

**ESTUDI DE LA GLUCOGENO-SINTETASA
DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS HUMANS ***

Comunicació presentada el dia 22 d'abril de 1971 pels doctors

E. SALSAS i LEROY i M. ROSELL i PÉREZ

Departament de Bioquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona

* Treball fet amb l'ajuda d'una beca de «Formación de personal investigador» i d'una ajuda a la investigació del Ministeri d'Educació i Ciència.

Aquest treball és part de la tesi presentada per E. SALSAS per a l'obtenció del grau de Doctor.

INTRODUCCIÓ

Els leucòcits constitueixen un material molt apropiat per a l'estudi *in vivo*. Si deixem a part les cèl·lules de tumors ascítics i alguns cultius de teixits, els leucòcits circulants són les cèl·lules nucleades de mamífers més accessibles i, sense cap dubte, les cèl·lules humanes normals més fàcils d'obtenir i isolar en estat homogeni. Un avantatge addicional és la possibilitat d'obtenir-ne mostres reproduïbles a partir d'un mateix individu.¹

Després de llur isolament, les cèl·lules estan en una suspensió tal, que cada element individual està en contacte íntim amb el medi lliure de teixit connectiu, membranes i vasos sanguinis, i de la qual poden ésser separats els altres elements figurats de la sang amb facilitat. El compte d'aquestes suspensions pot ésser fet amb exactitud.²

Fins aquí les condicions per a investigar el metabolisme d'aquestes cèl·lules són ideals, però hom ha de tenir en compte que la població pot no ésser homogènia, sinó que més aviat estarà formada, en condicions normals, per diferents tipus de cèl·lules, i de cèl·lules joves i madures. L'estudi del metabolisme dels tipus individuals només és possible de forma immediata en casos especials, com és ara la utilització de cèl·lules de leucèmics mieloides o limfàtics, i d'exsudats induïts dins les cavitats peritoneals d'animals d'experimentació. En cap d'aquests casos hom no pot, però, referir-se a cèl·lules normals.

Una altra possibilitat és l'aïllament dels diversos tipus d'elements, a partir d'una població de leucòcits totals, mitjançant diverses tècniques més o menys elaborades. D'aquesta manera hom pot disposar d'un material òptim per a tractar d'estudiar el metabolisme del glucogen en un teixit humà, normal i homogeni.

Hi ha, a més, un altre incentiu, que és la no existència en el polimorfonuclear de les dues formes de l'enzim glucogeno-sintetasa, com és el cas de múscul o fetge, fet observat inicialment per ROSELL I PÉREZ i ESMANN⁵ i corroborat després per altres investigadors.^{7, 12}

MATERIALS I MÈTODES

Obtenció de leucòcits.

Els leucòcits foren obtinguts mitjançant dues tècniques fonamentals:

1) Leucòcits totals (60 % PMN, 40 % MN) a partir de residus de plasmafèresi, dels quals se separen els eritròcits per sedimentació accelerada amb dextrà⁹ i les plaquetes per centrifugació.

2) Leucòcits polimorfonuclears a partir de sang total mitjançant la tècnica de RABINOWITZ,⁴ que consisteix en l'adsorció dels leucòcits en columnes de perles de vidre siliconades i l'elució amb plasma i amortidors que porten EDTA, i amb recuperació dels polimorfonuclears 99 % purs.

Les cèl·lules foren homogeneïtzades per desintegració ultrasònica. La glucogeno-sintetasa fou assajada per la tècnica de THOMAS i col.,¹¹ amb l'addició de G6P o sense. La proteïna, determinada pel mètode de LOWRY³ amb albúmina bovina serosa com a *standard*. El glucogen, mesurat com a glucosa després del seu isolament i hidròlisi àcida.

RESULTATS

Condicions òptimes d'assaig de la glucogeno-sintetasa.

El pH de 7.8 és el que procura una activitat més elevada i també una estabilitat més gran (fig. 1). La temperatura òptima per a l'enzim, considerant tant l'activitat com l'estabilitat, és la de 30° C (fig. 2).

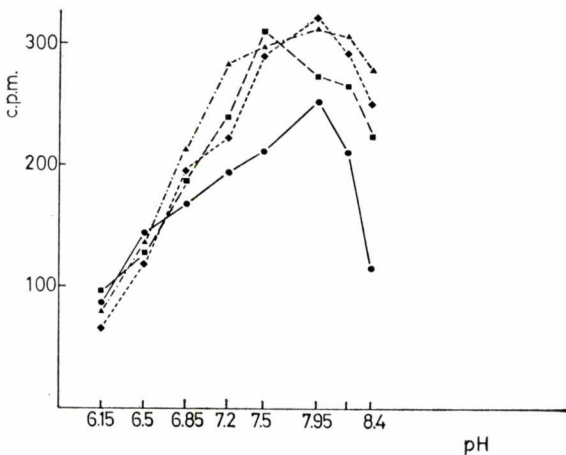


FIG. 1. — EFECTE DEL pH SOBRE L'ACTIVITAT I L'ESTABILITAT DE LA GLUCOGENO-SINTETASA DE LEUCÒCITS.

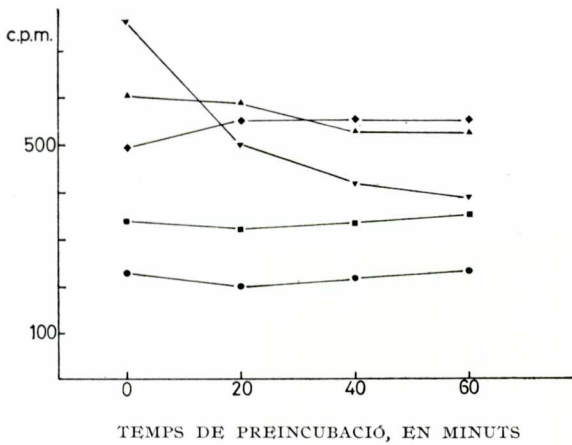
La preparació enzimàtica, que consisteix en la fracció particulada després de centrifugar a 50.000 x g una mostra de leucòcits totals, fou incubada a 30°C els temps que indiquem, després dels quals fou incubada 10 minuts també a 30° C junt amb el test d'assaig.

Els pH que indiquem són els mesurats en el transcurs de la preincubació.

Temps de preincubació :

- 0 minuts ●——●
- 30 minuts ■——■
- 60 minuts ◆——◆
- 90 minuts ▲——▲

FIG. 2. — INFLUÈNCIA DE LA TEMPERATURA DE PREINCUBACIÓ SOBRE L'ACTIVITAT DE LA GLUCOGENO-SINTETASA



La mostra enzimàtica, que consisteix en el sobrenedant després de centrifugar a 15.000 x g un homogenat de leucòcits totals, es divideix en cinc parts al·lòtiques. En cadascuna hom mesura l'activitat després de 0, 20, 40 i 60 minuts de preincubació a les diferents temperatures a què té lloc l'experiment. La incubació amb el test d'assaig per a determinar l'activitat, té lloc en cada cas a la mateixa temperatura que la preincubació.

Temperatura de preincubació i incubació :

- 40°C ▼
- 37°C ▲
- 30°C ◆
- 20°C ■
- 18°C ●

FIG. 3. EFECTE DEL TEMPS D'INCUBACIÓ SOBRE L'ACTIVITAT GLUCOGENO-SINTETASA.

Les diferents rectes representen la marxa de la reacció de les diferents concentracions de l'enzim, que són (de menys pendent a més) 0,05, 0,125, 0,250, 0,375, 0,5 i 0,8 de la més concentrada o 1,0. Els pendents calculats per regressió lineal per a cada recta són indicats a continuació :

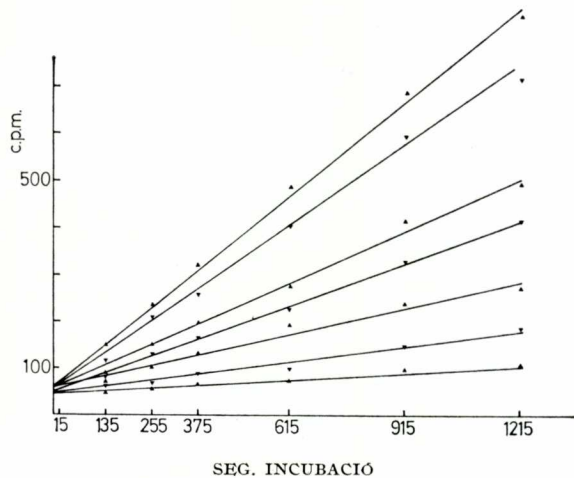
Concentració de l'enzim

1,0 0,8 0,5 0,375 0,25 0,125 0,05

Pendent

0,67 0,56 0,37 0,30 0,19 0,11 0,05

Aquets pendents són els que fem servir per a la representació de la pròxima figura.



La reacció és lineal durant el temps que utilitzem, i així mateix és proporcional a la concentració d'enzim (fig. 3). L'estabilitat de l'enzim és molt bona a -20°C i acceptable a $+4^{\circ}\text{C}$ (taula 1).

Purificació

Com a resultat de les experiències sobre sedimentabilitat del complex enzimàtic unit a glucogen, començarem el procés de purificació isolant la fracció que sedimenta entre $12.000 \times \text{g}$ i $50.000 \times \text{g}$. Això ens portà a una

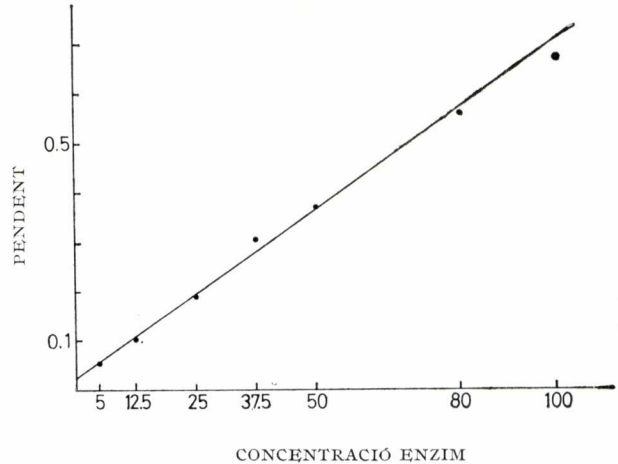
purificació d'unes 25-35 vegades respecte a la proteïna inicial de l'homogenat amb una recuperació del 90-100 % tant per a la glucogeno-sintetasa com per al glucogen (taula 2).

Aquestes preparacions poden ésser purificades posteriorment per cromatografia de bescanvi iònic amb DEAE Sephadex.

La purificació és en aquest punt d'unes 200 vegades, i la recuperació, elevada.

FIG. 4. — PROPORCIONALITAT ENTRE LA CONCENTRACIÓ D'ENZIM I LA VELOCITAT DE LA REACCIÓ.

La concentració d'enzim és representada en aquesta gràfica respecte a la velocitat de la reacció, mesurada com el pendent de cadascuna de les rectes de la figura anterior.



Les preparacions enzimàtiques que fem servir resulten excloses pràcticament per complet dels gels del tipus del Sephadex G-200, per la qual cosa poc podem esperar d'aquest tractament.

En canvi, la gel filtració a través de Sepharose 2 B, una agarosa que separa molècules de pes molecular molt elevat, permet d'aconseguir una purificació convenient del sediment de $50.000 \times g$.

Combinant tots els procediments que hem descrit fins ara, hom pot arribar a una purificació total de 1.200 vegades respecte al contingut en proteïna, i de 20 vegades respecte al contingut en glucogen, amb una recuperació del 50 % (taula 3).

Cinètica de l'enzim

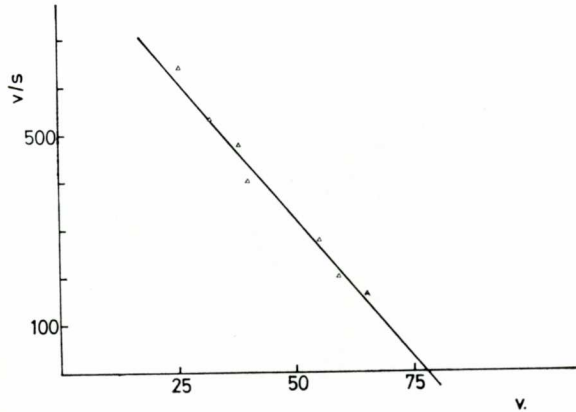
Amb l'enzim a diferents graus de purificació hem efectuat estudis cinètics en els quals hem obtingut una K_M aparent per l'UDPG molt més petita que l'anteriorment publicada, però que es troba al voltant de les descrites per a la glucogeno-sintetasa d'altres teixits.

Totes les cinètiques han estat fetes en presència de G6P.

Amb els valors de les velocitats inicials autèntiques obtingudes segons descrivim en una altra banda,⁸ calculàrem la K_M aparent, mitjançant

FIG. 5. — REPRESENTACIÓ SEGONS EADIE-HOFSTEE DE LA DEPENDÈNCIA DE LA VELOCITAT RESPECTE A LA CONCENTRACIÓ DE SUBSTRAT

La preparació enzimàtica consistí en un liofilitzat de les fraccions amb activitat enzimàtica després d'una cromatografia d'intercanvi iònic a través de DEAE Sephadex. La K_M calculada mitjançant aquesta representació és de $8,4 \times 10^{-2}$ M.



tres procediments: els gràfics de LINEWEAVER-BURK i EADIE-HOFSTEE (figura 5) i un mètode estadístic tal com descriu WILKINSON,¹³ amb l'ajut d'un programa confeccionat per la Olivetti 101.

D'aquesta manera són obtinguts valors per a la K_M per l'UDPG al voltant de 0,07 mM.

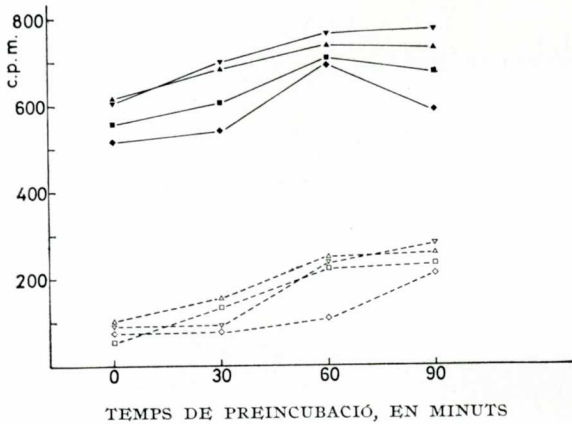


FIG. 6. — EFECTE DE LA PREINCUBACIÓ A 30°C EN DIFERENTS PREPARACIONS DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS. ADDICIÓ DE MAGNESI I MERCAPTOETANOL.

Els leucòcits polimorfonuclears foren homogenitzats per sonicació immediatament després de llur obtenció, i dividits en parts alíquotes a les quals foren afegits els diferents preparats :

	+G6P	-G6P
Enzim + 30 mM Mg ²⁺ + EtSH 50 mM	▼	▽
Enzim + 30 mM Mg ²⁺	▲	△
Enzim + 10 mM Mg ²⁺ + EtSH 50 mM	■	□
Enzim + 10 mM Mg ²⁺	◆	◇

Absència d'interconversió

Les preincubacions a 30° C en diverses condicions no fan variar sensiblement la dependència respecte a la G6P que té aquest enzim. És a dir, l'enzim sembla existir en una sola forma, dependent de G6P per a la seva activitat.

Hem arribat a aquesta conclusió després d'haver efectuat nombroses experiències de preincubacions de l'enzim en presència de diferents compostos.

Així, el magnesi a concentracions de 30 i 10 mM, en presència o no de mercaptoetanol, no produeix una variació sensible (fig. 6).

En altres ocasions ha estat comparat l'efecte del magnesi respecte a la preparació de l'enzim sense additius, i l'efecte de la barreja ATP 2 mM-Mg⁺⁺ 10 mM, que no produeix efecte (fig. 7).

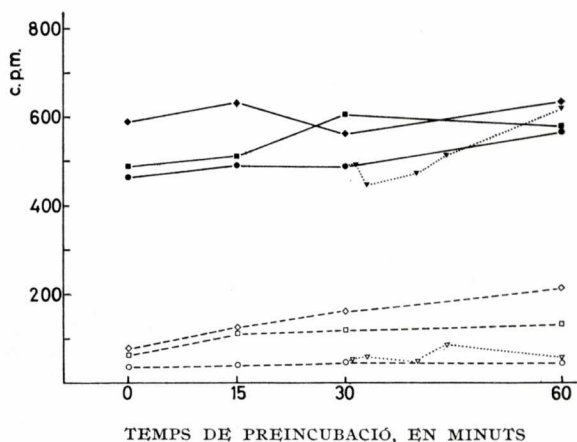


FIG. 7. — EFECTE DE LA PRE-INCUBACIÓ A 30°C SOBRE DIFERENTS PREPARACIONS ENZIMÀTIQUES DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS. ADDICIÓ DE MAGNESI I ATP-Mg.

La preparació de l'enzim fou feta de manera idèntica a la figura 6.

	+G6P	-G6P
Enzim + 20 mM Mg ²⁺	◆	◇
Enzim + 10 mM Mg ²⁺	■	□
Enzim	▼	▽
Enzim + 2 mM ATP + 10 mM Mg ²⁺	▲	△

En altres experiments efectuats amb preparacions de leucòcits totals (amb elevat percentatge de PMN, de 80 a 90 %) però sense passar per columnes, han estat obtinguts resultats bastant curiosos, com és ara una activitat igual assajada en presència o absència de G6P, als primers minuts de preincubació, si l'enzim és amb magnesi (fig. 8).

De tota manera, hom no en pot treure conclusions definitives, per tal com en aquests experiments no mesuràrem G6P ni efectuàrem cap altra manipulació amb l'enzim.

DISCUSSIÓ

La utilització dels leucòcits permet de fer un estudi enzimàtic en l'espècie humana de forma relativament senzilla.

L'enzim estudiat, glucogeno-sintetasa, ha estat descrit com plenament dependent de G6P per a la seva activitat. Aquesta peculiaritat el fa di-

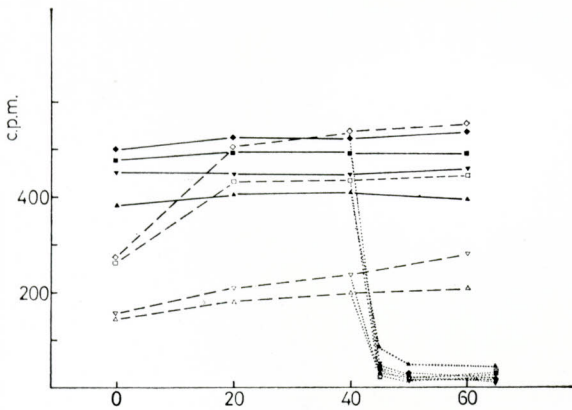


FIG. 8. — EFECTE DEL TEMPS DE PREINCUBACIÓ A 30° C SOBRE DIFERENTS PREPARACIONS DE LEUCÒCITS ENRIQUIDES EN POLIMORFONUCLEARS.

En aquesta figura podem veure la diferència de comportament d'aquestes preparacions si les rentem amb solució salina o bé amb amortidor (la composició d'aquest és: KCl 4,7 mM, NaH₂PO₄, 1H₂O 0,2 mM, Na₂HPO₄, 2H₂O 1 mM, Tris 45 mM EDTA 0,55 mM, Glucosa 16,7 mM NaCl 96 mM pH 7,4) en el transcurs de les preincubacions a 30° C, afegint-hi o no Mg²⁺ 20 mM.

També hom pot veure l'efecte de l'ATP 5 mM—Mg²⁺ 20 mM. En homogeneïtzar les cèl·lules estaven resuspeses en el seu amortidor habitual Tris 50 mM, EDTA 5mM, pH 7,8.

	+G6P	-G6P
Leucòcits rentats amb solució salina —Mg ²⁺	◆	◇
Leucòcits rentats amb solució salina +Mg ²⁺	■	□
Leucòcits rentats amb amortidor —Mg ²⁺	●	○
Leucòcits rentats amb amortidor +Mg ²⁺	▼	▽

Després d'afegir-hi ATP—Mg²⁺ l'activitat de les diferents fraccions és representada pel mateix símbol unit per una línia de punts.

ferent dels enzims d'altres teixits i d'altres espècies. Per tal d'estar segurs que això no era degut a una forma incorrecta de dur a terme l'assaig de la transformació, reinvestigàrem les condicions òptimes d'assaig de l'enzim.

Amb aquestes dades prosseguirem l'estudi de la interconversió, i veiérem que no es presentava en cap de les condicions que hem assajat. En altres

ocasions en què les preparacions de PMN no eren totalment pures, els resultats foren difícils d'interpretar.

Com a conclusió podem pensar que l'enzim es troba en una forma totalment dependent de G6P, en aquestes cèl·lules, i que, si hi ha un mecanisme d'interconversió, difereix bastant en les seves propietats dels altres teixits.

D'altra banda les constants cinètiques de l'enzim purificat fan molt més probable la seva actuació en condicions fisiològiques.

La purificació aconseguida és molt acceptable si hom la compara amb les obtingudes amb múscul ⁶ i fetge,¹⁰ i més si tenim en compte el fet de tractar-se d'un teixit humà normal i homogeni, la qual cosa comporta unes manipulacions prèvies elaborades i que la quantitat de teixit disponible no sigui il·limitada.

TAULES

1

TANT PER CENT D'ACTIVITAT DE LA GLUCOGENO-SINTETASA
EN MOSTRES EMMAGATZEMADES ALGUNS DIES
A 4° C I A -20° C

Dies emmagatzematge	4° C		-20° C	
	- G6P	+ G6P	- G6P	+ G6P
1	100	100	100	100
5	80	71	90	84
22	45	44	70	73
35	35	37	70	70

2

PURIFICACIÓ PER CENTRIFUGACIÓ DIFERENCIAL. RESULTAT GENERAL.

Aquí presentem els valors de: concentració de la glucogeno-sintetasa, concentració de proteïna, activitat específica respecte al glucogen, vegades de purificació de la glucogeno-sintetasa respecte a la proteïna i el rendiment en glucogeno-sintetasa, de l'homogenat cru (C), del sediment (1P) i sobrenedant (1S) després de centrifugar a 1.400 x g, sediment (12P) i sobrenedant (12S) després de centrifugar a 12.000 x g i de la fracció particulada (50P) i sobrenedant (50S) després de centrifugar a 50.000 x g

Fracció enzimàtica	Volum ml	Conc. GS nM/m/ml	Proteïna conc. mg/ml	Activitat específ. nM/m/mg proteïna	Glucogen conc. mg/ml	Activitat específ. nM/m/mg glucogen	Rendim. GS %	Purif. GS x vegades
C	54.0	61.2	12.5	4.9	0.95	64.4	100	1
1P	54.0	4.3	2.9	1.5			7.0	
1S	51.4	64.6	9.7	6.7	0.99	65.2	104	1.4
12P	51.4	6.0	4.0	1.5	0.09	63.8	9.3	
12S	49.6	70.0	6.1	11.5	0.88	79.5	105	2.4
50P	49.6	67.6	0.5	140.8	0.72	93.9	101	28.8
50S	49.0	0.5	5.8		0.21			

3

PROCEDIMENT GENERAL DE PURIFICACIÓ

Aquí veiem la concentració de proteïna, activitat específica respecte a la proteïna, concentració de glucogen, vegades de purificació respecte a l'homogenat cru inicial, i el rendiment en enzim de l'homogenat cru inicial, de la fracció particulada després de 50.000 x g, de la reunió de fraccions amb activitat després de la filtració a través de gel de Sepharose 2B, i de la reunió de fraccions amb activitat després de la cromatografia de bescanvi iònic amb DEAE Sephadex.

Preparació	Proteïna mg/ml	Activitat específica nM/min/mgP	Glucogen mg/ml	Purificació x vegades	Rendiment %
Cru	12	4.4	0.86	—	—
Fracció particulada a 50.000 x g	0.444	125.5	0.85	28.7	100
Reunió fraccions Sepharese	0.036	688.9	0.35	157	83
Reunió fraccions Deae Sephadex	0.011	5238.2	0.04	1190	53

BIBLIOGRAFIA

1. BECK, W. S. — «Ser. Haemat.», 1, 4 (1968) 69.
2. ESMANN, V. — «Thesis», Universitat d'Àrhus, Dinamarca (1962).
3. LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L., i RANDALL, R. J. — «J. Biol. Chem.», 193, 265 (1951).
4. RABINOWITZ, Y. — «Blood», 23, 811 (1964).
5. ROSELL I PÉREZ, M., i ESMANN, V. — «Acta Chem. Scand.», 19, 679 (1965).
6. ROSELL I PÉREZ, M., i LARNER, J. — «Biochemistry», 3, 75 (1964).
7. SALSAS, E., i ROSELL PÉREZ, M. — 5.º Congreso Nacional de Bioquímica. «Soc. Esp. Bioquímica», Barcelona (1971).
8. SALSAS, E. — Tesi Doctoral. Director, Dr. M. ROSELL I PÉREZ. Fac. Farmàcia. Universitat de Barcelona (1971).
9. SKOOG, W. A., i BECK, W. S. — «Blood», 11, 436 (1956).
10. STEINER, D. F., YOUNGER, L., i KING, J. — «Biochemistry», 4, 740 (1965).
11. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K., i LARNER, J. — «Analytical Biochemistry», 25, 486 (1968).
12. VANDERWENDE, C., JOHNSON, J. C., i THUNBERG, S. A. — «The Bulletin», «New Jersey Acad. Sci.», 13, 35 (1968).
13. WILKINSON, G. N. — «Biochem. J.», 80, 324 (1961).