

Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> i Glucosa 1,6-P<sub>2</sub> en els eritròcits de gall durant el desenvolupament.

C. Espinet, R. Bartrons i J. Carreras.

Departament de Bioquímica. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.  
Casanova 143, Barcelona 08036.

Abstract

Fructose 2,6-P<sub>2</sub> and glucose 1,6-P<sub>2</sub> in erythrocytes during chick development.

Fructose 2,6-P<sub>2</sub>, considered absent in mammalian erythrocytes, occurs in rooster erythrocytes at a concentration (1.3 nmol.10<sup>9</sup> cells<sup>-1</sup>) similar to that of glucose 1,6-P<sub>2</sub> (5.4 nmol.10<sup>9</sup> cells<sup>-1</sup>) and glycerate 2,3-P<sub>2</sub> (1.9 nmol.10<sup>9</sup> cells<sup>-1</sup>). In contrast with the levels of glycerate 2,3-P<sub>2</sub> and similarly to the levels of inositol 5-P, the levels of both fructose 2,6-P<sub>2</sub> and glucose 1,6-P<sub>2</sub> are very low in the erythrocytes of the embryos. They begin to increase just before hatch and continue to increase during the first few days post-hatching. Both fructose 2,6-P<sub>2</sub> and glucose 1,6-P<sub>2</sub> stimulate erythrocyte phosphofructokinase, and relieve the inhibition produced by glycerate 2,3-P<sub>2</sub> and inositol 5-P.

Introducció

El glicerat 2,3-P<sub>2</sub> (2,3-BPG), la glucosa 1,6-P<sub>2</sub> (G-1,6-P<sub>2</sub>) i la fructosa 2,6-P<sub>2</sub> (F-2,6-P<sub>2</sub>) són metabòlits que actuen com "senyals" intracel·lulars implicades en el control del metabolisme i d'altres funcions cel·lulars (Bartrons i Carreras 1984; Carreras et al. 1986). En els eritròcits, el 2,3-BPG té diferents funcions derivades de la seva capacitat d'interaccionar amb l'hemoglobina i les proteïnes de la membrana, entre d'altres la modulació de l'afinitat per l'oxigen. A més, pot influir sobre l'activitat de varis enzims del metabolisme glucídic i dels nucleòtids adenílics, així com sobre la síntesi de proteïnes (Chiba i Sasaki 1978). La concentració de 2,3-BPG experimenta notables variacions en els diferents tipus de cèl·lules eritroides en les diferents fases de l'eritropoesi (Carreras i Bartrons 1985). En els eritròcits d'aus adultes els nivells de 2,3-BPG són molt baixos; en ells l'afinitat de l'hemoglobina per l'oxigen és modulada per l'inositol fosfat (Borgese i Lampert 1975; Isaacks i Harkness 1980; Isaacks et al. 1976; Bartlett i Borgese 1976; Bartlett 1980). La G-1,6-P<sub>2</sub> pot influir l'activitat de diferents enzims glicolítics i de la via del fosfogluconat (Beitner 1985). La F-2,6-P<sub>2</sub> influeix sobre les activitats de la fosfofructoquinasa, la fructosa 1,6-P<sub>2</sub> bisfosfatasa i la fosfoglucomutasa, i és un dels principals reguladors del flux glicolític i neoglucogènic (Hue i Bartrons 1985). Les variacions de la concentració de G-1,6-P<sub>2</sub> i de F-2,6-P<sub>2</sub> i llurs implicacions funcionals en els diferents tipus de cèl·lules vermelles i en les diferents fases de la seva diferenciació no han estat estudiades. Aquest treball té per objectiu estudiar les variacions dels nivells d'aquests dos compostos difosforilats durant l'eritropoesi de gall, i llurs implicacions metabòliques.

## Mètodes

Els animals utilitzats han estat galls adults (*Gallus domesticus*) Hubbard White Mountain de 20-30 setmanes d'edat, embrions incubats a 37°C i polls de 0 dies fins 6 setmanes d'edat. La sang, obtinguda bé de la vena còrion-al.lantoide en els embrions ó de la jugular en polls i adults, ha estat recollida en un volum d'un medi contenint NaCitrat 15 mM, NaCl 150 mM i glucosa 5 mM, pH 7.8. El rentat dels eritròcits s'ha efectuat mitjançant successives centrifugacions a 1000xg durant 5 min. en el mateix medi, permetent la separació de trombocits i leucòcits que queden en la fracció superior del sediment.

El contingut en G-1,6-P<sub>2</sub> s'ha determinat en extractes àcids usant-el com cofactor de la fosfoglucomutasa (Passonneau 1969). El contingut en F-2,6-P<sub>2</sub> i en 2,3-BPG s'han valorat seguint els mètodes descrits per Van Schaftingen et al. (1982) i Bartrons et al. (1982) respectivament.

Les activitats enzimàtiques han estat determinades seguint els següents mètodes. Beutler (1975) per les activitats hexoquinasa, fosfofructoquinasa i piruvatquinasa; Bartrons et al. (1983) per la fosfofructoquinasa 2; Climent F. et al (1985) per la G-1,6-P<sub>2</sub> sintasa, i Bassols et al. (1985) per la G-1,6-P<sub>2</sub> fosfatasa.

Per l'aïllament i separació de la fosfofructoquinasa 1 i la fosfofructoquinasa 2 ha estat seguit essencialment el procediment seguit per Tarui et al. (1972), obtenint-se una purificació de l'ordre de 1000 vegades en ambdós enzims.

**Taula 1.-** Aïllament de fosfofructoquinasa 1 i fosfofructoquinasa 2 d'hematies de gall.

	volum (ml)	U/ml	proteïna (mg/ml)	U/g prot.	activitat total (U)	rendiment (%)	purificació
HEMOLITZAT	2400		132				
PFK-1		0.05		0.4	102	100	1
PFK-2		0.012		0.09	24	100	1
SEPHADEX G-150							
PFK-1	20	2.51	0.642	391	50	49	978
PFK-2	26	0.45	0.463	98	11	47	1053

## Resultats i discussió

### 1.- Nivells de F-2,6-P<sub>2</sub> i de G-1,6-P<sub>2</sub>, i dels enzims implicats en llur síntesi.

Tal com s'observa en la taula 2, a diferència dels eritròcits de mamífer que no contenen F-2,6-P<sub>2</sub> (Hers et al. 1982), els eritròcits de gall poseeixen aquest metabòlit a una concentració semblant a la de 2,3-BPG, i lleugerament inferior a la de G-1,6-P<sub>2</sub>.

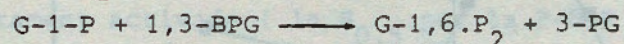
Taula 2.- Nivells de metabòlits difosforilats en hematies de gall. Els valors corresponen a  $\bar{X} \pm S.E.M.$ . El nombre d'animals per grup és de 8.

	pmol.mg proteïna <sup>-1</sup>	nmol.10 <sup>9</sup> cèl <sup>-1</sup>	nmol.ml <sup>-1</sup>
Glucosa 1,6-P <sub>2</sub>	71.16 $\pm$ 20.33	5.37 $\pm$ 1.34	13
Fructosa 2,6-P <sub>2</sub>	17.32 $\pm$ 2.86	1.31 $\pm$ 0.49	3
Glicerat 2,3-P <sub>2</sub>	24.29 $\pm$ 6.67	1.88 $\pm$ 0.49	4.5

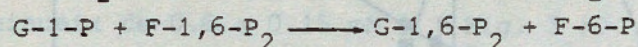
Altres autors ( Isaacks i Harkness 1975, 1980; Isaacks et al. 1976; Bartlett i Borgese 1976; Ruiz-Ruano et al. 1984) han demostrat que mentre la concentració de 2,3-BPG mostra un patró de variació bifàsic al llarg del desenvolupament embrionari de poll, la concentració d'inositol fosfat s'incrementa progressivament, per assolir els valors de l'animal adult als vuit dies del neixement. Els nostres resultats ( Fig. 1 ) demostren per la F-2,6-P<sub>2</sub> i la G-1,6-P<sub>2</sub> un patró semblant al de l'inositol fosfat. Els nivells dels eritròcits embrionaris ( 0.5  $\pm$  0.2 i 0.35  $\pm$  0.1 nmol.10<sup>9</sup> cèl.lules<sup>-1</sup>, de G-1,6-P<sub>2</sub> i F-2,6-P<sub>2</sub> respectivament ) són notablement inferiors als del gall. Augmenten a partir de la desclosa, i arriben als valors de l'adult ( 5.37  $\pm$  1.34 i 1.31  $\pm$  0.49 nmol.10<sup>9</sup> cèl.lules<sup>-1</sup>, de G-1,6-P<sub>2</sub> i F-2,6-P<sub>2</sub> respectivament) a partir del tercer dia.

En els teixits de mamífer s'han descrit quatre activitats enzimàtiques implicades en la síntesi de G-1,6-P<sub>2</sub> ( Climent et al. 1984 ):

a) G-1,6-P<sub>2</sub> sintasa dependent de glicerat 1,3-P<sub>2</sub>,



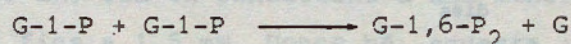
b) G-1,6-P<sub>2</sub> sintasa dependent de F-1,6-P<sub>2</sub>,



c) fosfoglucoquinasa,



d) G-1-P dismutasa,



Semblantment als eritròcits de mamífer ( Accorsi et al. 1982, 1984, 1985 ), solament l'activitat G-1,6-P<sub>2</sub> sintasa dependent de 1,3-BPG és detectable en els eritròcits de gall, llur concentració ( 3 mU/10<sup>9</sup> cèl.lules ) no sembla variar significativament al llarg del desenvolupament embrionari. Tampoc sembla variar significativament al llarg del desenvolupament la concentració ( 175  $\mu$ U/10<sup>9</sup>

cèl.lules ) de l'activitat fosfofructoquinasa 2 (  $F-6-P + ATP \longrightarrow F-2,6-P_2 + ADP$  ) responsable de la síntesi de  $F-2,6-P_2$  ( Claus et al. 1984 ) . Les activitats hexoquinasa, fosfofructoquinasa i piruvatquinasa, que indirectament podrien influir sobre les concentracions dels metabòlits difosforilats, també romanen essencialment constants durant el desenvolupament embrionari. No s'han estudiat encara les possibles variacions de les activitats enzimàtiques implicades en la degradació de la  $F-2,6-P_2$  i de la  $G-1,6-P_2$ .

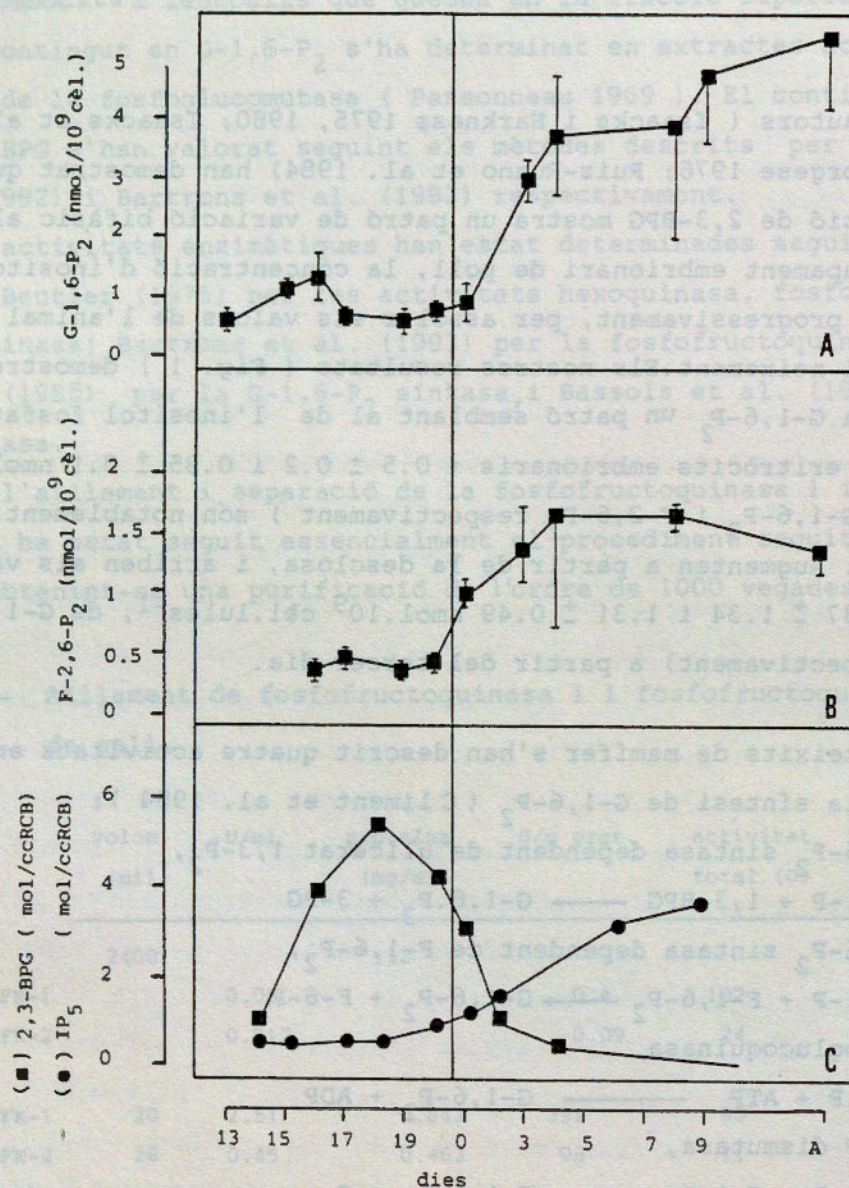


Figura 1.- Variacions dels nivells de metabòlits fosforilats al llarg del desenvolupament embrionari. Els valors corresponen a  $\bar{X} \pm SEM$  en les figures A i B. Figura C: extret de Isaacks et al. (1976).

Les variacions en els nivells de 2,3-BPG i d'inositol fosfat al llarg del desenvolupament han estat explicades ( Ruiz-Ruano et al. 1984 ) en base a l'existència en proporció variable en la sang circulant de diferents poblacions d'eritròcits: una població d'eritròcits primitius originats en el sac vitel·lí, i dos ó més poblacions d'eritròcits definitius originats en el moll d'os ( Chapman i Tobin 1979; Landes et al. 1982 ). Ruiz-Ruano et al. han postulat que els eritròcits embrionaris i els eritròcits definitius, que tenen diferent tipus d'hemoglobina, sintetitzarien predominantment un dels dos compostos fosforilats: 2,3-BPG i inositol fosfat, respectivament. La substitució progressiva dels eritròcits embrionaris pels eritròcits definitius determinaria la disminució dels nivells de 2,3-BPG i l'increment concomitant dels nivells d'inositol fosfat. Els nostres resultats podrien explicarse tot suposant que mentre els eritròcits embrionaris tenen un nivell baix de F-2,6-P<sub>2</sub> i de G-1,6-P<sub>2</sub>, els eritròcits definitius tenen més alta concentració d'ambdós metabòlits.

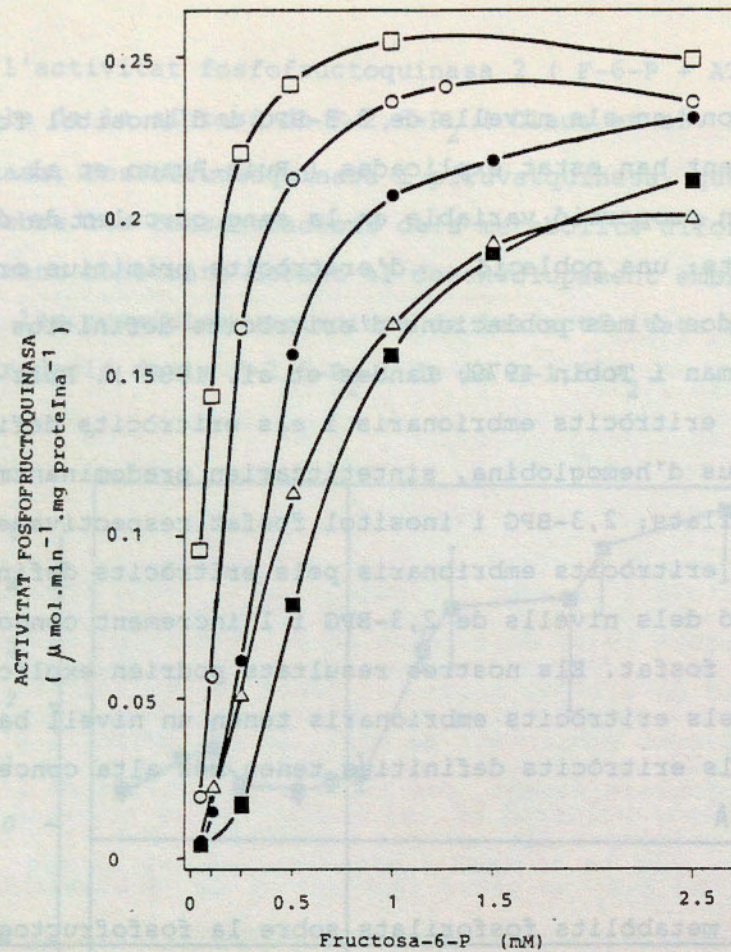
## 2.- Efectes dels metabòlits fosforilats sobre la fosfofructoquinasa.

Per investigar les possibles implicacions metabòliques de la diferent concentració dels compostos fosforilats en les diverses poblacions d'eritròcits, hem estudiat els efectes d'aquests compostos sobre l'activitat de la fosfofructoquinasa (PFK) aïllada d'eritròcits de gall.

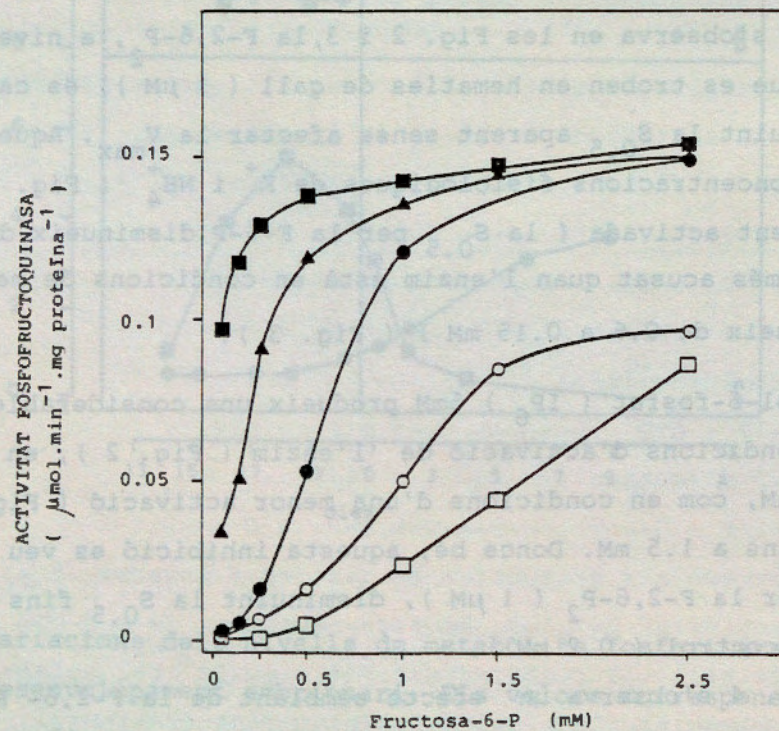
Tal i com s'observa en les Fig. 2 i 3, la F-2,6-P<sub>2</sub>, a nivells fins i tot inferiors als que es troben en hematies de gall ( 1 µM ), és capaç d'estimular la PFK, disminuint la S<sub>0.5</sub> aparent sense afectar la V<sub>max</sub>. Aquest efecte, notable inclús a concentracions fisiològiques de K<sup>+</sup> i NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ( Fig. 2 ) en que la PFK es troba altament activada ( la S<sub>0.5</sub> per la F-6-P disminueix de 0.4 a 0.07 mM ) ( Fig. 2 ) és més acusat quan l'enzim està en condicions de menor estimulació ( la S<sub>0.5</sub> disminueix de 0.6 a 0.15 mM ) ( Fig. 3 ).

L'inositol-6-fosfat ( IP<sub>6</sub> ) 5mM produeix una considerable inhibició de la PFK, tant a condicions d'activació de l'enzim ( Fig. 2 ), en que la S<sub>0.5</sub> augmenta de 0.4 a 0.6 mM, com en condicions d'una menor activació ( Fig. 3 ), en que la S<sub>0.5</sub> augmenta fins a 1.5 mM. Doncs bé, aquesta inhibició es veu en gran manera deslliurada per la F-2,6-P<sub>2</sub> ( 1 µM ), disminuint la S<sub>0.5</sub> fins i tot a valors inferiors als control ( 0.2 mM ).

En la Fig. 4 s'observa un efecte semblant de la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre la inhibició produïda per ATP. Podem assumir que a nivells fisiològics d'ATP ( 1.5 mM ) i en absència de F-2,6-P<sub>2</sub> la PFK es trobaria totalment inhibida.



**Figura 2.-** Efectes dels metabòlits fosforilats sobre l'activitat de la PFK. Mescla d'incubació: Hepes 50 mM, ATP 1.5 mM, KCl 100 mM, NH<sub>4</sub>Cl 1 mM, pH 7.1. (□) F-2,6-P<sub>2</sub> 1 μM, (○) F-2,6-P<sub>2</sub> 1 μM + IP<sub>6</sub> 5 mM, (Δ) 2,3-BPG 5 mM, (■) IP<sub>6</sub> 5 mM, (●) control.



**Figura 3.-** Efectes de la F-2,6-P<sub>2</sub> i l'IP<sub>6</sub> sobre l'activitat PFK. Mescla d'incubació: Hepes 50 mM, ATP 1.5 mM, pH 7.1. (■) F-2,6-P<sub>2</sub> 5 μM, (▲) F-2,6-P<sub>2</sub> 1 μM, (○) IP<sub>6</sub> 1 mM, (□) IP<sub>6</sub> 5 mM, (●) control.

El 2,3-BPG a concentracions fisiològiques en eritròcit de mamífer ( 5 mM ) produeix també una inhibició de la PFK, la qual és inferior però a la produïda per  $IP_6$  ( Fig. 2 ). Ambdós compostos produeixen una disminució de la  $V_{max}$ , encara que solament l' $IP_6$  produeix un increment de la  $S_{0.5}$  aparent.

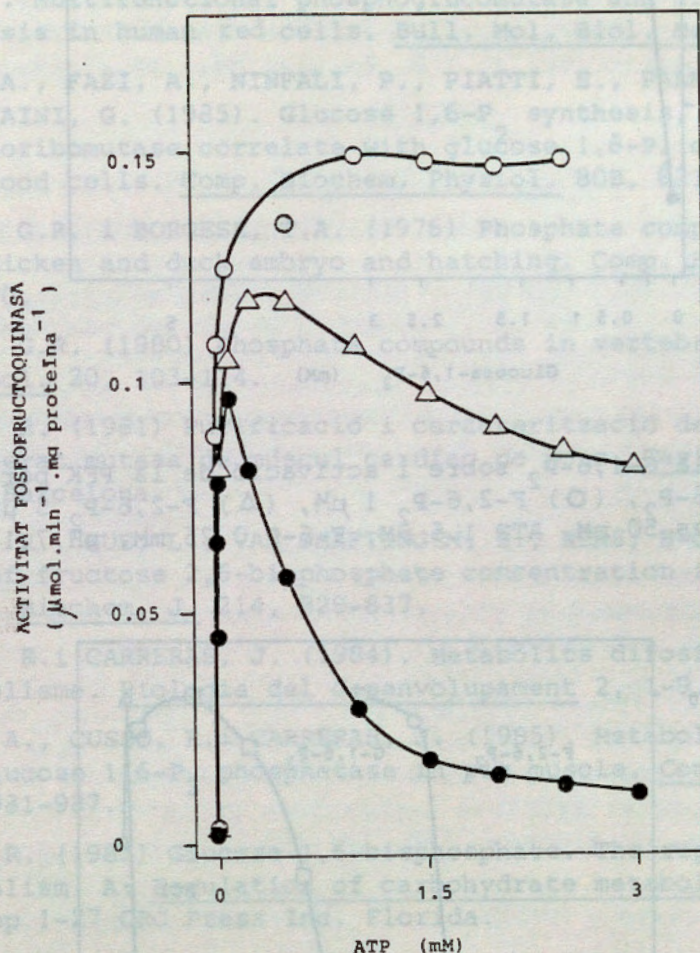


Figura 4.- Efecte de la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre la inhibició de la PFK per ATP. Mescla d'incubació: HEPES 50 mM, F-6-P 0.25 mM, pH 7.1. (○) F-2,6-P<sub>2</sub> 5 μM, (Δ) F-2,6-P<sub>2</sub> 1 μM, (●) sense F-2,6-P<sub>2</sub>.

La G-1,6-P<sub>2</sub> produeix una activació de la PFK, no competitiva respecte l'efecte de la F-2,6-P<sub>2</sub> ( Fig. 5 ). Les  $K_A$  de la G-1,6-P<sub>2</sub> i del  $K^+$  (  $2 \cdot 10^{-5}$  i  $10^{-1}$  M respectivament ) indiquen que si bé aquests compostos són també capaços d'estimular la PFK, ho fan a unes concentracions superiors que la F-2,6-P<sub>2</sub> (  $K_A$   $5 \cdot 10^{-7}$  M ) ( Fig. 6 ).

Es pot doncs concloure que, a concentracions fisiològiques, la F-2,6-P<sub>2</sub> i la G-1,6-P<sub>2</sub> són capaces d'estimular la PFK en els eritròcits de gall. Resta per investigar els efectes sobre l'enzim d'eritròcits embrionaris.

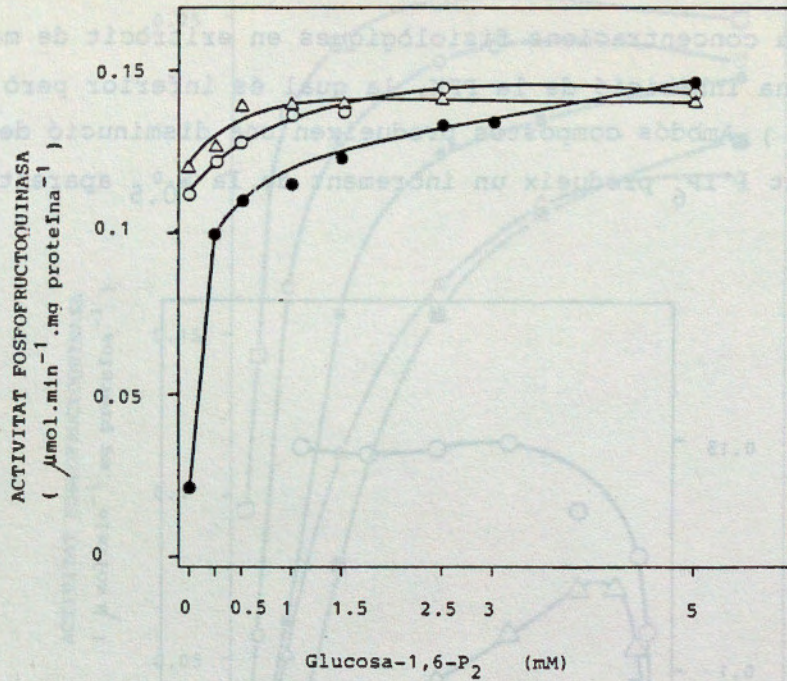


Figura 5.- Efecte de la G-1,6-P<sub>2</sub> sobre l'activació de la PFK per F-2,6-P<sub>2</sub>. (●) sense F-2,6-P<sub>2</sub>, (○) F-2,6-P<sub>2</sub> 1 μM, (Δ) F-2,6-P<sub>2</sub> 5 μM. Mescla d'incubació: Hepes 50 mM, ATP 1.5 mM, F-6-P 0.25 mM, pH 7.1.

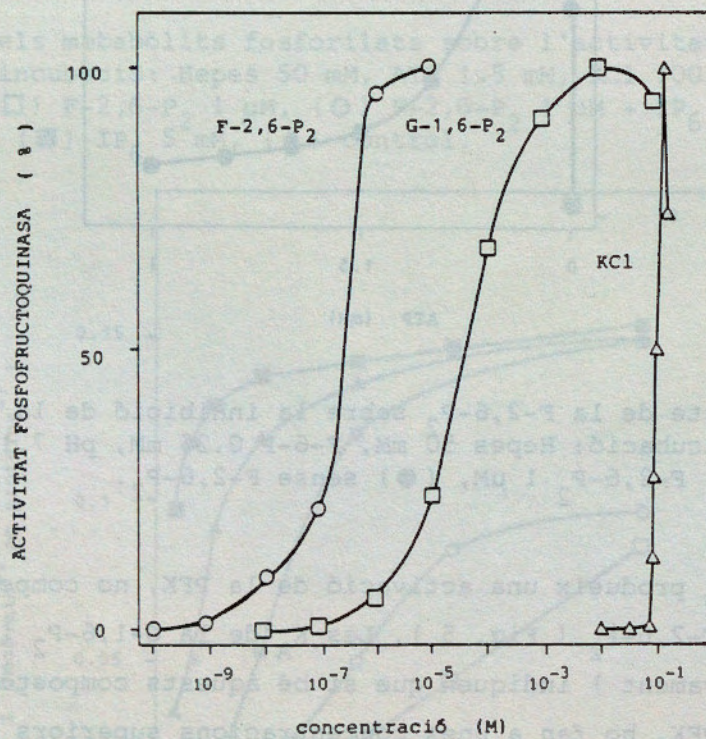


Figura 6.- Estimulació de la PFK per hexoses bisfosfat i per K<sup>+</sup>. Els assajos per F-2,6-P<sub>2</sub> i G-1,6-P<sub>2</sub> han estat duts a terme en presència de Hepes 50 mM ATP 1.5 mM, KCl 100 mM, F-6-P 0.25 mM, pH 7.1. Per l'assaig de l'acció del KCl s'ha utilitzat Hepes 50 mM, ATP 1.5 mM i F-6-P 0.25 mM.

#### Agraïments

Treball realitzat amb Ajuts de la CAICYT, del FIS i de la CIRIT.



Bibliografia

- ACCORSI, A., FAZI, A., PIATTI, E., PALMA, F., BOSSU, M., i FORNAINI, G., (1982). 1,3-DPG is the only phosphoryl donor to glucose 1-phosphate for glucose 1,6-bisphosphate synthesis in human red cells. Bull. Mol. Biol. Med. 7, 85-96.
- ACCORSI, A., FAZI, A., NINFALI, P., PIATTI, E., PALMA, F., i FORNAINI, G., (1984). Multifunctional phosphoglucomutase and glucose 1,6-bisphosphate synthesis in human red cells. Bull. Mol. Biol. Med. 9, 131-145.
- ACCORSI, A., FAZI, A., NINFALI, P., PIATTI, E., PALMA, F., PIACENTINI, M-P., i FORNAINI, G. (1985). Glucose 1,6-P<sub>2</sub> synthesis, phosphoglucomutase and phosphoribomutase correlate with glucose 1,6-P<sub>2</sub> concentration in mammals red blood cells. Comp. Biochem. Physiol. 80B, 831-842.
- BARTLETT, G.R. i BORGESE, T.A. (1976) Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryo and hatching. Comp. Biochem. Physiol. 55A, 207-210.
- BARTLETT, G.R. (1980) Phosphate compounds in vertebrate red blood cells. Am. Zool. 20, 103-114.
- BARTRONS, R. (1981) Purificació i caracterització dels isoenzims de la fosfoglicerat mutasa de múscul cardíac de porc. Tesi doctoral. Fac. Med. Univ. Barcelona.
- BARTRONS, R., HUE, L., VAN SHAFTINGEN, E., HERS, H-G. (1983). Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. Biochem. J. 214, 829-837.
- BARTRONS, R. i CARRERAS, J. (1984). Metabòlits difosforilats i control del metabolisme. Biologia del desenvolupament 2, 1-9.
- BASSOLS, A., CUSSO, R. i CARRERAS, J. (1985). Metabolism of glucose 1,6-P<sub>2</sub>. II. Glucose 1,6-P<sub>2</sub> phosphatase in pig muscle. Comp. Biochem. Physiol. 81B, 981-987.
- BEITNER, R. (1985) Glucose 1,6-bisphosphate. The regulator of carbohydrate metabolism. A: Regulation of carbohydrate metabolism. vol I ( R. Beitner Ed.) pp 1-27 CRC Press Inc. Florida.
- BEUTLER, E. (1975). A: Red cell metabolism. 2nd. Ed. ( Grune and Stratton Ed.) New York.
- BORGESE, T.A. i LAMPERT, L.M. (1975) Duck red cell 2,3-bisphosphoglycerate: Its presence in the embryo and its disappearance in the adult. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 822-827.
- CARRERAS, J. i BARTRONS, R. (1985). Metabolisme del glicerat 2,3-P<sub>2</sub>, de la fructosa 2,6-P<sub>2</sub> i de la glucosa 1,6-P<sub>2</sub> durant l'eritropoiesi de mamífer. Biologia del desenvolupament 3, 267-277.
- CARRERAS, J., BARTRONS, R., CLIMENT, F, i CUSSO, R. (1986) Bisphosphorylated metabolites and molecular pathology. Adv. Clin. Enzymol. en premsa.
- CHAPMAN, B.S. i TOBIN, A.J. (1979). Distribution of developmentally regulated hemoglobins in embryonic erythroid populations. Dev. Biol. 69, 375-387.
- CHIBA, H, i SASAKI, R. (1978). Functions of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. Curr. Top. Cell. Regul. 14, 75-116.

- CLAUS, T.H., EL-MAGRABI, M.R., REGEN, D.M., STEWART, H.B., McGRANE, M., KORENTZ, P.D., NYFELER, F., PILKIS, J. i PILKIS, S.J. (1984). The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. Curr. Top. Cell. Regul. 23, 57-86.
- CLIMENT, F., CARRERAS, M i CARRERAS, J. (1985). Metabolism of glucose 1,6- $P_2$  in pig tissues. Comp. Biochem. Physiol. 81B, 737-742.
- HUE.L.i BARTRONS, R. (1985). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in liver, muscle, and adipose tissue. A: Regulation of Carbohydrate Metabolism. Vol I. ( R. Beitner Ed,) pp 29-44. CRC Press Inc. Florida.
- ISAACKS, R.E. i HARKNESS, D.R. (1975) 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes of chick embryos. Science 189, 393-394.
- ISAACKS, R.E., HARKNESS, D.R., FREMAN, G.A., GOLDMAN, P.H., AILLER, J.L., SUSSMAN, S.A. i ROTH, S. (1976). Studies on avian erythrocyte metabolism. II. Relationship between the major phosphorylated metabolic intermediates and oxygen affinity of whole blood in chick embryos and chicks. Comp. Biochem. Physiol. 53A, 151-156.
- ISAACKS, R.E., i HARKNESS, D.R. (1980). Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin function in birds, reptiles and fishes. Am. Zool. 20, 103-114.
- LANDES, G.M., VILLEPONTEAU, B., PRIBYL, T.M. i MARTINSON, H.G. (1982). Hemoglobin switching in chickens. J. Biol. Chem. 257, 11008-11014.
- PASSONNEAU, J.V., LOWRY, D.H., SCHULTZ, D.W., BROWN, J.G. (1969). Glucose 1,6-diphosphate formation by phosphoglucomutase in mammalian tissues. J. Biol. Chem. 244, 902-909.
- TARUI, S., KONO, N. i UYEDA, K. (1972) Purification and properties of rabbit erythrocyte phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 247, 1138-1145.
- VAN SCHAFTINGEN, E., LEDERER, B., BARTRONS, R. i HERS, H-G. (1982). A kinetic study of pyrophosphate: Fructose 6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Eur. J. Biochem. 129, 191-195.