta a la fosforilación por PKA. Este enzima es presumiblemente similar al presente en el hígado adulto.

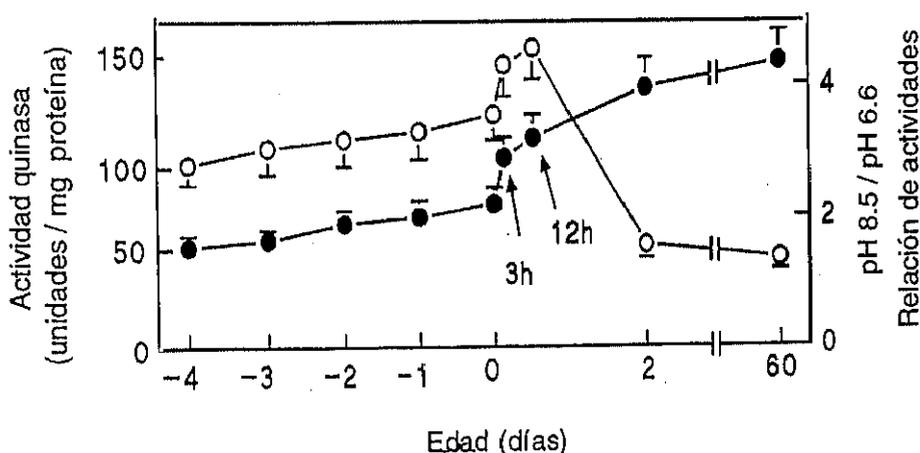


Figura 3.17. Actividad PFK-2 durante el período perinatal.

Adaptada de Casado et al. (1996). La actividad quinasa se determinó en homogeneizados hepáticos de diferentes edades tras el fraccionamiento con polietilenglicol (2-15%) e incubación en ausencia o presencia de una unidad catalítica de la PKA. (○) Actividad PFK-2 a pH 8.5; (●) Relación de actividades a pH 8.5/pH 6.6. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de 5 ó 6 determinaciones diferentes.

2.2.- Estudio inmunológico de la PFK-2/FBPasa2 durante la etapa perinatal mediante anticuerpos específicos.

Valoramos la cantidad de PFK-2/FBPasa2 hepática adulta a lo largo del desarrollo empleando tanto el anticuerpo específico frente al decapeptido aminoterminal como el anticuerpo común preparado frente a la proteína completa del hígado adulto.

Como muestra la figura 3.18, el reconocimiento por el anticuerpo específico sólo empezó después del día 22 de gestación, con un 52% de la intensidad correspondiente al hígado adulto. La relación entre la intensidad de la señal obtenida con este anticuerpo frente al reconocimiento por el anticuerpo común mostró un perfil idéntico al observado al expresar la actividad quinasa como la relación de actividades ensayadas a pH 8.5/pH 6.6, lo que nos indica que la isoforma hepática adulta comienza efectivamente a expresarse tras el nacimiento.

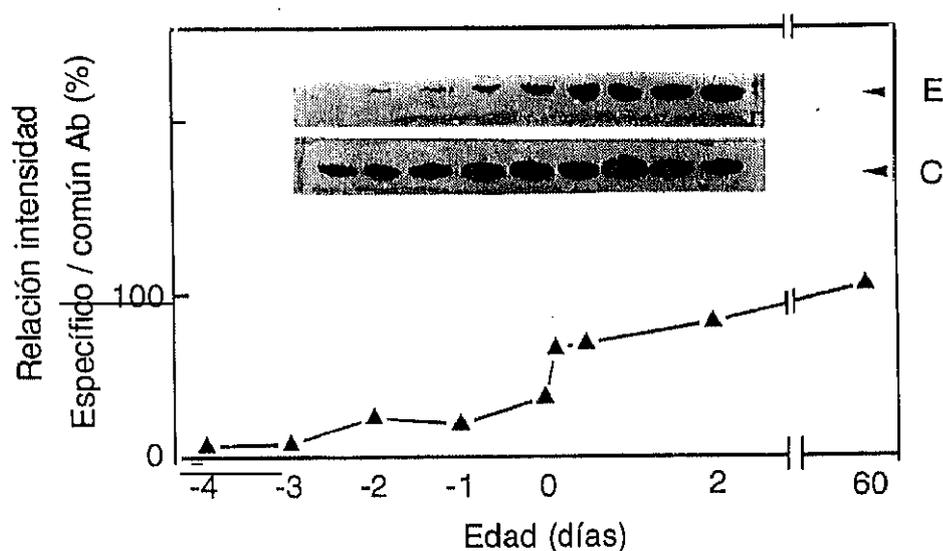


Figura 3.18. Análisis inmunológico de la PFK-2/FBPasa2 durante el período perinatal.

Adaptada de Casado et al. (1996). Muestras de hígado fraccionados con polietilenglicol al 2-15 % (p/v) y sometidos a electroforesis SDS/PAGE (20 μ g proteína/línea), se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico (E) frente a la región aminoterminal del enzima de hígado adulto o un anticuerpo común (C) preparado frente a la totalidad de la proteína adulta (inserto). La relación entre los valores densitométricos de las señales obtenidas tras el reconocimiento por el anticuerpo específico frente a las detectadas por el anticuerpo común se expresa como porcentaje del valor correspondiente a la muestra de tejido adulto. El día 0 se considera el día del nacimiento. Los resultados son la media \pm EEM de tres experimentos.

2.3.- Reconocimiento diferencial del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 durante la transición fetal-neonatal en el hígado de rata.

Las fluctuaciones en la actividad PFK-2 y en la cantidad de enzima durante la etapa perinatal mostradas en las figuras 3.17 y 3.18, se correlacionaron perfectamente con los niveles de ARNm detectados con la sonda común de 1.4 Kb de la PFK-2/FBPasa2 (fig. 3.19). El análisis densitométrico de los Northern blot mostró que la cantidad del mensajero del enzima bifuncional se incrementó alrededor del nacimiento, disminuyendo posteriormente hasta alcanzar niveles estables 2 días después de nacer (fig. 3.20). Tal y como habíamos observado durante el estudio de la regulación hormonal en hepatocitos en cultivo (fig. 3.2), sólo se detectó una especie de ARNm con un tamaño de 2.1 Kb, independientemente de la edad de los animales.

Cuando las mismas membranas se hibridaron con la sonda de 0.5 Kb de la PFK-2/FBPasa sólo se detectó una banda de 2.1 Kb alrededor del nacimiento (fig. 3.19), en perfecta correlación con el modelo de reconocimiento mostrado por el anticuerpo específico para el dominio aminoterminal del enzima de hígado adulto.

Como se aprecia en la figura 3.20, la relación entre las intensidades de las bandas obtenidas en la hibridación con la sonda de 0.5 Kb frente a la sonda común de 1.4 Kb mostró un perfil idéntico al observado tanto en el análisis por Western blot (fig. 3.18) como en la medida de la actividad quinasa (fig. 3.17). Por tanto, la aparición del isoenzima hepático adulto tras el nacimiento se debe al inicio de la expresión del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto en ese punto del desarrollo.

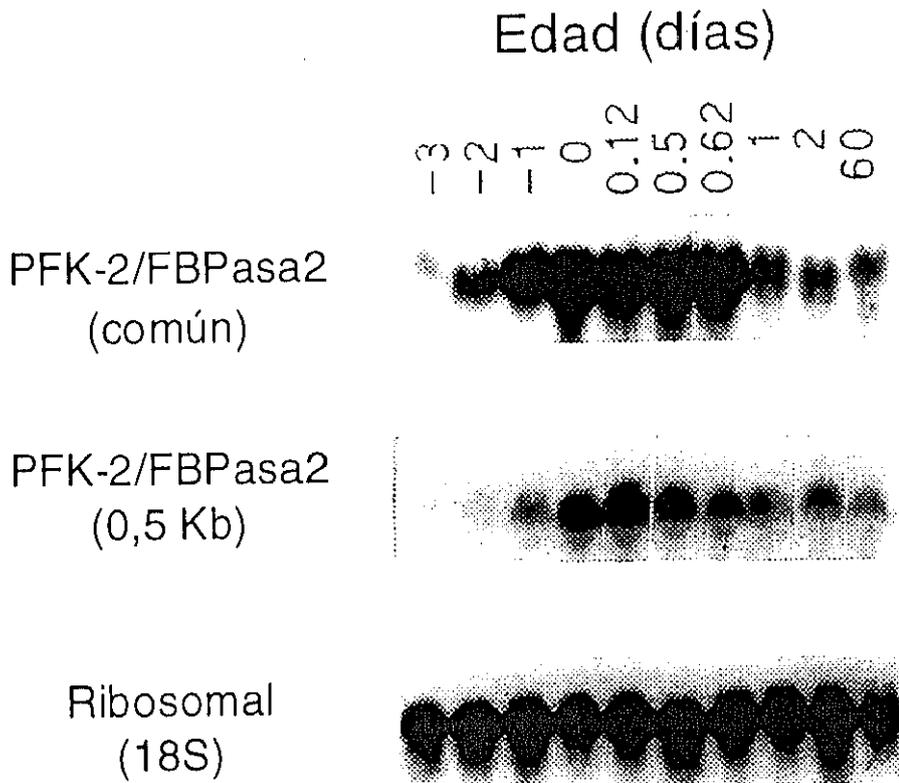


Figura 3.19. Análisis del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado de rata durante la transición fetal-neonatal.

Adaptada de Casado et al. (1996). Northern blot representativo de la hibridación de 30 μ g de ARN total extraído de hígado de ratas en distintos momentos del desarrollo en el que se empleó la sonda de la PFK-2/FBPasa2 común de 1.4 Kb y la sonda hepática de 0.5 Kb, así como la sonda ribosomal 18S. El autorradiograma es representativo de tres experimentos.

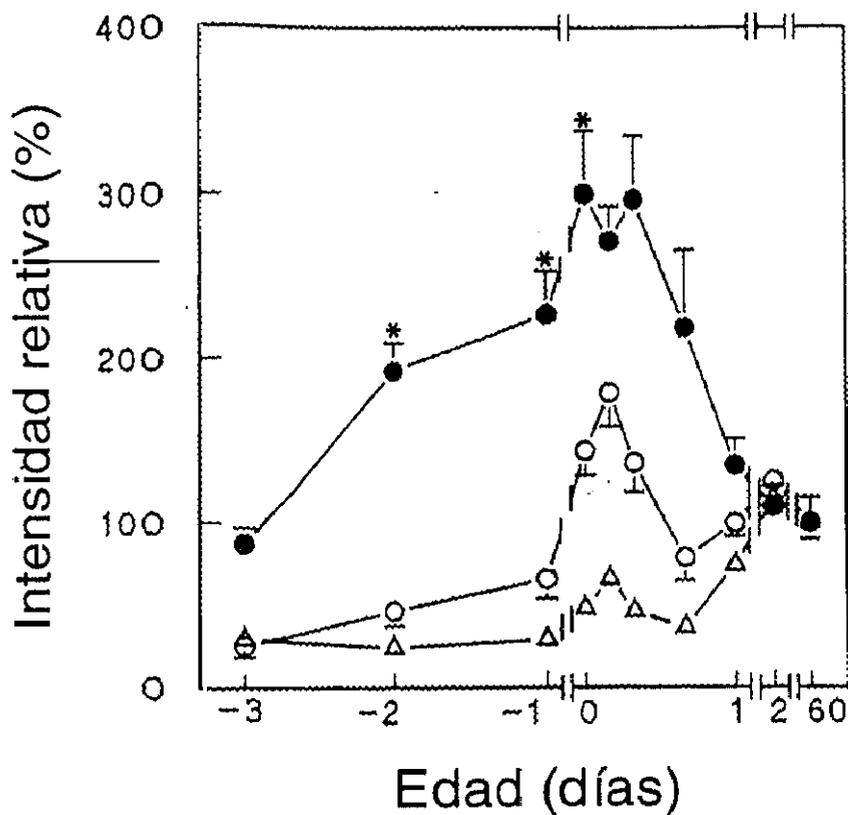


Figura 3.20. Niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado de rata durante la transición fetal-neonatal.

Adaptada de Casado et al. (1996). Análisis estadístico de los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta valorados por Northern blot usando la sondas común de 1.4 Kb (●) y de 0.5 Kb (○) de la PFK-2/FBPasa2. Los niveles de mensajero adulto (0.5 Kb vs común, Δ), cuantificados por densitometría láser y corregidos por los niveles de ARNm ribosomal, se expresan como el porcentaje relativo al valor de la muestra adulta considerado como 100%. * $P < 0.001$ para la sonda común desde el día -2 a 0.5 vs control a los 60 días. El día 0 se considera el momento del nacimiento. Los datos son el promedio \pm EEM de tres experimentos.

3.- Caracterización de las formas de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presentes en el hígado fetal

El estudio del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 hepática durante la transición fetal-neonatal y el análisis del efecto del AMPc en la regulación de la expresión génica del enzima bifuncional en hepatocitos en cultivo parecen indicarnos que, al igual que ocurre en el gen de la L-PK, se expresan distintos ARNm de la PFK-2/FBPasa2 a lo largo del desarrollo. Por ello, decidimos caracterizar en profundidad la naturaleza del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 durante el período fetal. Hasta este momento habíamos utilizado hepatocitos fetales de 21 días. Sin embargo, como podemos observar en las figuras 3.18 y 3.19, el reconocimiento del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 empleando la sonda de 0.5 Kb fue mayor en los fetos de 21 días que en los de 20 días, por lo que decidimos que la edad más idónea para llevar a cabo este estudio correspondía a los fetos de 20 días.

En primer lugar, el ARNm expresado en el hígado fetal se comparó con el mensajero expresado en otros tejidos. Se utilizó la técnica de Northern blot empleando la sonda común de 1.4 Kb y la sonda de 0.5 Kb de la PFK-2/FBPasa2. La sonda común reconoció nuevamente una única especie de ARNm de 2.1 Kb en la muestra de hígado fetal (fetos de 20 días), mientras que en las muestras de hígado adulto y músculo esquelético se detectaron las bandas de 2.1 Kb y 1.9 Kb, respectivamente, correspondientes a los mensajeros de la PFK-2/FBPasa2 específicos de cada uno de estos tejidos (fig. 3.21).

La sonda común reconoce también los mensajeros de los enzimas bifuncionales de corazón y cerebro, ya que la secuencia de la sonda utilizada comparte un 66% de homología con los exones 3-14 del gen B de la PFK-2/FBPasa2 (Darville et al., 1991). En la muestra fetal no se detectó ninguna banda de 4 Kb correspondiente al ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de corazón, a pesar de que Chikri y Rousseau (1995) mostraron la presencia de este tipo de mensajero de la PFK-2/FBPasa2 en el hígado fetal. Estos autores emplearon la técnica de RT-PCR que amplifica la cantidad de mensajero presente en el tejido, por lo que la discrepancia con nuestros resultados podría deberse a que la cantidad de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de corazón en la muestra fetal sea pequeña e indetectable mediante la técnica de Northern blot.

Por su parte, la sonda de 0.5 Kb sólo hibridó con el ARN extraído de hígado fetal e hígado adulto (señal de 2.1 Kb), sin reconocer a la muestra de músculo esquelético (fig. 3.21).

En el análisis del efecto de los glucocorticoides sobre la regulación de la PFK-2/FBPasa2 hemos demostrado y confirmado que la dexametasona induce la expresión del enzima bifuncional en hepatocitos fetales y adultos (fig. 3.8). Teniendo presente estos resultados y con el fin de verificar la especificidad de las sondas empleadas analizamos de nuevo una muestra de ARNm obtenida de hígado de animales tratados con dexametasona. De nuevo, la intensidad de la señal obtenida tras la hibridación tanto con la sonda común como con la sonda de 0.5 Kb se incrementó en la muestra de ARN obtenida de hígado de animales adultos inyectados intraperitonealmente durante 4 días con una solución salina estéril que contenía 50 µg de dexametasona (fig. 3.21, línea 3).

La pobre expresión del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto en las muestras fetales en comparación con los niveles de mensajero del enzima bifuncional detectados con la sonda común (relación 0.5/1.4, 30%), parece indicar que en el hígado fetal de rata deben estar expresándose distintas formas de ARNm de la PFK-2/FBPasa2. Para determinar con más precisión las especies de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presentes en el hígado fetal así como su abundancia relativa, se empleó la técnica de protección frente a la digestión por ARNasas.

En el ensayo se utilizó la ribosonda empleada en el análisis del efecto del AMPc en la regulación de la expresión génica de la PFK-2/FBPasa2 que, al igual que la sonda de 0.5 Kb, comprende el exón 1L, 2 y parte del exón 3 de la secuencia del gen A de la PFK-2/FBPasa2, lo que permite una clara distinción entre los ARNms tipo L y tipo M, así como el presente en la línea celular de hepatoma de rata FTO2B (fig. 3.5).

Como se puede observar en la figura 3.22, en la muestra de ARN extraído de hígado adulto se protegió un fragmento de 480 bp, mientras que en el caso de la muestra de músculo esquelético el fragmento protegido tenía el tamaño esperado de 179 bp. Además, en las muestras de hígado adulto y músculo esquelético también se observaron una cantidad minoritaria del fragmento correspondiente al músculo e hígado, respectivamente. La cuantificación de los geles mostró que el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específico de hígado

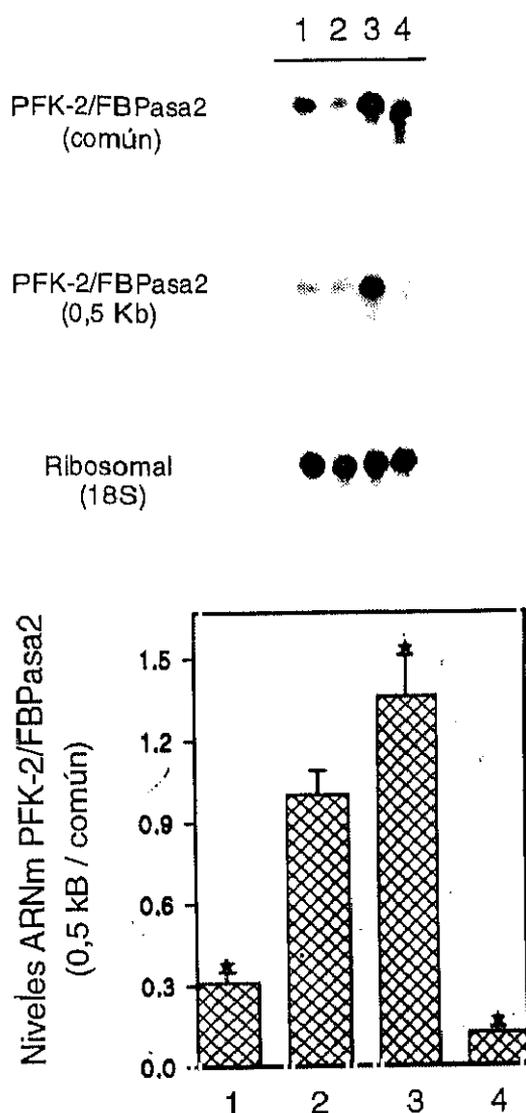


Figura 3.21. Niveles de ARNm de la PFK-2FBPasa2 hepática adulta expresado en diferentes tejidos.

Adaptada de Casado et al. (1996). 30 μ g de ARN total extraído de hígado fetal de 20 días (línea 1), hígado adulto (línea 2), hígado adulto de animales tratados con dexametasona (línea 3) y músculo esquelético (línea 4) se analizaron por Northern blot empleando la sonda de ADNc de 1.4 Kb común a las secuencias de los ARNm de los distintos isoenzimas de la PFK-2/FBPasa2, o la sonda de la PFK-2/FBPasa2 hepática de 0.5 Kb. Se muestra un Northern blot representativo. El análisis estadístico se realizó calculando la relación entre la intensidad de las señales obtenidas con la sonda de 0.5 Kb frente a las obtenidas tras la hibridación con la sonda común, después de la normalización según el contenido en ARN ribosomal 18S. Los valores se expresan relativos al valor del tejido adulto que fue considerado como 100%. Los resultados son la media \pm EEM de tres experimentos. * $P < 0.001$ líneas 1, 3 y 4 vs línea 2.

adulto representa el 19% del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 detectado en músculo esquelético, mientras que el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo M supone el 20% del total del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 detectado en hígado adulto (tabla 4). Estos resultados están de acuerdo con trabajos previamente publicados, demostrando que aunque los tejidos expresen mayoritariamente una especie de ARNm de la PFK-2/FBPasa2, también es posible encontrar pequeñas proporciones de otras formas de mensajero (Espinete et al., 1993). Como control de la especificidad del análisis se empleó de nuevo el ARN obtenido del hígado de animales inyectados con dexametasona. Tal y como habían establecido Cifuentes y colaboradores (1991) se incrementó la señal en los fragmentos de 480 y 179 bp, esta última en menor proporción.

En las muestras de hígado fetal, el ensayo de protección frente a ARNasas se llevó a cabo a partir del ARN extraído tanto de tejido como de hepatocitos aislados, evitando de este modo las interferencias que pudieran causar las células hematopoyéticas. En ambos casos, se detectaron los fragmentos correspondientes a los ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L (45%) y tipo M (36%), así como un tercer fragmento de 223 bp (19%) específico de la muestra fetal. Este último fragmento se observó sistemáticamente y sugiere la existencia en el hígado fetal de una tercera especie de ARNm de la PFK-2/FBPasa2, que compartiría parte de su secuencia con el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L diferenciándose en aproximadamente 257 bp del extremo 5' del exón 1L específico del isoenzima hepático adulto (fig. 3.22; tabla 4). El análisis por ordenador de la secuencia de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto reveló la presencia de un posible sitio de corte y empalme ("splicing") alrededor del nucleótido 418 (3'-GACNYYYYYY-5', donde Y es una pirimidina y N cualquier nucleótido), que explicaría la presencia de este fragmento específico de la muestra fetal.

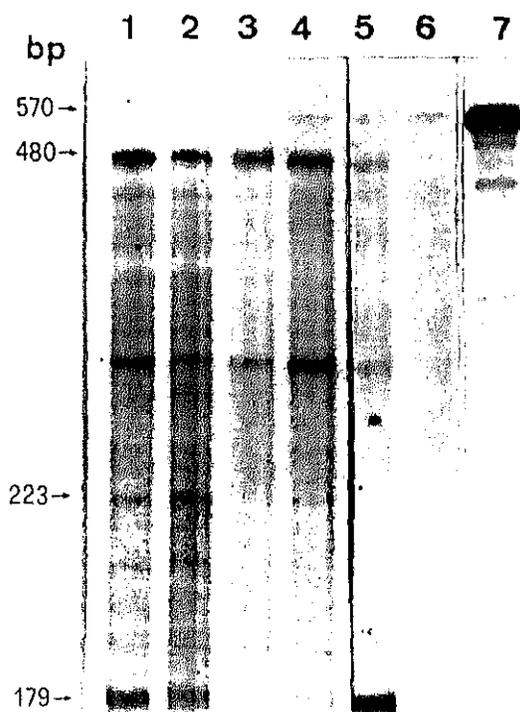


Figura 3.22. Caracterización de las especies de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presentes en el hígado fetal mediante el ensayo de protección frente a ARNasas.

Análisis en gel de poliacrilamida al 8%, conteniendo 8M urea, de los fragmentos protegidos frente a la digestión con ARNasas de 40 μ g de ARN total extraído de hepatocitos fetales de 20 días (línea 1), hígado fetal de 20 días (línea 2), hígado adulto (línea 3), hígado adulto de animales tratados con dexametasona (línea 4) y músculo esquelético (línea 5), después de la hibridación con una ribosonda transcrita in vitro a partir del plásmido pBS500 linearizado con Hind III (línea 7), según se ha descrito en la sección 2.7 del capítulo 2. La línea 6 corresponde a la ribosonda tras la digestión con ARNasas (control de la digestión). El gel es representativo de 4 experimentos.

<u>Muestra</u>	<u>Fragmento protegido (%)</u>		
	Banda de 480 bp (Hígado adulto)	Banda de 223 bp (Hígado fetal)	Banda de 179 bp (músculo y línea FTO2B)
Hepatocitos fetales	45 ± 3	19 ± 1	36 ± 3
Hígado fetal	48 ± 4	10 ± 2	42 ± 3
Hígado adulto	80 ± 6	—	20 ± 1.5
Hígado adulto + dexametasona	120 ± 5	—	26 ± 2
Músculo esquelético	19 ± 2	—	81 ± 5

Tabla 4. Porcentaje relativo de las especies de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 detectadas mediante el ensayo de protección frente a ARNasas.

Las señales obtenidas en el ensayo fueron cuantificadas por densitometría láser y son corresponden a la media ± EEM de cuatro experimentos. Los valores correspondientes a la muestra de hígado adulto + dexametasona están referidos al hígado adulto (considerado como 100%). Más información en la leyenda de la figura 3.22.

Por último, y como puede apreciarse en la figura 3.22, en todas las muestras analizadas apareció un fragmento protegido de 300 bp proporcional al fragmento correspondiente al ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específica de hígado adulto. La presencia de este fragmento podría explicarse bien por la existencia de un nuevo sitio de "splicing" en el gen A de la PFK-2/FBPasa2, bien por la localización en esa región del ARNm de una importante estructura secundaria que impediría una correcta hibridación entre el ARNm y la ribosonda, o bien por un error (mismatch) en la secuencia de la ribosonda empleada.

En el ensayo de protección frente a ARNasas que llevamos a cabo en el análisis del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 presente en cultivo primario de hepatocitos fetales incubados con ph-AMPC, no observamos el fragmento de 223 bp específico del tejido fetal (fig. 3.6).

Martín-Sanz y colaboradores habían mostrado que el cultivo a largo plazo de los hepatocitos fetales era condición suficiente para que comenzase a expresarse en las células una forma de enzima bifuncional que respondía a la fosforilación por PKA, propiedad exclusiva del enzima hepático adulto (Martín-Sanz et al., 1989). Estos resultados podrían explicar el hecho de no observar el fragmento específico fetal en el ensayo de protección frente a ARNasas en las muestras en cultivo.

El fragmento específico fetal de 223 bp comparte con la secuencia del fragmento específico adulto de 480 bp las últimas 90 bp del exón 1L. Por tanto, la sonda de 0.5 Kb empleada en Northern blot reconocería el mensajero específico fetal. Por ello, se preparó una sonda por PCR que comprendiera exclusivamente al exón 1L y que reconociera específicamente al mensajero de la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta. A partir de la sonda 1L mediante digestión con el enzima de restricción XhoI, eliminamos las últimas 90 bp comunes a los fragmentos adulto y fetal protegidos en el ensayo de protección frente a ARNasas, empleando también este fragmento como sonda en el análisis Northern blot (sonda 1L-90).

Como se observa en la figura 3.23, la hibridación de las muestras de ARN extraído de hígado fetal de 20 días con la sonda 1L-90 fue más débil que la correspondiente a la sonda 1L. Concretamente, mientras que la señal detectada por la sonda 1L en la muestra fetal supone un 28% respecto al valor control de la muestra de hígado adulto, el porcentaje tras la hibridación con la sonda 1L-90 fue tan sólo de un 8%. Esta diferencia representaría el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específico de hígado fetal que fue detectado en el ensayo de protección frente a ARNasas.

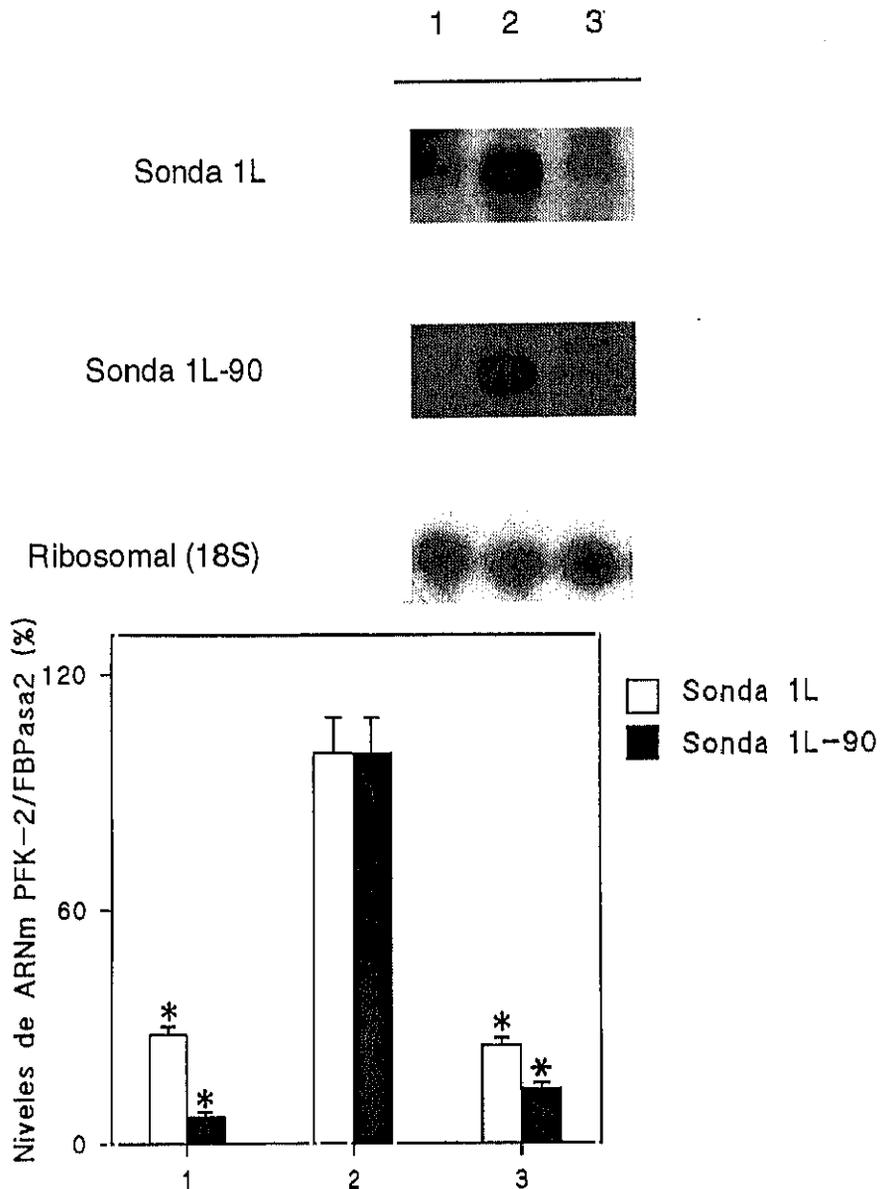


Figura 3.23. Análisis por Northern blot del ARNm específico de la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta en el hígado fetal.

20 μ g de ARN total de hígado fetal de 20 (línea 1), hígado adulto (línea 2) y músculo esquelético (línea 3) se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0.9% y, tras la transferencia a una membrana de nylon, fue hibridado con la sonda 1L y la sonda 1L-90 de la PFK-2/FBPasa2, así como con la sonda ribosomal 18S. Se muestra un Northern representativo. Los niveles de mensajero se cuantificaron por densitometría láser y normalizaron según el contenido ribosomal. Los valores se expresan como el porcentaje de la señal tomando como valor 100% el contenido de la muestra de hígado adulto. Los resultados son la media \pm EEM de tres experimentos. * P < 0.01 líneas 1 y 3 vs línea 2.

En el ensayo de protección frente a ARNasas también se pudo distinguir en las muestras fetales el fragmento de 179 bp correspondiente a los mensajeros de músculo esquelético y línea celular de hepatoma de rata FTO2B (fig. 3.6). Sin embargo, en el análisis por Northern blot del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 empleando la sonda común de 1.4 Kb no detectamos las bandas de 1.9 y 2.2 Kb correspondientes a los mensajeros de músculo y células FTO2B (fig. 3.21). A la vista de los resultados obtenidos en el ensayo de protección frente a ARNasas decidimos investigar nuevamente si por la técnica de Northern blot seríamos capaces de identificar estos mensajeros. Por ello, se prepararon por PCR, a partir de ADN genómico de rata, sondas correspondientes a los exones 1M (sonda 1M) y 1af (sonda FTO2B) de la secuencia del gen A de la PFK-2/FBPasa2. Las sondas preparadas por PCR se secuenciaron para verificar la naturaleza de los fragmentos amplificados.

Como se aprecia en la figura 3.24, la sonda 1M hibridó con las muestras de hígado fetal (30%), hígado adulto (20%) y, por supuesto, con la muestra de músculo esquelético (valor considerado como control, 100%). Por su parte, la sonda FTO2B reconoció la muestra correspondiente a la línea celular mientras que no observamos ninguna señal en la muestra de hígado fetal, en discrepancia a lo observado por Dupriez y colaboradores (1993). Como en el caso del mensajero de corazón, podría deberse a la mínima presencia del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 de la línea celular en el hígado fetal, no detectable por Northern blot. Como con la ribosonda utilizada no podíamos diferenciar los ARNm de las PFK-2/FBPasa2 de músculo y de la línea celular FTO2B, intentamos también identificar las distintas especies de ARNm del enzima bifuncional presente en el hígado fetal de rata mediante la técnica de RT-PCR, llevando como controles muestras de hígado adulto, músculo esquelético y células FTO2B.

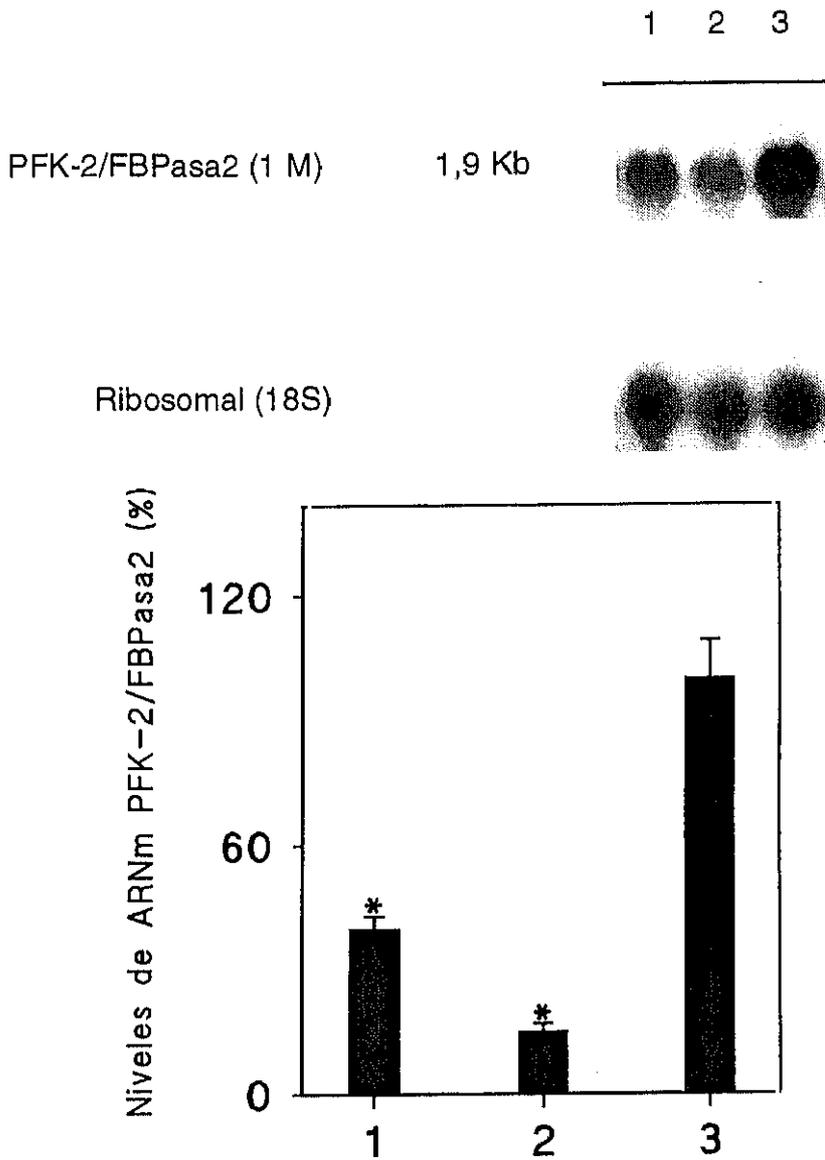


Figura 3.24. Análisis del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético en hígado fetal de rata.

20 μ g de ARN total de hígado fetal de 20 (línea 1), hígado adulto (línea 2) y músculo esquelético (línea 3) se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0.9% y, tras la transferencia a una membrana de nylon, fue hibridado con la sonda específica de las PFK-2/FBPasa2 de músculo esquelético así como con la sonda ribosomal 18S. Se muestra un Northern representativo. Los niveles de mensajero se cuantificaron por densitometría láser y normalizaron según el contenido ribosomal. Los valores se expresan como el porcentaje de la señal tomando como valor 100% el contenido de la muestra de músculo. Los resultados corresponden a la media \pm EEM de tres experimentos. * P < 0.01 líneas 1 y 2 vs línea 3.

4.- Caracterización de las especies de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presentes en el hígado fetal de rata mediante el análisis por transcripción en reverso-reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR).

El estudio de las formas de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presentes en el hígado fetal de rata empleando las técnicas de Northern blot y ensayo de protección frente a ARNasas demostró que en el hígado fetal se expresan las formas de hígado y músculo esquelético además de una tercera forma específica del período fetal. Debido a que alguno de los resultados obtenidos no están de acuerdo con resultados obtenidos por otros autores, decidimos analizar nuevamente las especies de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado fetal empleando, en esta ocasión, la técnica de RT-PCR, llevando como controles las muestras de hígado adulto, músculo esquelético y línea celular FTO2B.

El análisis consta de dos fases. Primeramente se transcribe en reverso el ARN utilizando un oligonucleótido dT₁₆ como cebador y transcriptasa en reverso MuLV, para posteriormente sintetizar la segunda cadena de ADN y amplificar la doble cadena por PCR. Para ello se empleó en todas las amplificaciones un oligonucleótido 3' antisentido localizado al final del exón 7-principio del exón 8, la zona del gen de la PFK-2/FBPasa2 más altamente conservada en todas las isoformas, y oligonucleótidos 5' específicos para cada tipo de PFK-2/FBPsa2 (fig. 2.1). Como control interno del proceso se utilizó un oligonucleótido 5' sentido (oligo N) común a las especies de ARNm a analizar (fig. 3.25).

La figura 3.26 muestra los productos obtenidos en la amplificación por RT-PCR analizados por electroforesis en gel de agarosa. Cuando se utilizó el oligonucleótido H específico de la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta, la amplificación fue evidente tanto en las muestras de tejido adulto como en los hepatocitos fetales, aunque con distinto grado de amplificación (líneas 1 y 2). A partir del ADNc transcrito en reverso del ARN extraído de hepatocitos fetales, empleando en la amplificación el par de cebadores M-C (fig. 3.26, líneas 3 y 4), se generó también el fragmento de 579 bp correspondiente a la PFK-2/FBPasa2 tipo M, confirmando los resultados obtenidos en el ensayo de protección frente a ARNasas (fig. 3.22) y Northern blot (fig. 3.23). Sin embargo, únicamente en la reacción llevada a cabo con el par de cebadores F-C y a partir del ARN extraído de células FTO2B (fig. 3.26, línea 8) se amplificó el producto esperado de 792 bp correspondiente a la secuencia del ARNm del

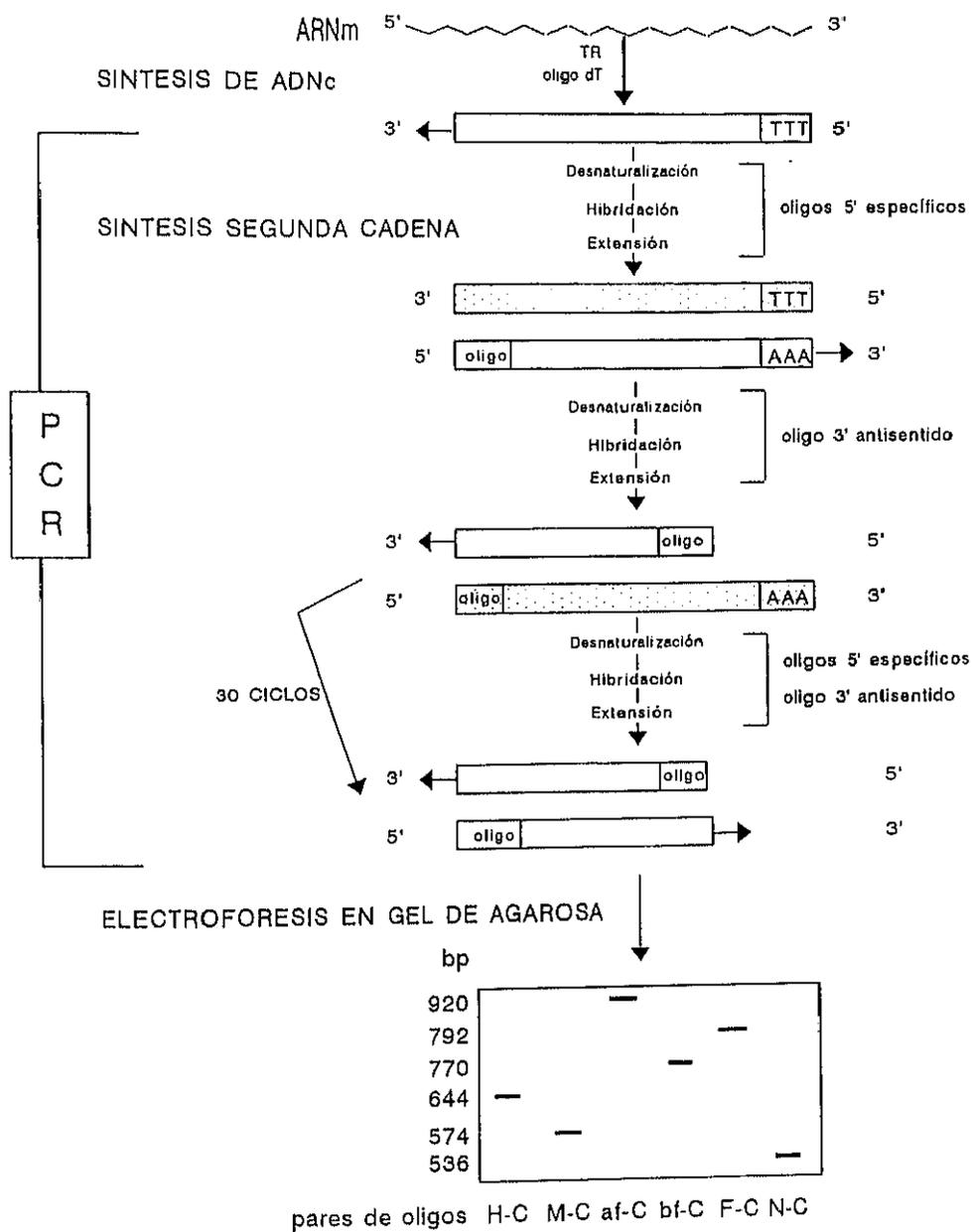


Figura 3.25. Representación esquemática del método RT-PCR.

Los rectángulos abiertos se corresponden con la cadena que esta siendo sintetizada. La flecha indica el sentido de la síntesis.

enzima bifuncional característico de la línea de hepatoma sin detectarse fragmento alguno en la muestra de hígado fetal, confirmando los resultados obtenidos en el ensayo por Northern blot empleando la sonda específica FTO2B.

Con el fin de asegurar la naturaleza de los productos amplificados de 644 bp y 579 bp en la muestra fetal (fig. 3.26, líneas 1 y 3), los fragmentos obtenidos se extrajeron del gel y secuenciaron según se ha descrito en la sección 2.10 del capítulo 2 (Material y Métodos). Los productos secuenciados presentaban un 100% de homología con las secuencias del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L (Darville et al., 1987) y tipo M (Crepin et al., 1992).

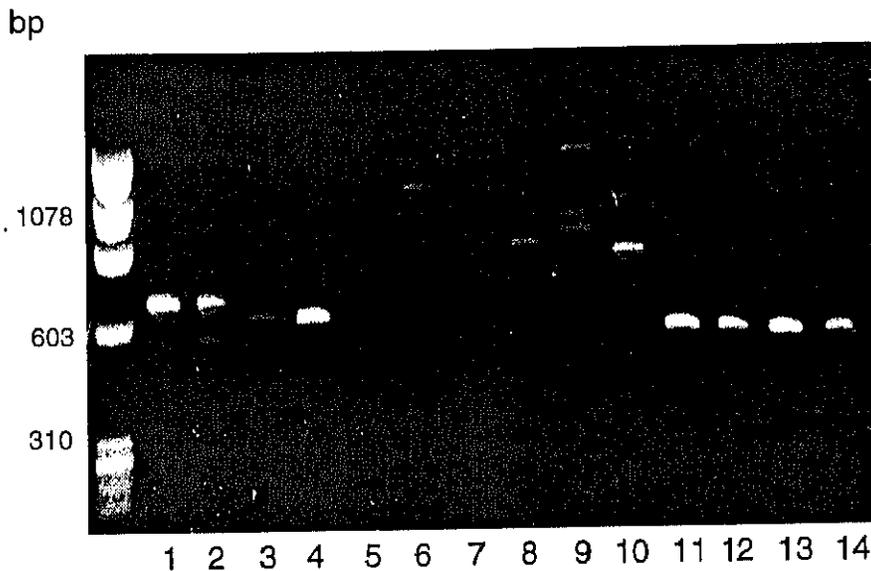


Figura 3.26. Electroforesis en gel de agarosa del análisis por RT-PCR de la PFK-2/FBPasa2 de hígado fetal de rata.

ARN obtenido de hepatocitos fetales de 20 días (líneas 1, 3, 5 y 11), hígado adulto (líneas 2, 6 y 12), músculo esquelético (líneas 4, 7 y 13) y línea celular FTO2B (líneas 8, 9, 10 y 14) se transcribió en reverso usando como cebador oligo dT₁₆. Los ADNc correspondientes se amplificaron por PCR empleando como cebadores los pares de oligonucleotidos H-C para la amplificación de la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta (líneas 1 y 2), M-C en el caso de la PFK-2/FBPasa2 específica de músculo esquelético (líneas 3 y 4), F-C, 1af-C y 1bf-C para la PFK-2/FBPasa2 de la línea FTO2B (líneas 5-10) y el par N-C como control interno del proceso, común para las distintas especies de ARNm (líneas 11-14). Los fragmentos correspondientes a las líneas 1-4 se extrajeron del gel y se secuenciaron para asegurar la naturaleza del producto amplificado. Los resultados son representativos de cuatro experimentos.

Para determinar la proporción de cada una de las especies de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 amplificadas en las muestras de hepatocitos fetales se llevó a cabo una PCR semicuantitativa, en la que el oligonucleótido C, común en todas las amplificaciones, se marcó en su extremo 5' libre con [γ - 32 P]ATP. Los productos se analizaron en un gel de poliacrilamida conteniendo urea 8 M y, tras secar el gel y exponerlo a una película autorradiográfica, se cuantificaron por densitometría láser (fig. 3.27). Como se observa en la tabla 5, el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 tipo L y tipo M representan un 53% y 47%, respectivamente, del total de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 detectado por PCR en la muestra fetal. Estos resultados están de acuerdo con la cuantificación realizada en el ensayo de protección frente a ARNasas (tabla 4).

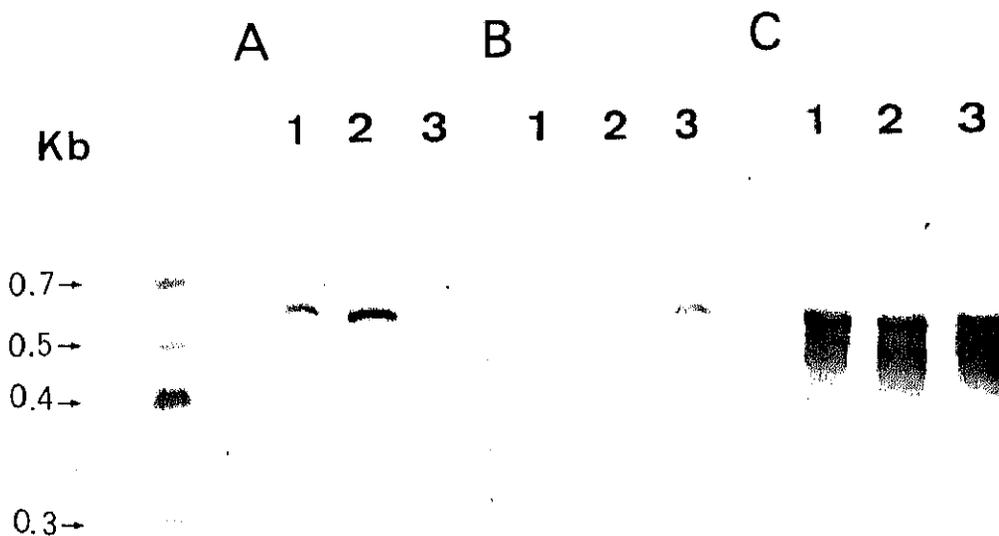


Figura 3.27. Análisis del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en hepatocitos fetales mediante la técnica de RT-PCR.

Tras transcribir en reverso 5 μ g de ARN total extraído de hepatocitos fetales de 20 días (línea 1), hígado adulto (línea 2) y músculo esquelético (línea 3) usando oligo dT₁₆, se llevó a cabo la amplificación por PCR empleando los pares de cebadores H-C (panel A), M-C (panel B) y N-C (panel C), tal y como se indica en la sección 2.9 del capítulo de Material y Métodos. El oligonucleótido C, común en todas las amplificaciones, se marcó en su extremo 5' libre con [γ - 32 P]ATP para poder cuantificar los productos amplificados. El análisis es representativo de cuatro experimentos.

<u>Muestra</u>	<u>Fragmento hepático</u>	<u>Fragmento muscular</u>
Hepatocitos fetales	53 ± 4	47 ± 4
Hígado adulto	85 ± 5	15 ± 1
Músculo esquelético	8 ± 1	92 ± 8

Tabla 5. Análisis semicuantitativo del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en hepatocitos fetales mediante la técnica de RT-PCR.

5 µg de ARN total extraído de hepatocitos fetales de 20 días, hígado adulto y músculo esquelético se transcribieron en reverso y amplificaron usando oligonucleótidos específicos para las secuencias de la PFK-2/FBPasa2 tipo L y tipo M, y un oligonucleótido común a ambas secuencias marcado en su extremo 5' libre con [γ -³²P]ATP. Las señales amplificadas se midieron por densitometría láser y se expresaron como el porcentaje de los productos específicos amplificados (pares H-C y M-C) tras la normalización con el producto amplificado como control interno (par N-C), considerando como 100% la suma de las señales obtenidas en la amplificación con los oligonucleótidos específicos. En la figura 3.27 se muestra un autorradiograma representativo. Los resultados son la media ± EEM de cuatro experimentos.

5.- Identificación del extremo 5' del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específico de hígado fetal. Reacción de extensión con cebador ("Primer extensión")

Los resultados obtenidos parecen indicar la existencia de una tercera especie de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específica de hígado fetal, diferente en su extremo 5' al ARNm del isoenzima hepático adulto. Para identificar el extremo 5' se llevó a cabo la reacción de extensión con cebador ("Primer extensión").

PoliA-ARN extraído de hepatocitos fetales de 20 días, hígado adulto y músculo esquelético se hibridó con un cebador complementario a los nucleótidos 472-493 de la secuencia del gen A de la PFK-2/FBPasa2 (Lange et al., 1989). El oligonucleótido se marcó en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP utilizando el enzima polinucleótido quinasa T4. Tras la

hibridación, el oligonucleótido se extendió por transcripción en reverso empleando como molde el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en las muestras de poliA-ARN a analizar.

En las muestras control de hígado adulto y músculo esquelético se detectaron los fragmentos esperados de 365 bp y 166 bp, respectivamente (Crepin et al., 1989a). En el análisis del poliA ARN obtenido de hepatocitos fetales se obtuvieron tres productos de 365 bp, 332 bp y 166 bp (fig. 3.28). El fragmento de 365 bp coincide con el cap site del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto localizado en la Cys +124 (Darville et al., 1989) con respecto al sitio de iniciación de la transcripción (posición +1) (Lange et al., 1989). El fragmento de 166 bp corresponde al ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específico de músculo esquelético presente, como ha quedado establecido en las secciones anteriores, en las muestras fetales. La presencia de un fragmento adicional parece confirmar la existencia de una forma de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en el hígado fetal que tendría un extremo 5' diferente al de las especies presentes en hígado adulto y músculo esquelético.

Debido a que el mensajero de la PFK-2/FBPasa2 es muy poco abundante (<0.01% del total de ARNm), no fue posible secuenciar los ADNc obtenidos en la reacción de extensión con cebador. La disponibilidad en un futuro próximo de una librería de ADNc de hígado fetal de rata permitirá continuar estos trabajos e identificar el mensajero fetal de la PFK-2/FBPasa2.

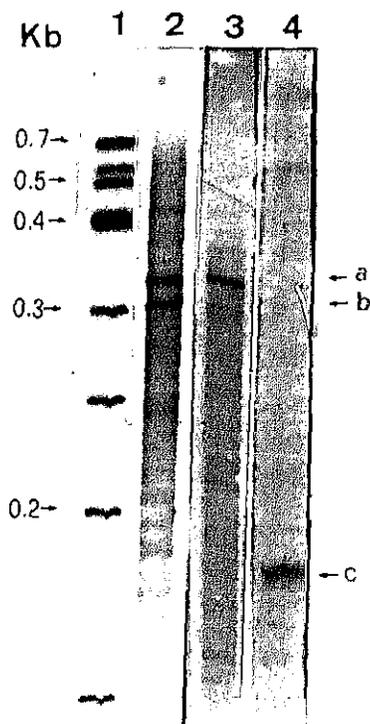


Figura 3.28. Análisis del extremo 5' del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 de hepatocitos fetales, hígado adulto y músculo esquelético.

Los resultados son representativos de tres experimentos en los que 5 μ g de poliA-ARN extraído de hepatocitos fetales de 20 días (línea 2), hígado adulto (línea 3) y músculo esquelético (línea 4) se hibridaron con 10^5 cpm del oligonucleótido P (fig. 2.1), y se extendieron por transcripción en reverso. La línea 1 corresponde al ADN del bacteriofago Φ X174 digerido con Hinf I. Las flechas muestran los fragmentos obtenidos en el análisis: a - 365 bp, b - 332 bp, c - 166 bp.

Capítulo 4: Discusión

La fase hipoglucémica que tiene lugar en el recién nacido como consecuencia del cese del aporte materno de glucosa, se compensa a través de distintos mecanismos entre los que cabe citar la movilización del glucógeno, la disminución de la elevada capacidad glucolítica de diversos tejidos y el desarrollo progresivo de la gluconeogénesis, situaciones favorecidas por factores hormonales y nutricionales (Martín-Sanz et al., 1989; Casado et al., 1993). Uno de los factores que controlan los flujos glucolítico/gluconeogénico hepáticos es el cambio en la concentración de Fru-2,6-P₂ (Pilkis y El-Maghrabi., 1988). En el hígado, este metabolito es sintetizado y degradado por el enzima bifuncional PFK-2/FBPasa2 (Pilkis et al., 1990). Se han caracterizado varios isoenzimas bifuncionales específicos de tejido que difieren en tamaño, propiedades cinéticas e inmunológicas así como en su respuesta a fosforilación por proteína quinasas (Rider et al., 1985; Kitamura et al., 1989; Sakata y Uyeda, 1990; Sakata et al., 1991; Watanabe et al., 1994). Existen evidencias que sugieren que la PFK-2/FBPasa2 de hígado fetal es una isoforma distinta de la expresada en tejido adulto: a) diferente comportamiento en filtración en gel, b) diferente perfil peptídico tras la digestión con CNBr, c) fosforilación por PKA y PKC que no implica cambios en sus propiedades cinéticas y d) diferente especificidad frente a anticuerpos que reconocen la región aminoterminal de la PFK-2/FBPasa2 adulta (Martín-Sanz et al., 1992).

Un modelo interesante para el estudio del papel del AMPc en el control de la expresión génica es la transición del período fetal al período neonatal. Esta etapa se caracteriza por una caída en la relación plasmática insulina/glucagón lo que provoca una modificación importante en el metabolismo hepático de carbohidratos, controlado principalmente a través de cambios en el modelo de expresión de enzimas claves en las vías glucolítica y gluconeogénica como por ejemplo la PFK-2/FBPasa2, PEPCK y L-PK (Girard et al., 1992; Lyonnet et al., 1988). PFK-2/FBPasa2 y PK juegan un papel importante en el control de los flujos glucolítico/gluconeogénico en el hígado a través de su acción en la velocidad de los ciclos fútiles y coordinando su respuesta a hormonas y factores nutricionales (Hue y Bartrons, 1985).

En hepatocitos adultos el glucagón o su segundo mensajero el AMPc rápidamente disminuyen la transcripción del gen y, por consiguiente, los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 (Rosa et al., 1993). Sin embargo la exposición de hepatocitos fetales tanto a un

derivado permeable del AMPc como al glucagón incrementa la actividad quinasa, la cantidad de proteína y los niveles del mensajero del enzima bifuncional.

La PEPCK se utilizó como modelo de enzimas modulados por cambios en la concentración de AMPc (Hod y Hanson, 1988; McGrane et al., 1992). La expresión de la PEPCK en respuesta al AMPc fue similar en los hepatocitos fetales y adultos, tal y como había sido descrito previamente (Pégorier et al., 1992).

El bloqueo transcripcional de la L-PK provocado por el glucagón y el AMPc en el hígado adulto (Bergot et al., 1992; Decaux et al., 1989), contrasta con el incremento en los niveles del mensajero en hepatocitos fetales incubados con el derivado del AMPc. Estudios previos en el modelo de expresión de la PK hepática durante el desarrollo sugirieron la posibilidad de un bajo contenido de este enzima durante el último período de la vida fetal y la lactancia (Trempe et al., 1989). En estos experimentos se emplearon homogeneizados hepáticos o hígados de ratones transgénicos. En este trabajo se han utilizado hepatocitos aislados, libres de contaminación de células eritroides. En estas condiciones se observa una clara señal de la forma L de la PK aunque la posibilidad de la presencia de la forma eritroidea de la PK (tipo R) en células fetales no puede ser descartada (Lyonnet et al., 1988). L y R-PK son codificadas por un único gen pero, debido a la presencia de distintos promotores, difieren en la región de flanco 5'. Durante el período fetal se expresaría mayoritariamente la forma eritroidea, mientras que la forma L predominaría en la etapa adulta.

La forma adulta de la PFK-2/FBPasa2 seguiría un modelo de expresión similar al descrito para el enzima hepático de la PK (Poole et al., 1982; Blair et al., 1986). Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, hay una falta de paralelismo entre los cambios en la expresión del enzima bifuncional en el período postnatal (horas) comparado con el tiempo requerido para la inducción de la forma L-PK (días) (Poole et al., 1982).

Es conocida la importancia de los glucocorticoides en la regulación de los flujos glucolítico/gluconeogénico hepáticos a través del control de la expresión de enzimas reguladores de esos flujos (Granner y Pilkis, 1990). La PFK-2/FBPasa2 responde a glucocorticoides en cultivo primario de hepatocitos fetales. El aumento en los niveles de

ARNm es evidente después de 15h de cultivo y causa cambios tanto en la actividad de la PFK-2/FBPasa2 como en la concentración de Fru-2,6-P₂. La coestimulación de los hepatocitos fetales con glucocorticoides y hormonas que incrementan los niveles de AMPc, supone un aumento en los niveles del ARNm del enzima bifuncional superior al observado en el tratamiento exclusivo con dexametasona, situación opuesta a la de los hepatocitos adultos. Estos resultados parecen indicar la participación de factores transcripcionales específicos que jugarían un papel relevante durante la transición perinatal. Son necesarios estudios posteriores para explicar la hipótesis que se ha sugerido y delimitar las bases moleculares de esta diferente respuesta hormonal en la expresión de la PFK-2/FBPasa2 durante el desarrollo.

Como demuestran los resultados presentados en este trabajo, la estabilidad del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales y adultos fue diferente, mostrando una vida media de 8-10h y 4h, respectivamente. No se conocen exactamente los mecanismos que controlan la vida media de los distintos ARNm en el citoplasma. Según estudios recientes se cree que ésta viene determinada por la existencia de una secuencia de reconocimiento pentamérica (AUUUA) (Shaw y Kamen, 1986). La supresión de esta secuencia aumenta extraordinariamente la estabilidad del ARNm y, por el contrario, la adición de otras secuencias AU confieren una menor estabilidad. Se ha identificado una proteína que es capaz de reconocer y unirse a estas secuencias AUUUA contenidas en el ARN (Malter, 1989) y se piensa que la formación de este complejo puede hacer al ARNm susceptible de ser degradado rápidamente en el citoplasma. El efecto del AMPc en células fetales no se afectó por el tratamiento con cicloheximida y se mantiene en presencia de actinomicina D. Por tanto, AMPc, cicloheximida y actinomicina D podrían inhibir la expresión de esta proteína implicada en la degradación del ARNm de la PFK-2/FBPasa2.

Al inicio de este capítulo hemos indicado que el hígado fetal parece expresar una forma de PFK-2/FBPasa2 diferente a la presente en el tejido adulto. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que este isoenzima fetal es progresivamente reemplazado después del nacimiento por una forma de la PFK-2/FBPasa2 que exhibe cambios cinéticos en respuesta a la fosforilación por PKA. Por lo demás, este enzima es presumiblemente similar al presente en el hígado adulto. La actividad PFK-2 aumenta 12h después del nacimiento para

posteriormente disminuir a valores adultos, lo que refleja el alto dinamismo en la síntesis y degradación de la PFK-2/FBPasa2 que tiene lugar durante la transición fetal-neonatal. El reconocimiento de la PFK-2/FBPasa2 adulta usando un anticuerpo específico y el análisis Northern blot empleando la sonda común de 1.4 Kb demuestran de forma coherente el acúmulo de la PFK-2/FBPasa2 característica del hígado adulto después del nacimiento.

A nivel del mensajero, hay cierta controversia acerca de la forma de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 presente en el hígado fetal. A través del ensayo de protección frente a ARNasas hemos identificado en el hígado y hepatocitos fetales durante los últimos días de gestación cantidades similares de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 específica de hígado adulto y músculo esquelético, de acuerdo con la actividad de los promotores L y M. El promotor L es activo desde el día 19 de gestación. A lo largo del desarrollo fetal, una progresiva metilación en la posición -2059 reprime la actividad del promotor L pero, a partir del día 19, la desmetilación permitiría la unión de factores de transcripción comenzando a expresarse el ARNm de la PFK-2/FBPasa2 hepática adulta (Zimmerman y Rousseau, 1994).

En el ensayo de protección frente a ARNasas también se detectó un fragmento de 223 bp específico del tejido fetal que podría corresponder a un tercer mensajero de la PFK-2/FBPasa2 que diferiría en 257 bp del extremo 5' del mensajero hepático adulto. Este fragmento podría explicar el sitio adicional de iniciación de la transcripción detectado en el hígado fetal mediante la reacción de extensión con cebador ("primer extension").

Usando el ensayo de protección frente a ARNasas, Dupriez y colaboradores demostraron la actividad de un promotor adicional en el hígado fetal (promotor F). Sin embargo, tanto por análisis Northern blot usando una sonda específica del ARNm generado por este promotor, así como mediante la amplificación por PCR empleando pares de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del promotor F, no hemos observado la presencia de esta especie de ARNm detectado en células FTO2B (Dupriez et al., 1993).

La relevancia fisiológica de la presencia de distintas isoenzimas PFK-2/FBPasa2 durante la transición perinatal podría ser interpretada en base al peculiar metabolismo de carbohidratos que tiene lugar en esta etapa del desarrollo. Las reservas de glucosa se mantienen constantes durante la vida fetal gracias al aporte materno continuo. Por tanto, el feto no requiere una vía gluconeogénica operativa para mantener la glucemia. Realmente, el

hígado fetal está preparado para realizar una intensa glucólisis (Girard et al., 1992) y, como demuestran los resultados de este trabajo, una PFK-2/FBPasa2 pobremente regulada es suficiente para favorecer el flujo a través de la PFK-1. Desde este punto de vista, la proteína adulta sólo debería expresarse después del nacimiento, ya que sólo desde este momento es necesario una forma que regule el ciclo Fru-1,6-P₂/Fru 6P y, por tanto, permita que la gluconeogénesis tenga lugar en el momento en el que el depósito de glucógeno se depleciona y los niveles plasmáticos de glucosa disminuyen, situación característica del período neonatal y en general del órgano adulto, pero no del hígado fetal.

Conclusiones

1.- La incubación de hepatocitos fetales con glucagón o con un derivado permeable del AMPc incrementó la actividad total, la cantidad de proteína y los niveles del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 y L-PK, en contraste con el comportamiento exhibido por los hepatocitos adultos. Por tanto, deben existir señales específicas en el tejido fetal que participen en la respuesta de la PFK-2/FBPasa2 y L-PK a hormonas que incrementen los niveles de AMPc. El efecto se mantuvo *in vivo* así como en presencia de cicloheximida, lo que sugiere que el AMPc podría activar la degradación de alguna proteína que estuviera desestabilizando a la PFK-2/FBPasa2 presente en los hepatocitos fetales.

2.- La concentración de Fru-2,6-P₂, actividad quinasa total, proteína y niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 se incrementaron tras la incubación de hepatocitos fetales y adultos en cultivo con dexametasona. Este efecto se potenció por la insulina y la tiroxina. Estos resultados confirman el papel de estas hormonas en el mantenimiento de la transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos en cultivo.

3.- La coestimulación de hepatocitos fetales con dexametasona y un análogo permeable al AMPc incrementó los niveles del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 por encima del valor obtenido sólo con el glucocorticoide o el análogo del AMPc, situación opuesta a la de los hepatocitos adultos incubados en las mismas condiciones. Estos resultados confirman plenamente el efecto diferencial que el AMPc ejerce sobre la regulación de la expresión de la PFK-2/FBPasa2 a lo largo del desarrollo hepático.

4.- La vida media del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 en hepatocitos fetales y adultos fue de 8-10h y 4h, respectivamente. El estudio llevado a cabo con inhibidores transcripcionales puso de manifiesto un mecanismo de regulación de la estabilidad del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 diferente en ambas etapas del desarrollo.

5.- El isoenzima fetal de la PFK-2/FBPasa2 es progresivamente reemplazado después del nacimiento por una forma que presenta propiedades cinéticas e inmunológicas similares a las mostradas por el enzima presente en el hígado adulto. La aparición de este isoenzima se debe al inicio en ese punto del desarrollo de la expresión mayoritaria del ARNm de la PFK-2/FBPasa2 característico del hígado adulto.

6.- Mediante el ensayo de protección frente a ARNasas y el uso de sondas que reconocen específicamente la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto, músculo esquelético y de la línea celular FTO2B, hemos demostrado la presencia en el hígado fetal de cantidades similares del mensajero de la PFK-2/FBPasa2 característico de hígado (46%) y músculo esquelético (35%), sin detectar el ARNm característico de la línea celular de hepatoma de rata FTO2B.

7.- La presencia en el ensayo de protección frente a ARNasas de un fragmento protegido exclusivamente en la muestra fetal sugiere la existencia de una tercera especie de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 que se diferencia en aproximadamente 257 bp del extremo 5' del exón 1L específico de la PFK-2/FBPasa2 de hígado adulto. El análisis de la secuencia de la PFK-2/FBPasa2 reveló la presencia de un posible sitio de corte y empalme ("splicing") que podría dar lugar a esta tercera especie de mensajero específico del hígado fetal.

8.- El análisis por reacción de extensión con cebador "primer extension" indicó la existencia de 2 sitios de iniciación de la transcripción en el hígado fetal. Uno de estos sitios coincide con el sitio de iniciación de la transcripción del ARNm específico de hígado adulto, mientras que del sitio adicional podría originarse la nueva especie de ARNm de la PFK-2/FBPasa2 detectada en el hígado fetal.

Bibliografía

-
- Argaud, D., Lange, A.J., Becker, T.C., Okar, D., El-Maghrabi, M.R., Newgard, C.B. and Pilkis, S.J. (1995) Adenovirus-mediated overexpression of liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in gluconeogenic rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 24229-24236.

 - Assimocopoulos, J.F. and Renaud, J.B. (1990) Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in liver: indirect evidence for action via a phosphatase. *J. Biol. Chem.* 265, 7202-7206.

 - Barbacid, M. (1987) ras Genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779-827.

 - Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E. and Hers, H.G. (1983) Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 214, 829-837.

 - Bartrons, R., Van Schaftingen, E. and Hers, H.G. (1984) The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose-2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 218, 157-163.

 - Bazán, J.F., Fletterick, R.J. and Pilkis, S.J. (1989) Evolution of a bifunctional enzyme: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9642-9646.

 - Bazán, J.F. and Fletterick, R.J. (1990) Tertiary structure modeling of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: structural, functional and evolutionary design of a bifunctional enzyme on fructose 2,6-bisphosphate. In *Fructose 2,6-bisphosphate* (Pilkis S.J., ed.), pp 125-171, CRC Press, Boca Raton, Florida.

 - Blake, M.C., Jambar, R.C., Swick, A.G., Kalin, J.W. and Clifford Azikhan, J. (1990) Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less

- promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6632-6641.
- Blair, J.B., Sattangi, S. and Hartwell, R. (1986) Regulation of pyruvate kinase in cultured rat hepatocytes. Influence of glucose, ethanol, glucagon and dexametasone. *J. Biol. Chem.* 261, 2425-2433.
 - Bergot, K.-O., Díaz-Guerra, M.J.M., Puzenat, N., Raymondjean, M. and Kahn, A. (1992) Cis-regulation of the L-type pyruvate kinase gene promoter by glucose, insulin and cyclic AMP. *Nucleic. Acids. Res.* 20, 1871-1878.
 - Boscá, L., Mojena, M., Ghysdael, J., Rousseau, G.G. and Hue, L. (1986) Expression of the v-src or v-fps oncogene increases fructose-2,6-bisphosphate in chick-embryo fibroblasts. *Biochem. J.* 236, 595-599.
 - Boscá, L., Rousseau, G.G. and Hue, L. (1985) Phorbol 12-myristate 13-acetate and insulin increase the concentration of fructose 2,6-bisphosphate and stimulate glycolysis in chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6440-6444.
 - Bradford, M.M. (1978) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
 - Brent, G.A., Moore, D.D. and Larsen, P.R. (1991) Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 17-35.
 - Casado, M., Boscá, L. and Martín-Sanz, P. (1993) Rat liver messenger ribonucleic acid and enzyme activity of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase impairment during the late period of pregnancy. *Endocrinology* 133, 1044-1050.
 - Casado, M., Boscá, L. and Martín-Sanz, P. (1995) Differential regulation of the

- expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and pyruvate kinase by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in fetal and adult hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 165, 630-638.
- Casado, M., Boscá, L. and Martín-Sanz, P. (1996) Multiple forms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase are expressed in perinatal rat liver. *Am. J. Physiol.* 270, 000-000. (en prensa).
- Cascales, M., Martín-Sanz, P. and Boscá, L. (1992) Phorbol esters, bombesin and insulin elicit differential responses on the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase system in primary cultures of foetal and adult rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 207, 391-397.
- Chikri, M. and Rousseau, G.G. (1995) Rat gene coding for heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: characterization of a unusual promoter region and identification of four mRNAs. *Biochemistry* 34, 8876-8884.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Cifuentes, M.E., Espinet, C., Lange, A.J., Pilkis, S.J. and Hod, Y. (1991) Hormonal control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 266, 1557-1563.
- Colosia, A.D., Lively, M., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1987) Isolation of a cDNA clone for rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 1092-1098.
- Colosia, A.D., Marker, A.J., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R., Granner, D.K.,

- Tauler, A., Pilkis, J. and Pilkis, S.J.** (1988) Induction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin. *J. Biol. Chem.* 263, 18669-18667.
- **Crepin, K.M., Darville, M.I., Hue, L. and Rousseau, G.G.** (1988) Starvation or diabetes decreases the content but not the mRNA of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* 227, 136-140.
- **Crepin, K.M., Darville, M.I., Hue, L. and Rousseau, G.G.** (1989a) Characterization of distinct mRNAs coding for putative isozymes of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 183, 433-440.
- **Crepin, K.M., Darville, M.I., Michel, A., Hue, L. and Rousseau, G.G.** (1989b) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a rat hepatoma cell cDNA coding for 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. J.* 264, 151-160.
- **Crepin, K.M., DeCloedt, M., Vertommen, D., Foret, D., Michel, A., Rider, M.H., Rousseau, G.G. and Hue, L.** (1992) Molecular forms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expressed in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 267, 21698-21704.
- **Crepin, K.M., Vertommen, D., Dom, G., Hue, L. and Rider, M.H.** (1993) Rat muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 268, 15277-15284.
- **Darville, M.I., Crepin, K.M., Vandekerckhove, J., Vandamme, J., Octave, J.N., Rider, M.H., Hue, L. and Rousseau, G.G.** (1987) Complete nucleotide sequence coding for rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase derived from a cDNA clone. *FEBS Lett.* 224, 317-321.
- **Darville, M.I., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G.** (1989) 5'-flanking sequence and structure of the gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6543-6547.

- Darville M.I., Chikri M., Lebeau E., Hue L. and Rousseau G.G. (1991) A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 288, 91-94.
- Darville, M.I., Antoine, I.V., Mertens-Strijthagen, J.R., Dupriez, V.J. and Rousseau, G.G. (1995) An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis. *Oncogene.* 11, 1509-1517.
- Decaux, J.F., Antoine, B. and Kahn, A. (1989) Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biol. Chem.* 264, 11584-11590.
- DeFrutos, P. and Baanante, I.V. (1994) 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in liver of the teleost *Sparus aurata*. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 461-468.
- Denis-Pouxviel, C., Gauthier, T., Daviaud, D. and Murat, J.C (1990) Phosphofructokinase 2 and glycolysis in HT29 human colon adenocarcinoma cell line. *Biochem. J.* 268, 465-470.
- Depré C., Rider, M.H., Veitch R.K. and Hue L. (1993) Role of fructose 2,6-bisphosphatase in the control of heart glycolysis. *J. Biol. Chem.* 268, 13274-13279.
- Di Marco, P.N., Ghisalverti, A.V., Pearce, P.H. and Oliver, I.T. (1976) Postnatal changes in blood glucose, phosphopyruvate carboxylase and tyrosine aminotransferase after normal birth and premature delivery in the rat. *Biol. Neonate* 30, 205-215.
- Dupriez, V.J., Darville, M.I., Antoine, I.V., Gegonne, A., Ghysdael, J. and Rousseau, G.G. (1993) Characterization of a hepatoma mRNA transcribed from a third promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase encoding gene and controlled by ets

rogen-related products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8224-8228.

El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J., Fox, E. and Pilkis, S.J. (1982a) Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 257, 7603-7607.

El-Maghrabi, M.R., Fox, E., Pilkis, J. and Pilkis, S.J. (1982b) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 794-802.

El-Maghrabi, M.R., Correia, J.J., Heil, P.J., Pate, T.M., Cobb, C.E. and Pilkis, S.J. (1986) Tissue, distribution, immunoreactivity and physical properties of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5005-5009.

El-Maghrabi, M.R., Pate, T.M. and Pilkis S.J. (1984) Characterization of the exchange reactions of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 749-756.

El-Maghrabi, M.R., Pate, T.M., D'Angelo, G., Correia, J.J., Lively, M.O. and Pilkis, J. (1987) Identification of critical sulfhydryl residues in the primary sequence of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 262, 11714-11720.

Espinet, C., Vargas, A.M., El-Maghrabi, M.R., Lange, A.J. and Pilkis, S.J. (1993) Expression of the liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA in FAO cells. *Biochem. J.* 293, 173-179.

French, B., Chow, K.L., Olsen, E.N. and Schwartz, R.J. (1991) Heterodimers of myogenic helix-loop-helix regulatory factors and E12, bind a complex element governing myogenic induction of the avian cardiac α -actin promoter. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2439-2450.

Friedman, J.E., Yun, J.-S., Patel, Y.M., McGrane, M.M. and Hanson, R.W. (1993)

glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *J. Biol. Chem.* 268, 12952-12957.

Girard, J., Ferré, P., Pégorier, J.P. and Duée, P.H. (1992) Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during the perinatal period and the suckling-weaning transition. *Physiol. Rev.* 72, 507-562.

Granner, D.K. and Pilkis, S.J. (1990) The genes of hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 265, 10173-10176.

Hers, H.G. and Hue, L. (1983) Regulation of hepatic glycolysis and gluconeogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 617-653.

Hilliker, C.E., Darville, M.I., Aly, M.S., Chikri, M., Szpirer, C., Marynen, P., Rousseau, G.G. and Cassimon, J.J. (1991) Human and rat chromosomal localization of two genes for 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization. *Genomics* 10, 867-873.

Hirst, J.D. and Sternberg, M.J.E. (1991) Prediction of ATP-binding motifs: a comparison of a perceptron-type neural network and a consensus sequence method. *Protein. Enging.* 4, 615-623.

Hod, Y. and Hanson, R.W. (1988) Cyclic AMP stabilizes the mRNA for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) against degradation. *J. Biol. Chem.* 263, 7747-7752.

Hue, L., Felú, J.E. and Hers H.G. (1978) Control of gluconeogenesis and of the enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 176, 791-797.

Hue, L., Blackmores, P. and Exton, J.H. (1981) Fructose 2,6-bisphosphate: hormonal

egulation and mechanism of its formation in liver. *J. Biol. Chem.* 256, 8900-8905.

Hue L. and Bartrons R. (1985) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in liver, muscle and adipose tissue. In *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Beitner R., ed) vol. 1, pp. 29-44, CRC Press, Boca Raton FL.

Imai, E., Stromstedt, P.E., Quinn, P.G., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. and Granner, D.K. (1990) Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4712-4719.

Ip, Y.T., Granner, D.K. and Chalkley, R. (1989) Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is mediated through modulation of an already disrupted chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1289-1297.

Joaquín, M., Salvadó, C., López, S. and Tauler, A. (1994) Transforming growth factor- β controls the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase genes. *Communication to the Vth Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry. Salamanca. Spain.*

Kemp, R.G. and Marcus, F. (1990) Effects of fructose-2,6-bisphosphate on 6-phosphofructo-1-kinase and fructose-1,6-bisphosphatase. In *fructose-2,6-bisphosphate* (Pilkis J., ed.), pp 17-38, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Kessler, R., Nissler, K., Schellenberg, W. and Hofmann, E. (1982) Fructose-2,6-bisphosphate increases the binding affinity of yeast phosphofructokinase to AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 506-510.

Kitamura, K. and Uyeda, K. (1987) The mechanism of activation of heart fructose 6-phosphatase, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 262, 679-681.

Kitamura, K., Kanagawa, K., Matsuo, H. and Uyeda, K. (1988) Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Activation by phosphorylation and amino acid sequences of the phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 263, 16976-16801.

Kitamura, K., Uyeda, K., Kanagawa, K. and Matsuo, H. (1989) Purification and characterization of rat skeletal muscle fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 264, 9799-9806.

Kountz, P.D., McCain, R.W., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1986) Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: phosphate dependence and effect of other anions. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 104-113.

Kountz, P.D., Freeman, S., Cook, A.G., El-Maghrabi, M.R., Knowles, J.R. and Pilkis, S.J. (1988) The stereochemical course of phospho group transfer catalyzed by rat liver 6-phosphofructo-2-kinase. *J. Biol. Chem.* 263, 16069-16072.

Kretschmer, M., Schellenberger, W., Otto, A., Kessler, R. and Hofman, E. (1987) Fructose-2,6-bisphosphatase and 6-phosphofructo-2-kinase are separable in yeast. *Biochem. J.* 246, 755-759.

Kretschmer, M. and Fraenkel, D.G. (1991) Yeast 6-phosphofructo-2-kinase: sequence of a mutant. *Biochemistry.* 30, 10663-10672.

Kummel, L. and Pilkis, S.J. (1990) Multihormonal regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression in primary culture of rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 406-413.

Laurand, I.J., El-Maghrabi, M.R., Correia, J.J. and Pilkis, S.J. (1992) Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase properties of the phospho- and the

phospho-forms and of two mutants in which Ser³² has been changed by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 4416-4423.

Kurland, I.J., Li, L., Lange, A.J., Correia, J.J., El-Maghrabi, M.R., and Pilkis, S.J. (1993) Regulation of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 268, 14056-14064.

Kurland, I.J. and Pilkis, S.J. (1995) Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Science* 4, 1023-1037.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.

Lange, A.J., Kumel, L., El-Maghrabi, M.R., Tauler, A., Colosia, A., Marker, A. and Pilkis, S.J. (1989) Sequence of the 5' flanking region of the rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene: regulation by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 753-760.

Lange, A.J. and Pilkis, S.J. (1990) Sequence of human liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Nucleic. Acids. Res.* 18, 3652-3657.

Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1991) Isolation of bovine liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase cDNA: bovine liver and heart forms of the enzyme are separate gene products. *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 258-263.

Lange, A.J., Espinet, C., Hall, R., El-Maghrabi, M.R., Vargas, A.M., Miksicek, J., Granner, D.K. and Pilkis, S.J. (1992) Regulation of gene expression of rat skeletal muscle/liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 267, 15673-15680.

-
- Lange, A.J., Li, L., Vargas, A.M. and Pilkis, S.J. (1993) Expression of human liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. Role of the N-2 proline in the degradation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 268, 9466-9472.

 - Larondelle, V., Mertens, E., Van Schaftingen, E. and Hers, H.G. (1986) Purification and properties of spinach leaf phosphofructokinase 2/fructose-2,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 161, 351-357.

 - Lee, K.A.W. (1991) Transcriptional regulation by cAMP. *Current Opinion In Cell Biology.* 3, 953-959.

 - Lee, Y.H., Lin, K., Okar, D., Alfano, N.L., Sarma, R., Pflugrath, W. and Pilkis, S.J. (1995) Preliminary X-ray analysis of a truncated form of recombinant fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Mol. Biol.* 235, 1147-1151.

 - Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M. and Rousseau, G.G. (1991) Identification of regulatory sequences and protein-binding sites in the liver-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1099-1106.

 - Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M. and Rousseau, G.G. (1993) Liver-specific factor binding to the liver promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J. Biol. Chem.* 268, 19896-19905.

 - Lemaigre, F.P., Lause, P. and Rousseau, G.G. (1994) Insulin inhibits glucocorticoid-induced stimulation of liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene transcription. *FEBS. Lett.* 340, 221-225.

 - Lewis, C.D., Clark, S.P., Falsenfeld, G. and Gould, H. (1988) An erythrocyte-specific protein that binds to the poly(dG)region of the chicken β -globin gene promoter. *Genes. Dev.* 2, 863-873.

- Li, L., Lin, K., Kurland, I.J., Correia, J.J. and Pilkis, S.J. (1992) Site-directed mutagenesis in rat liver 6-phosphofructo-2-kinase: mutation of the fructose-6-phosphate binding site affects phosphate activation. *J. Biol. Chem.* 267, 4386-4393.
- Li, L., Lange, A.J. and Pilkis, S.J. (1993) Isolation of a cDNA for chicken liver 6-phospho-fructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 397-405.
- Lin, K., Li, L., Correia, J.J. and Pilkis, S.J. (1992a) Glu³²⁷ is part of a catalytic triad in rat liver fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 267, 6556-6562.
- Lin, K., Li, L., Correia, J.J. and Pilkis, S.J. (1992b) Arg-257 and Arg-307 of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase bind the C-2 phospho group of fructose-2,6-bisphosphatase in the fructose-2,6-bisphosphatase domain. *J. Biol. Chem.* 267, 19163-19171.
- Lin, K., Kurland, I.J., Li, L., Lee, Y.H., Okar, D., Marecek, J.F. and Pilkis, S.J. (1994) Evidence for NH₂-COOH- terminal interactions in rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 269, 16953-16960.
- Lively, M.O., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., D'Angelo, G., Colosia, A.D., Ciavola, J., Fraser, B.A. and Pilkis, S.J. (1988) Complete amino acid sequence of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 263, 839-849.
- Loisseau, A.M., Rider, M.H., Foret, D., Rousseau, G.G. and Hue, L. (1988) Rat hepatoma (HTC) cell 6-phosphofructo 2-kinase differs from that in liver and can be separated from fructose 2,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 175, 27-32.
- Lone, Y-Ch., Simon, M-P., Kahn, A. and Marie, J. (1986) Complete nucleotide and deduced aminoacid sequences of rat L-type pyruvate kinase. *FEBS Lett.* 195, 97-100.

Lyonnet, S., Coupé, C., Girard, J., Kahn, A. and Munnich, A. (1988) In vivo regulation of glycolytic and gluconeogenic enzyme gene expression in newborn rat liver. *J. Clin. Invest.* 81, 1682-1689.

MacDonald, F.D. and Buchanan, B.B. (1990) The role of fructose-6-phosphate in plant tissues. In *Fructose 2,6-bisphosphate* (Pilkis S.J., ed.), pp 193-210 CRC Press, Boca Raton, Florida.

MacDonald, F.D., Cséke, C., Chou, Q. and Buchanan, B.B. (1987) Activities synthesizing and degrading fructose-2,6-bisphosphate in spinach leaves reside on different proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 2742-2746.

Malter, J.S. (1989) Identification of an AUUUA-specific messenger RNA binding protein. *Science* 246, 664-666.

Marchand, M.J., Maisin, L., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1992) Activation of 6-phosphofructo-2-kinase by pp60v-src is an indirect effect. *Biochem. J.* 285, 413-417.

Marcus, F., Edelston, I. and Rittenhouse, J. (1984) Inhibition of Escherichia coli fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1103-1108.

Marker, A.J., Colosia, A.D., Tauler, A., Solomon, D.H., Cayre, Y., Lange, A.J., El-Iaghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1989) Glucocorticoid regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression. *J. Biol. Chem.* 264, 7000-7004.

Martín-Sanz, P., Cascales, M. and Boscá, L. (1987) Fructose 2,6-bisphosphate in isolated foetal hepatocytes. *FEBS Lett.* 225, 37-42.

Martín-Sanz, P., Cascales, M. and Boscá, L. (1989) Glucagon-induced changes in fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase in cultured rat foetal hepatocytes. *Biochem. J.* 257, 795-799.

Martín-Sanz, P., Cascales, M. and Boscá, L. (1992) Characterization of 6-phosphofructo-2-kinase from foetal-rat liver. *Biochem. J.* 281, 457-463.

McGrane, M.M., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1983) The interaction of fructose-2,6-bisphosphate and AMP with rat hepatic fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 258, 10445-10451.

McGrane, M.M., Yun, J.S., Patel, Y.M. and Hanson, R.W. (1992) Metabolic control element gene expression: In vivo studies with transgenic mice. *Trends. Biochem. Sci.* 17, 40-44.

Meek, D.W. and Nimmo, H.G. (1983) The interaction of fructose-2,6-bisphosphate with the allosteric site of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 160, 105-109.

Miralpeix, M., Carballo, E., Bartrons, R., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, J. (1992) Oral administration of vanadate to diabetic rats restores liver 6-phosphofructo-2-kinase content and mRNA. *Diabetología* 35, 243-248.

Molkentin, J.D., Bragan, R.S., Jobe, S.M. and Markham, B.E. (1993) Expression of alpha-myosin heavy chain gene in the heart is regulated in part by an E box-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 2602-2609.

Munnich, A., Lyonnet, S., Chauvet, D., Van Schaftingen, E. and Kahn, A. (1988) Differential effects of glucose and fructose on liver L-type pyruvate kinase gene expression in vivo. *J. Biol. Chem.* 262, 17065-17071.

Murray, K.J., El-Maghrabi, M.R., Kountz, P.D., Lukas, T.J., Soderling, T.R. and

- Pilkis, S.J.** (1984) Amino acid sequence of the phosphorylation site of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 259, 7673-7681.
- **Noda, T., Hoffschulte, H. and Holzer.** (1984) Characterization of fructose-1,6-bisphosphatase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 259, 7191-7197.
- **Noguchi, T., Inoue, H., and Tanaka, T.** (1985) Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase in diabetic rat liver by insulin and dietary. *J. Biol. Chem.* 260, 14393-14397.
- **O'Brien, R.M. and Granner, D.K.** (1990) PEPCK gene as model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. *Diabetes Care* 13, 327-339.
- **Okar, D.A., Kakalis, L.T., Narula, S.S., Armitage, I.M. and Pilkis, S.J.** (1995) Identification of transient intermediates in the bisphosphatase reaction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by ³¹P-NMR spectroscopy. *Biochem. J.* 308, 189-195.
- **Olson, S., Uyeda, K. and McBride, O.N.** (1989) Localization of fructose 6-P,2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase to human chromosome X. *Somatic Cell. Mol. Genet.* 15, 617-621.
- **Paravicini, G. and Kretschmer, M.** (1992) The yeast FBP26 gene codes for a fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochemistry.* 31, 7126-7133.
- **Pégorier, J.P., Salvado, J., Forestier, M. and Girard, J.** (1992) Dominant role of glucagon in the initial induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in cultured hepatocytes from fetal rats. *Eur. J. Biochem.* 210, 1053-1059.
- **Pelech, S., Cohen, P., Fisher, M.J., Pagson, C.I., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J.**

- (1984). The protein phosphatases involved in cellular regulation: glycolysis, gluconeogenesis and aromatic acid breakdown in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 145, 39-49.
- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., Claus, T.H. and Cumming, D.A. (1981) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 256, 3619-3622.
- Pilkis, S.J., Pilkis, J. and El-Maghrabi, M.R. (1985) The sugar phosphate specificity of rat hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 260, 7551-7556.
- Pilkis, S.J., Lively, M.O., Pilkis, J. and El-Maghrabi, M.R. (1987) Active site sequence of hepatic fructose 2,6-bisphosphatase homology in primary structure with phosphoglycerate mutase. *J. Biol. Chem.* 262, 12672-12675.
- Pilkis S.J. and El-Maghrabi M.R. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 755-783.
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R. and Claus T.H. (1990) Fructose-2,6-bisphosphate in the control of hepatic gluconeogenesis: from metabolites to molecular genetics. *Diabetes Care.* 13, 589-599.
- Pilkis, S.J., Claus, T.H., Kurland, I.J. and Lange, A.J. (1995) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signalling enzyme. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 799-836.
- Pohlig, G., Wingender-Drissen, R., Noda, T. and Holzer, H. (1983) Cyclic AMP and fructose-2,6-bisphosphate stimulate *in vitro* phosphorylation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 317-324.

-
- **Poole G.P., Postle A.D. and Bloxham D.P.** (1982) The induction of synthesis of L-type pyruvate kinase in cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* 204, 81-87.

 - **Purwin, C., Laux, M. and Holzer, H.** (1987) Fructose-2-phosphate, an intermediate of the dephosphorylation of fructose-2,6-bisphosphate with a purified yeast enzyme. *Eur. J. Biochem.* 164, 27-30.

 - **Pyko, M., Rider, M.H., Hue, L. and Wegener, G.** (1993) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from frog skeletal muscle: purification, kinetics and immunological properties. *J. Comp. Physiol. B.* 163, 89-98.

 - **Reichlin, M.** (1980) Use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides. *Methods. Enzymol.* 70, 159-165.

 - **Reinhart, G.A and Lardy, H.A.** (1980) Rat liver phosphofructokinase: kinetic and physiological ramifications of the aggregation behaviour. *Biochemistry.* 19, 1491-1495.

 - **Rider, M.H., Foret, D. and Hue, L.** (1985) Comparison of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem. J.* 231, 193-196.

 - **Rider, M.H., Vandamme, J., Lebeau, E., Vertommen, D., Vidal, H., Rousseau, G.G., Vandekerckhove, J. and Hue, L.** (1992a) The two forms of bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase result from alternative splicing. *Biochem. J.* 285, 405-411.

 - **Rosa, J.L., Bartrons, R. and Tauler, A.** (1992a) Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem. J.* 287, 113-116.

 - **Rosa, J.L., Tauler, A., Lange, A.J., Pilkis, S.J. and Bartrons, R.** (1992b) Transcriptional and posttranscriptional regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-

- bisphosphatase during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3746-3750.
- Rosa, J.L., Ventura, F., Tauler, A. and Bartrons, R. (1993) Regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression by glucagon. *J. Biol. Chem.* 268, 22540-22545.
- Rosa, J.L., Perez, J.X., Ventura, F., Tauler, A., Gil, J., Shimoyama, M., Pilkis, S.J. and Bartrons, R. (1995) Role of the N-terminal region in covalent modification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: comparison of phosphorylation and ADP-ribosylation. *Biochem. J.* 309, 119-125.
- Rousseau, G.G and Hue, L. (1993) Mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Prog. in Nucl. Acid. Res.* 45, 99-127.
- Sakai, A., Watanabe, F. and Furuya, E. (1994) Cloning of cDNAs for fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from frog skeletal muscle and liver, and their expression in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 1099-1106.
- Sakakibara, R., Kitajima, S. and Uyeda, K. (1984) Differences in kinetic properties of phospho and dephospho forms of fructose 6-phosphate 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 259, 41-46.
- Sakata, J. and Uyeda, K. (1990) Bovine heart fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4951-4955.
- Sakata, J., Abe, Y. and Uyeda, K. (1991) Molecular cloning of the DNA and characterization of rat testes fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 266, 15764-15770.

-
- Salvadó, C., Joaquin, M., López, S. and Tauler, A. (1994) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase is regulated during the cell cycle. *Communication to the Vth Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry. Salamanca. Spain.*

 - Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Second Edition.*

 - Schubert, Ch., Goltzsch, W. and Hofmann, E. (1983) Perinatal changes of fructose 2,6-bisphosphate in the rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 672-677.*

 - Schulz, G.E., Elzinga, M., Marx, F. and Schirmer, R.H. (1974) Three-dimensional structure of adenyl kinase. *Nature. 250, 120-123.*

 - Seth, A., Asaone, R., Fischer, R.J., Mavrothalassitis, G.J., Bhat, N.K. and Papes, T.S. (1992) The ets gene family. *Cell. Growth. Differ. 3, 327-334.*

 - Shaw, G. and Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell 46, 659-667.*

 - Shirakihara, Y. and Evans, P.R. (1988) Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from Escherichia coli with its reaction products. *J. Mol. Biol. 204, 973-994.*

 - Stewart, H.B., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1985) Evidence for a phosphoenzyme intermediate in the reaction pathway of rat hepatic Fru-2,6-P₂ase. *J. Biol. Chem. 260, 12935-12941.*

 - Stewart, H.B., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1986) Mechanism of activation of fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem. 261, 8793-8798.*

-
- Tauler, A., Rosenberg, A.H., Colosia, A., Studier, E.W. and Pilkis, S.J. (1988) Expression of the bisphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6642-6646.
- Tauler, A., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. (1989) Expression of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and its kinase domain in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7316-7320.
- Tauler, A., Lin, K. and Pilkis, S.J. (1990) Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: use of site-directed mutagenesis to evaluate the roles of His-258 and His-392 in catalysis. *J. Biol. Chem.* 265, 15617-15622.
- Thompson, W.A., Nadal-Ginard, B. and Mahdaivi, V. (1991) A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the β -myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. *J. Biol. Chem.* 266, 22678-22688.
- Trempt, G.L., Bouquet, D., Ripoche, M.A., Cognet, M., Lone, Y-C., Jami, J., Kahn, A. and Daegelen, D. (1989) Expression of the rat L-type pyruvate kinase gene from its dual erythroid and liver-specific promoter in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 264, 19904-19910.
- Tsuchya, Y. and Uyeda, K. (1994) Bovine heart fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase mRNA and gene structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 467-474.
- Tuil, D., Clerque, N., Montarras, D., Pinset, C., Kalin, A. and Phan-Dinh-Tuy, F. (1990) CC Ar GG boxes, cis-acting elements with a dual specificity. Muscle-specific transcriptional activation and serum responsiveness. *J. Mol. Biol.* 213, 677-686.
- Van Schaftingen, E., Hue, L. and Hers, H.G. (1980) Control of the fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose. *Biochem. J.* 192, 887-895.

-
- Van Schaftingen, E., Jett, M.F., Hue, L. and Hers, H.G. (1981) Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3483-3466.

 - Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R. and Hers, H.G. (1982) A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *Eur. J. Biochem.* 129, 191-195.

 - Van Schaftingen, E. (1990) Role of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of hepatic carbohydrate metabolism. In *Fructose 2,6-bisphosphate (Pilkis S.J., ed.)*, pp 64-86, CRC Press, Boca Raton, Florida.

 - Van Schaftingen, E., Mertens, E. and Opperabes, F.R. (1990) Fructose-2,6-bisphosphate in primitive systems. In *Fructose 2,6-bisphosphate (Pilkis S.J., ed.)*, pp 229-244, CRC Press, Boca Raton, Florida.

 - Vargas, A.M., Sola, M.M., Lange, A.J., Poveda, G. and Pilkis, S.J. (1994) c-AMP-independent synergistic effects of insulin and dexamethasone on fructose 2,6-bisphosphatase metabolism in H411E cells. *Diabetes* 43, 792-799.

 - Vaulont, S., Munnich, A., Decaux, J.F. and Kahn, A. (1986) Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J. Biol. Chem.* 261, 7621-7625.

 - Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Gil, J. and Bartrons, R. (1991) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in rat brain. *Biochem. J.* 276, 455-460.

 - Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Pilkis, S.J. and Bartrons, R. (1992) Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: evidence for a neural specific isoenzyme. *J. Biol. Chem.* 267, 17939-17943.

-
- Ventura, F., Ambrosio, S., Bartrons, R., El-Maghrabi, M.R., Lange A.J. and Pilkis S.J. (1995) Cloning and expression of a catalytic core bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 1140-1148.

 - Vidal, H., Crepin, K.M., Rider, M.H., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1993) Cloning and expression of novel isoforms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from bovine heart. *FEBS Lett.* 330, 329-333.

 - Wall, S.R., Van den Hove, M.-F., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G. (1989) Thyroid hormone stimulates expression of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* 257, 211-214.

 - Watanabe, F., Sakai, A., Furuya, E. and Uyeda, K. (1994) Molecular cloning and tissue specific expression of fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase of rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 335-340.

 - Weiss, L. and Reinberg, D. (1992) Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcriptional-competent complexes. *FASEB J.* 6, 3300-3309.

 - Yamamoto, M., Hamasaki, N., Maruta, Y. and Tomonaga, M. (1990) Fructose 2,6-bisphosphate changes in rat brain during ischemia. *J. Neurochem.* 4, 592-602.

 - Zimmerman, P.L.N. and Rousseau, G.G. (1994) Liver specific DNaseI-hypersensitive sites and DNA methylation pattern in the promoter region of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Eur. J. Biochem.* 220, 183-191.

 - Zinn, K., DiMaro, D. and Maniatis, T. (1983) Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene. *Cell.* 34, 865-879.