

Artículo publicado en la revista *Journal of Biosciences*, en Diciembre de 2008:

Meléndez-Hevia, E. & de Paz-Lugo, P. (2008) Branch-point stoichiometry can generate weak links in metabolism: the case of glycine biosynthesis. *Journal of Biosciences*, vol. 33(5), pp. 771-780.

*Versión en español del original en inglés, traducido por los autores.*

## La estequiometría de las reacciones de ramificación puede generar puntos débiles en el metabolismo: el caso de la síntesis de glicina

ENRIQUE MELÉNDEZ-HEVIA\* y PATRICIA DE PAZ-LUGO

*Instituto del Metabolismo Celular, Tenerife*

\* *Correspondencia:* Prof. Enrique Meléndez-Hevia, Instituto del Metabolismo Celular, Carretera Vecinal de El Sauzal, nº 160 A, El Sauzal, 38360 Tenerife, Islas Canarias, España.

A pesar de que el metabolismo permite la conversión entre casi cualquier par de metabolitos, existen ciertos puntos de la red metabólica en los que se pierde esta versatilidad debido a restricciones químicas (cinéticas, termodinámicas y estequiométricas) que limitan seriamente determinadas transformaciones. Llamamos a estos sitios *puntos débiles del metabolismo*, pues pueden interferir negativamente en el flujo de materia y energía si la red metabólica no posee los recursos adecuados para evitarlo. Uno de los puntos débiles más críticos tiene lugar en la ruta de síntesis de glicina, debido a la estequiometría de la reacción catalizada por la enzima glicina hidroximetiltransferasa (GHMT) (EC 2.1.2.1), que cataliza la conversión de una molécula de serina en una de glicina y un fragmento  $C_1$ , haciendo que el flujo de producción de glicina dependa inevitablemente de la utilización de unidades  $C_1$  en otras rutas metabólicas que no operan en coordinación con la utilización de glicina. Por lo tanto, no se puede asegurar que se sintetice siempre suficiente cantidad de glicina como para satisfacer las necesidades metabólicas óptimas.

---

### I. Introducción

A pesar de que en el siglo XX se ha producido un gran progreso en nuestro conocimiento sobre la nutrición, aún hay algunas preguntas importantes sin responder (Baker, 2005). Una de ellas es cómo se distribuye la glicina entre la síntesis de colágeno y otras funciones metabólicas cuando su cantidad en la dieta es deficiente. En este artículo demostramos que esta cuestión es un aspecto del problema de la síntesis de glicina.

Las redes metabólicas son muy versátiles, y proporcionan muchas posibilidades diferentes

para interconvertir metabolitos. Sin embargo, aunque prácticamente todos los metabolitos están conectados por cadenas de reacciones catalizadas enzimáticamente, existen ciertas restricciones que hacen que no sea posible convertir un metabolito en cualquier otro. Incluso conversiones que aparentemente parecen posibles, pueden estar limitadas por restricciones termodinámicas y cinéticas (Heinrich *et al.*, 1997), o por la estequiometría de la ruta (Nuño *et al.*, 1997). Hoy en día se hace necesario estudiar sistemas completos para lograr comprenderlos en su conjunto, en lugar de estudiar pequeñas partes de ellos, tal y co-

mo lo pone de manifiesto el creciente interés de la *Biología de Sistemas* (Boogerd *et al.*, 2007).

En el metabolismo existen dos tipos de ramificaciones, como puede verse en la Figura 1: el más común tiene lugar sobre metabolitos libres, tales como el acetil-CoA, el piruvato, etc., que pueden ser transferidos independientemente a cada una de las ramas conectadas por el punto de ramificación en la proporción en la que sean necesarios. En estos casos, los flujos en las diferentes ramas pueden adaptarse a las necesidades metabólicas—por ejemplo por retroinhibición o mediante regulación hormonal o genética—para hacer que el flujo de cada rama responda a la demanda del producto final (Hofmeyr & Cornish-Bowden, 2000). Las características de las rutas metabólicas con puntos de ramificación de este tipo se han estudiado ampliamente y se conocen bien sus principales propiedades cinéticas (Small & Kacser, 1993).

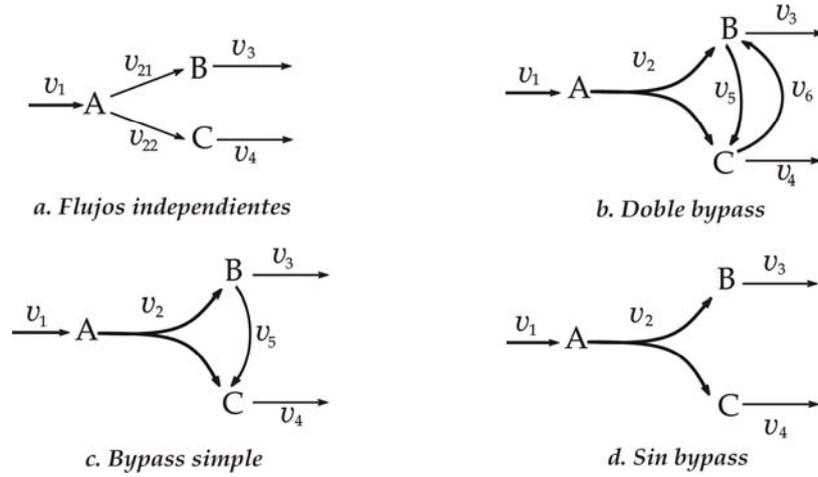
En el segundo tipo están los puntos de ramificación producidos por reacciones catalizadas enzimáticamente que conectan diferentes productos y sustratos. En estos casos la situación es más compleja; en los esquemas (b), (c) y (d) de la figura 1, los productos *B* y *C* no provienen de reacciones enzimáticas diferentes, sino de una misma enzima, que cataliza una reacción de escisión o sustitución; en estos casos, la estequiometría de la reacción impone que los sustratos y los productos reaccionen en proporciones definidas para cumplir la ley de la conservación de la masa. Esto puede crear un conflicto de intereses entre las diferentes rutas que convergen o divergen de la reacción, si los flujos necesarios de cada rama para utilizar los productos o proporcionar los sustratos no se corresponden con las restricciones estequiométricas.

Los puntos de ramificación de las enzimas se han estudiado menos que los puntos de ramificación de los metabolitos, y en este artículo demostramos que pueden generar fuertes limitaciones metabólicas, que pueden tener severas repercusiones para la salud del organismo si la red metabólica no tiene recursos para compensarlas. En la ruta de síntesis de glicina hay una restricción de este tipo en la reacción reversible catalizada por la enzima glicina hydroxymethyltransferasa (GHMT) (EC 2.1.2.1) que usa el tetrahidrofolato (THF) como coenzima: *L*-serina + THF  $\rightleftharpoons$  5,10-metilén-THF + glicina + H<sub>2</sub>O

Como mostraremos a continuación, la estequiometría de esta reacción limita seriamente la capacidad de síntesis de glicina para responder a las demandas del metabolismo, haciendo que sea menor de lo que necesita el ser humano o un animal de gran tamaño. Esto podría explicar por qué, aunque la glicina se ha considerado como aminoácido no esencial, porque puede ser sintetizada por el metabolismo humano, existen evidencias de que el metabolismo no puede fabricarla en suficiente cantidad (Jackson, 1991). En efecto, ciertos problemas de salud se han relacionado con una deficiencia de glicina, y varios estudios clínicos y nutricionales han demostrado que la glicina debería considerarse un aminoácido condicionalmente esencial (Jackson, 1991; Jackson *et al.*, 1996; de Koning *et al.*, 1998; Matilla *et al.*, 2002; de Koning *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2005).

## 2. Consecuencias metabólicas de los diferentes diseños de puntos de ramificación: posibilidades de aparición de *puntos débiles* en el metabolismo

La Figura 1 muestra todas las vías posibles mediante las que un sustrato *A* puede ser convertido en dos productos *B* y *C*, y la Figura 2 ilustra la forma en que éstos pueden estar incluidos en una ruta metabólica. El sistema independiente del flujo (Figura 1a) es un punto de bifurcación típico en el que tres flujos  $v_1$ ,  $v_3$  y  $v_4$  están conectados por el metabolito común *A*. Se trata de una típica encrucijada metabólica donde cada una de las rutas conectadas se puede regular independientemente de acuerdo con la demanda de su producto final. Por el contrario, en los otros tres diseños, los tres flujos  $v_1$ ,  $v_3$  y  $v_4$  están conectados por la enzima que cataliza  $v_2$ , y en cada uno de ellos el flujo de *A* para producir *B* + *C* es el mismo, así que no hay libertad para producir cantidades independientes de *B* y *C*. Sin embargo, hay algunas diferencias importantes entre estos tres últimos casos. En el diseño de doble bypass (Figura 1b), los flujos  $v_5$  y  $v_6$  (que pueden considerarse una única reacción reversible) permiten la libre conversión entre *B* y *C*, como, por ejemplo, la interconversión de gliceraldehído3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato, los productos de la escisión de la fructosa 1,6-bisfosfato catalizada por la aldolasa en la glicolisis. En el diseño de bypass simple (Figura 1c), la conversión de *B* en *C* es posible, a la velocidad  $v_5$ , pero no existe una ruta para la conversión inversa de *C* en *B*. Esto ocurre en la biosíntesis de glicina, donde los productos de la reacción catalizada por la GHMT se pueden distribuir



**Figura 1.** Tipos de puntos de ramificación en el metabolismo. **(a)** Punto de ramificación en el metabolito *A*, con dos reacciones hacia *B* y *C* que pueden ser reguladas independientemente; **(b, c, d)** punto de ramificación en una reacción catalizada enzimáticamente que necesita que se produzcan *B* y *C* en cantidades equimoleculares vía  $v_2$ ; **(b)** reacción de bypass de doble sentido que permite la interconversión de *B* y *C* en los dos sentidos; **(c)** reacción de bypass en un solo sentido que permite que *B* se transforme en *C*, pero no lo contrario; **(d)** sin bypass, es decir, sin posibilidad de interconversión de los productos.

por el sistema de escisión de glicina (GCS), aunque sólo en el sentido  $\text{gly} \rightarrow \text{C}_1$ , como se discute más abajo. El diseño sin bypass (Figura 1d) es el extremo opuesto al del diseño independiente del flujo, sin ninguna posibilidad para interconvertir *B* en *C*. A continuación analizamos las restricciones estequiométricas impuestas por cada uno de los diseños de puntos de ramificación. Los flujos implicados en todas estas conversiones, expresados como cambios en la concentración de metabolitos, se pueden formular en forma de ecuaciones diferenciales, que se convierten en ecuaciones algebraicas al introducir la condición de estado estacionario.

### 2.1. Flujos independientes

En el caso de la Figura 1a, cuando el sistema está en estado estacionario, el conjunto de ecuaciones diferenciales se transforma en un conjunto de ecuaciones algebraicas, igualando cada expresión a cero:

$$\frac{dA}{dt} = v_1 - v_{21} - v_{22} = 0$$

$$\frac{dB}{dt} = v_{21} - v_3 = 0$$

$$\frac{dC}{dt} = v_{22} - v_4 = 0$$

En estado estacionario  $dA/dt = dB/dt = dC/dt = 0$ ; por tanto:

$$v_1 = v_{21} + v_{22}; \quad v_{21} = v_3; \quad v_{22} = v_4$$

Como no existe restricción para los valores de  $v_3$  y  $v_4$  (ni para  $v_{21}$  y  $v_{22}$ ) más que la relación estequiométrica  $v_1 = v_{21} + v_{22}$ , cualquiera de ellos pueden tomar cualquier valor hasta  $v_1$ .

### 2.2. Bypass simple

Consideremos el caso del bypass simple (Figura 1c) en detalle, que es el de la biosíntesis de glicina. A continuación presentaremos sólo un análisis resumido para los casos de ramificación con un bypass doble o sin bypass. Si existe una reacción de bypass desde *B* hacia *C*, pero no desde *C* hacia *B*, el conjunto de ecuaciones en el estado estacionario queda como sigue:

$$\frac{dA}{dt} = v_1 - v_2 = 0; \quad v_1 = v_2 \tag{1}$$

$$\frac{dB}{dt} = v_2 - v_3 - v_5 = 0; \quad v_3 = v_2 - v_5 \tag{2}$$

$$\frac{dC}{dt} = v_2 + v_5 - v_4 = 0; \quad v_4 = v_2 + v_5 \tag{3}$$

Puesto que en el estado estacionario ( $dA/dt = dB/dt = dC/dt = 0$ ), la ausencia de bypass en un

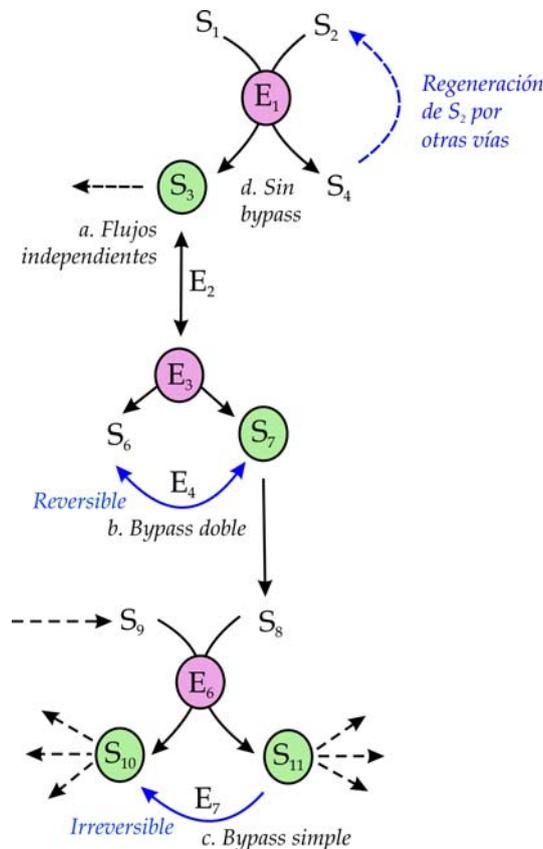


Figura 2. Diferentes tipos de puntos de ramificación en una ruta metabólica. Los nodos sombreados en verde representan los puntos de ramificación en metabolitos (caso (a) de la Figura 1). Los nodos dibujados en rosa representan los puntos de ramificación en reacciones catalizadas por enzimas, que son de tres tipos (nombrados como en la Figura 1b). El punto de bifurcación en E<sub>3</sub> produce dos metabolitos S<sub>6</sub> y S<sub>7</sub> que son libremente interconvertibles. El punto de ramificación E<sub>6</sub> es un bypass simple (c), que produce dos metabolitos S<sub>10</sub> y S<sub>11</sub> en cantidades equimoleculares, y el bypass irreversible permite que S<sub>11</sub> se transforme en S<sub>10</sub>, pero no lo contrario. Este caso se corresponde con la síntesis de glicina (que sería S<sub>11</sub>) y unidades C<sub>1</sub> unidas a tetrahydrofolato (S<sub>10</sub>). El punto de ramificación en E<sub>1</sub> (d) produce dos metabolitos S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub> que no son interconvertibles, pero la regeneración del sustrato S<sub>2</sub> mediante rutas que consumen S<sub>4</sub> permite que se mantenga la producción de S<sub>3</sub>.

sentido impone ciertas restricciones. Sustituyendo  $v_2$  en las ecuaciones (2) y (3) obtenemos:

$$v_3 = v_4 - 2 \cdot v_5 \quad (4)$$

o, de forma similar:

$$v_4 = v_3 + 2 \cdot v_5 \quad (5)$$

Como todos los flujos deben ser positivos (o cero), la ecuación (4) implica que  $v_4$  no puede ser menor que  $2v_5$ , y  $v_3$  no puede ser mayor que  $v_4$ , ya que el límite superior de  $v_3$  (así como de  $v_2$ , a partir de la ecuación 3) se alcanza cuando  $v_5 = 0$ , mientras que la ecuación (5) permite que  $v_4$  sea

mayor que  $v_3$ . Así,  $v_3 \leq v_1$ , mientras que  $2v_1 \geq v_4 \geq v_1$ . Por tanto,  $v_3$  nunca podrá ser superior a  $v_4$ , y, muy importante,  $v_2$  (biosíntesis de glicina) no puede ser mayor que  $v_4$  (consumo de unidades C<sub>1</sub>). Esta restricción puede tener consecuencias metabólicas muy trascendentales, pues significa que la velocidad de síntesis del intermediario B ( $v_2$ ), no puede superar el flujo de consumo de C ( $v_4$ ); si la demanda de B llegase a ser mucho mayor que la de C, habría una escasez de B y un fallo en la regulación normal del metabolismo, provocando la ausencia de precursores o una perturbación en la dinámica de la red metabólica. Este tipo de diseño puede conducir a un *punto débil en el me-*

*tabolismo*, que es lo que ocurre en el caso de la biosíntesis de glicina.

### 2.3. Bypass doble

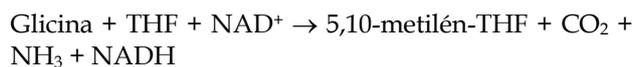
Cuando el bypass entre los productos tiene lugar en los dos sentidos (Figura 1b), el análisis es similar, excepto que ahora las expresiones para  $v_3$  y  $v_4$  también dependen de  $v_6$ . Dado que no hay ninguna restricción en los valores relativos de  $v_5$  y  $v_6$ , más que aquellas impuestas por la termodinámica, éstas pueden tomar cualquier valor menor o igual a  $v_2$ , y desaparece la restricción del caso del bypass simple. Aquí existe libertad total en la conversión de  $A$  en  $B$  o  $C$ , tal y como ocurre con el diseño de flujos independientes. Los flujos están estequiométricamente relacionados mediante  $v_3 + v_4 = 2v_1$ ; uno de los flujos de salida puede ser cero, lo que nos daría  $v_3 = 2v_1$ , o  $v_4 = 2v_1$ . Un ejemplo de este diseño es la combinación de la aldolasa y la triosa-fosfato isomerasa en la glicólisis.

### 2.4. Ausencia de bypass

Cuando no existe una reacción de bypass (Figura 1d) el conjunto de ecuaciones se puede deducir de las ecuaciones del diseño de bypass simple omitiendo  $v_5$ , y la conclusión es que no existe libertad para la interconversión entre los dos productos, pues la estequiometría de la reacción  $v_2$  impone el cociente 1:1 de estos flujos. Hay muchos casos como éste en el metabolismo, por ejemplo, la mayoría de enzimas descarboxilantes, quinasas, etc. Como casos específicos podemos recordar la reacción de la arginasa que convierte la arginina en ornitina y urea, y, en el sentido opuesto, la condensación de acetyl-CoA con oxalacetato que da citril-CoA. Sin embargo, aunque este diseño es abundante en el metabolismo, normalmente no causa ningún problema con los flujos de las rutas, dado que al menos uno de los productos resultantes de la bifurcación (por ejemplo, el ATP o el acetyl-CoA) puede ser producido o consumido en otras reacciones. Por supuesto, pueden existir puntos débiles del metabolismo producidos por una ausencia de bypass, pero se necesitarán futuras investigaciones para identificarlos; en cualquier caso, para ello es fundamental considerar la red metabólica como un todo.

## 3. Diseño de bypass simple y restricción en la biosíntesis de glicina

La biosíntesis de glicina es un buen ejemplo del diseño de bypass simple, e ilustra las restricciones metabólicas que éste impone, llegando a suponer un punto débil en el metabolismo. La glicina es sintetizada por la enzima glicina hidroximetiltransferasa (GHMT), con la eliminación de una unidad  $C_1$  del C-3 de la serina (reacción 3 en la figura 3); se trata de una reacción muy compleja, descrita en detalle por Schirch y Szebenyi (2005). En células de mamíferos esta reacción ocurre en el citoplasma y en las mitocondrias, pero esta compartimentación no afecta a la limitación de glicina, dado que la restricción estequiométrica se cumple en todos los casos, de forma que, si la compartimentación produjese algún efecto, sería para agravar el problema al imponer más restricciones. En efecto, varias líneas de investigación han mostrado que la incapacidad de las mitocondrias para producir glicina da lugar a células auxotróficas para este aminoácido, a pesar de la presencia de la enzima GHMT en el citoplasma. En la figura 3 se muestran las rutas implicadas en la biosíntesis de glicina, y en su utilización para diferentes procesos metabólicos. La parte central de este esquema se muestra con más detalle en la Figura 4, con los flujos denotados de  $v_1$  a  $v_5$  al igual que en la sección 2.2 y en la figura 1c. Además, en la figura 4 está señalado explícitamente un punto que sólo está implícito en la figura 3: que el sistema de escisión de glicina (GCS) consume THF como co-sustrato; pero como la molécula de glicina deriva totalmente de serina esto no afecta a las relaciones descritas en la sección 2.2, así que la restricción en la biosíntesis de glicina está representada con precisión en el esquema de la figura 1c. En el metabolismo de la glicina existe una reacción de bypass, proporcionada por el sistema de escisión de glicina, un complejo multienzimático formado por la glicina deshidrogenasa (descarboxilante) (EC 1.4.4.2), la oaminometiltransferasa (EC 2.1.2.10) y la dihidrolipoil deshidrogenasa (EC 1.8.1.4). Este sistema cataliza la reacción 11 de la Figura 3:



Sin embargo, esta reacción no trabaja como bypass en ambos sentidos, porque la liberación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  la hace termodinámicamente irreversible *in vivo* (Xue *et al.*, 1999). Por tanto, no puede ser una fuente de glicina, sino una fuente de una unidad  $C_1$  mediante la degradación de glicina (Xue *et al.*, 1999; Lamers *et al.*,

2007). Este diseño metabólico conduce a un grave problema estequiométrico, porque la unidad C<sub>1</sub> debe ser liberada del THF-C<sub>1</sub> para que el THF pueda ser utilizado de nuevo en la reacción como transportador. La descarga de C<sub>1</sub> se produce en varios procesos, tales como la biosíntesis de purinas y timina, o la transferencia de un

grupo metilo a la adenosil-metionina, coenzima en la mayoría de reacciones de transferencia de metilos (Christensen & MacKenzie, 2006). Como hemos mostrado, este diseño no puede producir glicina o THF-C<sub>1</sub> independientemente, pues está obligado a dar los dos estequioméricamente; no hay, pues, posibilidad de variar los flujos en las dos ramas independiente-

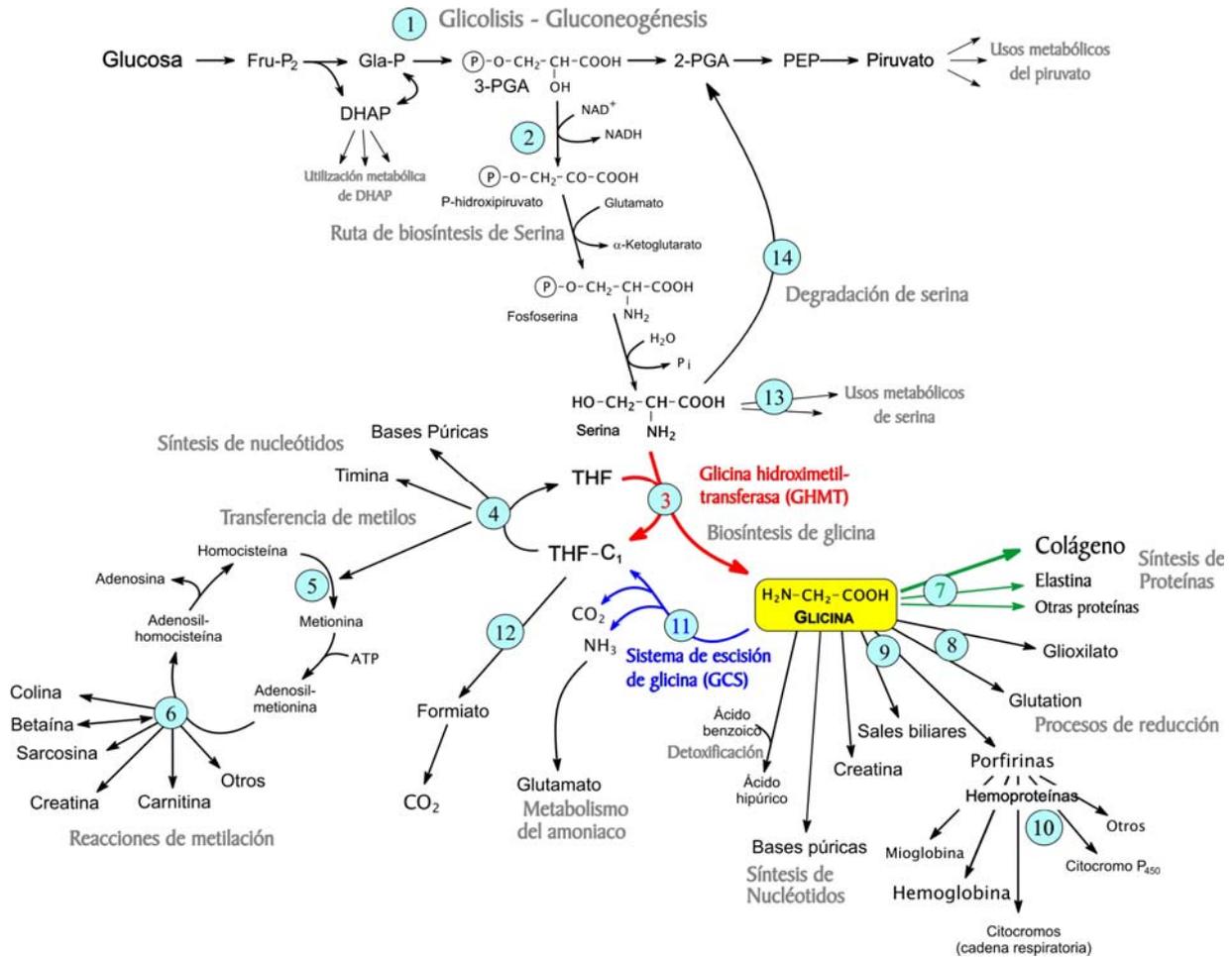


Figura 3. Rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de glicina a partir de serina, y su utilización en diferentes aplicaciones metabólicas. Rutas: 1, sistema glicolisis-gluconeogénesis; 2, rama para la síntesis de serina y glicina; 3, reacción de la glicina hidroximetiltransferasa (GHMT) (EC 2.1.2.1) (en rojo), que convierte serina en glicina con la transferencia de una unidad C<sub>1</sub> al tetrahidrofolato (THF); 4-6, conjunto de reacciones de transferencia de C<sub>1</sub>, necesarias para la síntesis de glicina, ya que descargan la unidad C<sub>1</sub> del THF, regenerando el THF libre de manera que éste puede participar de nuevo en la reacción 3; 7-10, procesos de biosíntesis en los que interviene la glicina, especialmente la síntesis de colágeno y otras proteínas (reacciones 7, mostradas en verde); 11, reacción irreversible del sistema de escisión de glicina (EC 1.4.4.2) (mostrada en azul), que convierte glicina en una unidad C<sub>1</sub>; 12, oxidación de la unidad C<sub>1</sub> a formiato y CO<sub>2</sub>, que funciona como un sumidero de unidades C<sub>1</sub>, permitiendo que aumente la capacidad de síntesis de glicina; 13, conjunto de reacciones que utilizan serina para otros procesos, como por ejemplo la síntesis de colina; 14, rutas para la degradación de serina. Símbolos: DHAP; dihidroxiacetona-fosfato; Fru-P<sub>2</sub>, fructosa 1,6-bisfosfato; Gla-P, gliceraldehído 3-fosfato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato. THF-C<sub>1</sub>, 5,10-metilén-THF. Véase también la Figura 4.

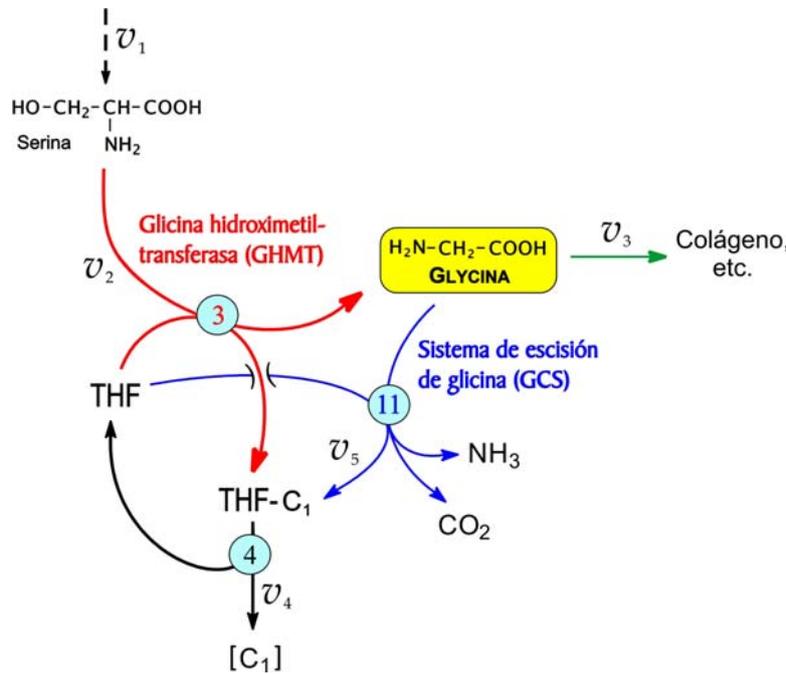


Figura 4. Detalle de la ruta de producción metabólica de glicina a partir de serina. Parte central de la Figura 3 con los flujos denominados con los símbolos utilizados en la Figura 1(c), mostrando explícitamente que el THF es un co-sustrato con la glicina en la reacción 11, el sistema de escisión de glicina (GCS). Sin embargo, como la molécula de glicina deriva completamente de serina, esta adición no afecta a la relación entre los flujos discutida en la sección 2.2. En particular, sigue siendo cierto que  $v_3$  no puede ser mayor que  $v_4$ , y que  $v_2$  (biosíntesis de glicina) no puede ser mayor que  $v_4$  (consumo de unidades  $C_1$ ).

mente, de acuerdo con la demanda de sus productos (véase un análisis de estos casos en Hofmeyr & Cornish-Bowden, 2000). Por tanto, la reacción de biosíntesis de glicina a partir de serina no es un punto de bifurcación, sino una *rotura con estequiometría fija*. Por tanto, el flujo de transferencia de unidades  $C_1$  debe funcionar acoplado al flujo de utilización de glicina para evitar un colapso en el metabolismo de la glicina. Existen otras vías para sintetizar glicina, por ejemplo a partir de colina (vía sarcosina), en la degradación de treonina, en la síntesis de carnitina, y por transaminación de glioxilato, que puede proceder de diferentes fuentes. Sin embargo, la biosíntesis de glicina con la enzima GHMT es con mucho el proceso más importante, así que considerarla como la única fuente significativa de glicina no nos lleva a errores importantes. Podemos expresar esta restricción estequiométrica mediante la siguiente proposición, que denomina-

mos la **restricción (o teorema) de la síntesis de glicina**, de la forma siguiente:

*Si la única ruta metabólica significativa para la síntesis de glicina es la reacción de la GHMT el flujo metabólico de producción neta de glicina en estado estacionario no puede, bajo ninguna condición, exceder el flujo de consumo de unidades  $C_1$  transferidas por el THF.*

El bypass facilitado por el sistema de escisión de glicina acentúa la restricción en vez de proporcionar una vía para sortearla, como se demuestra para el caso de un bypass simple analizado más arriba. Como la estequiometría requiere que la glicina sea producida a partir de serina con producción equimolecular de THF- $C_1$ , esta proporción no se puede modificar bajo ninguna condición cinética; y, aunque es más sencillo analizar el comportamiento en el estado estacionario, la restricción de la biosíntesis de glicina también se cumple cuando el metabolismo no está en estado estacionario.

#### 4. Discusión

Del análisis mostrado aquí se deduce que la biosíntesis de glicina, catalizada por la enzima glicina hidroximetiltransferasa (GHMT), depende estequiométricamente del conjunto total de reacciones dependientes de THF-C<sub>1</sub> (reacciones 4-5 y 12 en la Figura 3). Sin embargo, la necesidad fisiológica de unidades C<sub>1</sub> es independiente de la necesidad de glicina (con la excepción de la síntesis de bases púricas y creatina), y por tanto no existe una razón obvia para que el consumo de glicina y unidades C<sub>1</sub> estén íntimamente relacionados. Un consumo elevado de glicina para la biosíntesis de otros productos (reacciones 7-10 de la Figura 3), especialmente colágeno, elastina y otras proteínas (reacciones 7), forzaría una producción igual o superior de unidades C<sub>1</sub> transportadas por el THF. Pero esto no es posible, ya que la producción del intermediario THF-C<sub>1</sub> no depende de la actividad de otras rutas no relacionadas, sino que debe hacerse de acuerdo con la necesidad específica de este metabolito. Como cada una de estas rutas tiene mecanismos específicos de regulación, la biosíntesis de glicina no es posible cuando no hay consumo de unidades C<sub>1</sub>, porque no se regenerará el THF.

Sin embargo, la realidad fisiológica es incluso más complicada de lo que hemos supuesto, dado que no todos los tejidos son idénticos, y dado que los distintos derivados de THF no se intercambian entre los compartimentos celulares a velocidades proporcionales con el metabolismo, por lo que las reservas de THF están hasta cierto punto separadas. En las mitocondrias de células adultas, por ejemplo, las restricciones sugeridas por nuestro análisis pueden llegar a ser muy significativas porque la acumulación de THF debe impedir la producción de glicina. En muchas células no existe el sistema GCS por lo que allí las propiedades del sistema son las del diseño sin bypass (sección 2.4). En muchos de estos casos, estas condiciones no mejoran el problema de la insuficiencia en la producción de glicina sino que lo empeoran notablemente. Por otra parte, como la síntesis de ácidos nucleicos necesita un consumo elevado de THF-C<sub>1</sub> para producir purinas y timina, estos procesos actúan como productores netos de glicina, y la restricción estequiométrica podría ser atenuada en células de crecimiento rápido tales como células embrionarias y cancerosas.

Estas complicaciones hacen difícil un análisis detallado de todos los flujos, pero los problemas creados por la restricción estequiométrica en la reacción de la GHMT permanecen incluso si existe una gran separación entre los procesos de producción y utilización de glicina. Esto es debido a que la restricción afecta a cada molécula de glicina producida en esta reacción, a pesar de cualquier mecanismo de *channelling*, compartimentación, etc. En última instancia, lo que importa es comparar la cantidad total de glicina disponible en el organismo entero con la cantidad total requerida para las funciones metabólicas del organismo completo: si la cantidad de glicina disponible es menor que la cantidad requerida habrá un problema. Incluso si el *channelling* o la compartimentación pudiesen atenuar localmente el problema, sólo podrían hacerlo a expensas de agravarlo en otro lugar. Por tanto, aunque deben tenerse en cuenta estas complicaciones en un análisis completo de los flujos de glicina *in vivo*, no afectan a la tesis principal de este trabajo.

La glicina es especialmente importante en la síntesis de colágeno y elastina, ya que constituye la tercera parte del total de residuos de aminoácidos de las dos proteínas. Además, se utiliza generosamente en el metabolismo como reactivo químico para la síntesis de muchos compuestos, tales como el glutatión, que juega un papel principal en la lucha contra el estrés oxidativo. La glicina también participa en la desintoxicación de ácido benzoico (Jackson, 1991), y actúa como neurotransmisor. Es importante hacer una evaluación detallada de todas las rutas de síntesis de glicina, incluyendo las que son independientes de la serina (no mostradas en la figura 3), y determinar si su capacidad de producir glicina es suficiente para las necesidades metabólicas del organismo. Estos cálculos son complicados debido a la complejidad en el funcionamiento del ciclo del procolágeno (Bienkowski, 1978), y por la reutilización de aminoácidos libres producidos en el recambio de proteínas, pero nuestros cálculos (no mostrados aquí) sugieren un déficit de glicina de 10 g/día o incluso mayores. Estos cálculos exhaustivos caen fuera del ámbito del presente trabajo y serán motivo de una futura publicación.

La existencia de un déficit de glicina está apoyada por evidencias clínicas, ya que en algunas afecciones la síntesis de glicina es insuficiente para satisfacer las demandas metabólicas (Jackson, 1991), además una deficiencia diaria de glicina afecta a la síntesis de glutatión y provoca un aumento en la excreción urinaria de 5-oxoprolina (Gibson *et al.*, 2002; Persaud *et al.*, 1996). El aumento progresivo en la excreción de 5-

oxoprolina en las mujeres embarazadas sugiere que la disponibilidad de glicina llega a ser deficiente a medida que progresa el embarazo, lo que ya había sido advertido por Jackson *et al.*, (1996). Estas observaciones apoyan la idea de que la glicina es un aminoácido 'semiesencial', o 'condicionalmente esencial' en algunas condiciones y sugiere que problemas como la artrosis que están relacionados con los tejidos conectivos, en los que el colágeno y la elastina son componentes mayoritarios, pueden estar debidos en parte a una deficiencia de glicina.

Si la biosíntesis de glicina es un punto débil en el metabolismo, ciertas enfermedades tales como la artrosis deberían encontrarse en la selva, porque la restricción en la biosíntesis de glicina ocurre en todos los animales, y estas enfermedades aumentarían en severidad con el tamaño del animal, de acuerdo con consideraciones alométricas de escalabilidad. De hecho, la artrosis es una de las raras enfermedades que son comunes en la selva: se ha observado en esqueletos de grandes dinosaurios del Jurásico, hace 100-150 millones de años (Rothschild, 1987, 1993); así como en grandes animales actuales, tales como los elefantes (Weissengruber *et al.*, 2006) y rinocerontes (Bonard, 1987; Wallach, 1967). En general, la artrosis se ha encontrado en una gran variedad de mamíferos actuales, tanto salvajes como en cautividad (Greer *et al.*, 1977), y especialmente en grandes simios, tales como chimpancés, gorilas y bonobos (Jurmain, 2000). También se ha encontrado en fósiles de homínidos, incluidos los Neandertales (Straus & Cave, 1957), en el Paleolítico Superior y en fósiles humanos del Neolítico (Ackernicht, 1953), así como en fósiles humanos a partir del Pleistoceno Medio en Atapuerca (España) (Pérez & Martínez, 1989).

La restricción estequiométrica de la reacción de la GHMT no es única en el metabolismo. En muchas otras reacciones se producen dos metabolitos en cantidades equimoleculares sin bypass (en muchos casos no hay bypass en ningún sentido) permitiéndose, sin embargo, la regulación independiente de cada uno de ellos. Entonces, ¿por qué la biosíntesis de glicina ha de ser considerada un grave problema mientras que estos otros casos aparentemente similares no lo son? Desde luego que esto no puede deducirse considerando una única reacción y su vecina inmediata, sino que requiere el examen de toda la red metabólica, de acuerdo con el principio cada vez

más reconocido de que para entender las propiedades de un sistema complejo es necesario estudiar el sistema completo (Kacser, 1987; Cornish-Bowden, 2006; Daran-Lapujade *et al.*, 2007). El problema de la glicina surge no sólo a partir de la reacción de las enzimas GHMT y GCS, sino también por la ausencia de conexiones entre las rutas que consumen glicina y las que consumen unidades  $C_1$  y la ausencia de mecanismos para transferir información entre ambas (véase Cornish-Bowden & Cárdenas, 2001). La mayoría de las reacciones que generan dos productos en cantidades equimoleculares están protegidas mediante mecanismos que aseguran que no se producirá ningún problema: sistemas de bypass, como, por ejemplo, el de la reacción de la triosa-fosfato isomerasa, o bien, que uno de los dos productos se regenera continuamente, como el ADP liberado por una quinasa, que es transformado en ATP por otras rutas de la red, o uno de ellos es excretado, como por ejemplo el  $CO_2$  liberado por descarboxilasas. Se deduce que el principal problema de la síntesis de glicina no es simplemente una consecuencia de la reacción de la enzima GHMT, sino de la ausencia de mecanismos de compensación adecuados en el sistema metabólico completo. Aunque existe un sumidero para las unidades  $C_1$  sobrantes, mediante la producción de  $CO_2$  a partir de formiato (Reacción 12 en la Figura 3), la actividad de este proceso (Case & Benevenga, 1977) parece ser insuficiente para solventar el problema. Además, en principio, el formiato se puede excretar como tal. Este mecanismo permitiría superar un pequeño déficit en la producción de glicina, pero un déficit diario de varios gramos requeriría un nivel de excreción de formiato proporcionalmente alto.

Si el problema de la glicina es tan antiguo como sugerimos, habiendo surgido por primera vez ante la necesidad de producir colágeno con la aparición de los primeros metazoos, otra cuestión que se plantea es por qué la selección natural no ha encontrado una solución. La evolución implica mecanismos de optimización (Meléndez-Hevia, 1993; Cornish-Bowden, 2004) pero es fundamentalmente una combinación de selección natural y oportunismo, tomando materiales y procesos que originalmente se utilizaban para otros propósitos y adaptándolos a nuevos proyectos (Jacob, 1977; Meléndez-Hevia *et al.*, 1996). La incapacidad de la selección natural para prever necesidades futuras puede observarse en el problema de la Rubisco (en la fijación de  $CO_2$  en la fotosíntesis) debido el aumento de la concentración de  $O_2$  atmosférico a lo largo de la evolución (Edwards *et al.*, 2001). La presión selectiva para eliminar la restricción de glicina es probable-

mente baja, dado que no afecta a la supervivencia o la reproducción de la mayoría de individuos. No obstante, esta restricción produce una disminución de la calidad de vida, especialmente en la vejez.

La cuestión de si la glicina es un aminoácido esencial será determinada finalmente sólo mediante hechos, pero los hechos sólo pueden informarnos acerca de casos particulares, mientras que aquí hemos desarrollado un argumento teórico general que puede ser aplicado en cualquier situación.

Uno de los principales objetivos de la Biología de Sistemas es resaltar la necesidad de estudiar los sistemas biológicos como un todo. Una razón para ello es que los sistemas complejos también son sistemas severamente restringidos, por lo que no es correcto tratar de estudiar sus posibilidades de adaptación considerando una única reacción o incluso una ruta, sino que es preciso estudiarlos con una perspectiva global, que nos aleje de una visión reduccionista del mundo orgánico (véase al respecto un ensayo de Michel Morange en este mismo número). El caso del metabolismo de la glicina que presentamos aquí es un buen ejemplo para ilustrar este concepto, y demuestra que en la investigación sobre las mutaciones en redes metabólicas donde haya reacciones de un bypass simple, es de esperar encontrar casos de pleiotropía.

En cuanto al caso particular del metabolismo de la glicina, la restricción estequiométrica que hemos presentado aquí parece ser una razón para considerar a la glicina como un aminoácido condicionalmente esencial, un hecho que varios autores ya habían visto empíricamente (véase, por ejemplo, Jackson, 1991). La restricción estequiométrica en la síntesis de glicina demostrada en este trabajo hace que, aunque el metabolismo humano pueda sintetizar glicina, su capacidad tenga un límite fijo, lo que concuerda con el comentario de Christensen (1982): "el hecho de que un determinado aminoácido pueda ser sintetizado en el metabolismo no significa que sea suficiente para mantener todas las necesidades metabólicas". La carencia de glicina debería considerarse como la principal causa de muchos problemas de salud provocados por un aporte insuficiente de glicina, tales como la artrosis, la osteoporosis, y otros relacionados con una síntesis y renovación insuficiente del colágeno.

## Agradecimientos.

Deseamos agradecer al Prof. Francisco Montero (Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I) por su ayuda en el análisis de los diferentes tipos de puntos de ramificación. Estamos especialmente agradecidos al Dr. Athel Cornish-Bowden y a la Dra. María Luz Cárdenas (Unité de Bioenergetique et Ingenierie de Proteines, CNRS, Marsella) por sus fructíferas discusiones, y su detallada revisión del manuscrito. Este trabajo ha sido financiado por el Programa para la Investigación Científica del Instituto del Metabolismo Celular (IMC), Tenerife (España) Ref. No. IMC-PI-001/2004. Parte de este trabajo se ha presentado en la Tesis Doctoral de PPL en la Universidad de Granada (España).

## Referencias bibliográficas

- Ackernecht, E.H. (1953) Paleopathology. En: *Anthropology Today: an encyclopedic inventory* (Kroeber, A. L., ed). University of Chicago Press, Chicago.
- Baker, D.H. (2005) Comparative nutrition and metabolism: explication of open questions with emphasis on protein and amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**, 17897-17902.
- Bienkowski, R.S., Baum, B.J. & Crystal, R.G. (1978) Fibroblasts degrade newly synthesised collagen within the cell before secretion. *Nature*, **276**, 413-416.
- Bonard, E.C. (1987) The rhinoceros horn syndrome (an unusual form of neuropathy and arthrosis of the feet). *Revue Medicale de la Suisse Romande*, **107**, 855-856.
- Boogerd, F., Bruggeman, F.J., Hofmeyr, J.H.S. & Westerhoff, H.V. (eds) (2007) *Systems Biology: Philosophical Foundations*. Wiley, New York.
- Case, G.L. & Benevenga, N.J. (1977) Significance of formate as an intermediate in the oxidation of the methionine, S-methyl-L-cysteine and sarcosine methyl carbons to CO<sub>2</sub> in the rat. *Journal of Nutrition*, **107**, 1665-1676.
- Christensen, K.E. & MacKenzie, R.E. (2006) Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. *Bioessays*, **28**, 595-605.
- Cornish-Bowden, A. (2004) *The Pursuit of Perfection*. Oxford University Press, Oxford.

- Cornish-Bowden, A. (2006) Putting the systems back into systems biology. *Perspectives in Biology and Medicine*, **49**, 475-489.
- Cornish-Bowden, A. & Cárdenas, M.L. (2001) Information transfer in metabolic pathways: effects of irreversible steps in computer models. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 6616-6624.
- Christensen, H. N. (1982) Interorgan amino acid nutrition. *Physiological Reviews*, **62**, 1193-1233..
- Daran-Lapujade, P., Rossell, S., van Gulik, W.M., Luttkik, M.A.H., de Groot, M.J.L., Sljper, M., Heck, A.J.R., Daran, J.M., de Winde, J.H., Westerhoff, H.V., Pronk, J.T. & Bakker, B.M. (2007) The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proceedings of the National of Academy of Sciences USA*, **104**, 15753-15758.
- de Koning, T.J., Duran, M., Dorland, L., Gookens, R., Van Schaftingen, E., Jaeken, J., Blau, N., Berger, R. & Poll-The, B.T. (1998) Beneficial effects of *L*-serine and glycine in the management of seizures in 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *Annals of Neurology*, **44**, 261-265.
- de Koning, T.J., Snell, K., Duran, M., Berger, R., Poll-The, B.T. & Surtees, R. (2003) *L*-serine in disease and development. *Biochemical Journal*, **371**, 653-661.
- Edwards, G.E., Furbank, R.T., Hatch, M.D. & Osmond, C. B. (2001) What does it take to be C<sub>4</sub>? Lessons from the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Physiology*, **125**, 46-49.
- Fell, D. (1997) *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press, London.
- Gibson, N.R., Jahoor, F., Ware, L. & Jackson, A.A. (2002) Endogenous glycine and tyrosine production is maintained in adults consuming a marginal-protein diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, **75**, 511-518.
- Greer, M., Greer, J.K. & Gillingham, G. (1977) Osteoarthritis in selected wild animals. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences*, **57**, 39-44.
- Heinrich, R., Montero, F., Klipp, E., Waddell, T.G. & Meléndez-Hevia, E. (1997) Theoretical approaches to the evolutionary optimization of glycolysis: thermodynamic and kinetic constraints. *European Journal of Biochemistry*, **243**, 191-201.
- Hofmeyr, J.H.S. & Cornish-Bowden, A. (2000) Regulating the cellular economy of supply and demand. *FEBS Letters*, **476**, 47-51.
- Jacob, F. (1977) Evolution and tinkering. *Science*, **196**, 1161-1166.
- Jackson, A.A. (1991) The glycine story. *European Journal of Clinical Nutrition*, **45**, 59-65.
- Jackson, A.A., Persaud, C., Meakins, T.S. & Bundy, R. (1996) Urinary excretion of 5-*L*-oxoproline (pyroglutamic acid) is increased in normal adults consuming vegetarian or low protein diets. *Journal of Nutrition*, **126**, 2813-2822.
- Jurmain, R. (2000) Degenerative joint disease in African great apes: an evolutionary perspective. *Journal of Human Evolution*, **39**, 185-203.
- Kacser, H. (1987) On parts and wholes in metabolism. En: *The Organization of Cell Metabolism*. (Welch, G.R. & Clegg, J.S., eds) Plenum Press, New York, pp 327-337.
- Lamers, Y., Williamson, J., Gilbert, L.R., Stacpoole, P.W. & Gregory, J. F. 3rd (2007) Glycine turnover and decarboxylation rate quantified in healthy men and women using primed, constant infusions of [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] glycine and [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]leucine. *Journal of Nutrition*, **137**, 2647-2652.
- Lewis, R.M., Godfrey, K.M., Jackson, A.A., Cameron I.T. & Hanson, M. A. (2005) Low serine hydroxymethyltransferase activity in the human placenta has important implications for fetal glycine supply. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 1594-1598.
- Matilla, B., Mauriz, J.L., Culebras, J.M., González-Gallego, J. & González, P. (2002) Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient. *Nutrición Hospitalaria*, **17**, 2-9.
- Meléndez-Hevia, E. (1993) *La Evolución del Metabolismo: hacia la Simplicidad*. Eudema, Madrid.
- Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G. & Cascante, M. (1996) The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution. *Journal of Molecular Evolution* **43**, 293-303.
- Nuño, J.C., Sánchez-Valdenebro, I., Pérez-Iratxeta, C., Meléndez-Hevia, E. & Montero, F. (1997) Network organization of cell metabolism: monosaccharide interconversion. *Biochemical Journal* **324**, 103-111.

- Pérez, P.J. & Martínez, I. (1989) Evidence of temporomandibular arthrosis in the Middle Pleistocene human fossils from Atapuerca/Ibeas (Spain). *Journal of Paleopathology*, **3**, 15-18.
- Persaud, C., Forrester, T. & Jackson, A.A. (1996) Urinary excretion of 5-L-oxoproline (pyroglutamic acid) is increased during recovery from severe childhood malnutrition and responds to supplemental glycine. *Journal of Nutrition*, **126**, 2823-2830.
- Rothschild, B.M. (1987) Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis as reected in the paleontologic record: dinosaurs and early mammals. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **17**, 119-125.
- Rothschild, B.M. & Martin, L. (1993) *Paleopathology: Disease in the Fossil Record*. CRC Press, New York.
- Schirch, V. & Szebenyi, D.M. (2005) Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Current Opinion in Chemical Biology*, **9**, 482-487.
- Small, J.R. & Kacser, H. (1993) Responses of metabolic system to large changes in enzyme activities and effectors. 2. The linear treatment of branched pathways and metabolite concentrations: assessment of the general non-linear case. *European Journal of Biochemistry*, **213**, 625-640.
- Straus, W. & Cave, A.J.E. 1957 Pathology and the posture of Neanderthal man. *Quarterly Review in Biology*, **32**, 348-363.
- Wallach, J.D. (1967) Degenerative arthritis in a black rhinoceros. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **151**, 887-889.
- Weissengruber, G.E., Fuss, F.K., Egger, G., Stanek, G. & Hittmair, K.M., Forstenpointner, G. (2006) The elephant knee joint: morphological and biomechanical considerations. *Journal of Anatomy*, **208**, 59-72.
- Xue, H.H., Sakaguchi, T., Fujie, M., Ogawa, H. & Ichiyama, A. (1999) Flux of the L-serine metabolism in rabbit, human, and dog livers Substantial contributions of both mitochondrial and peroxisomal serine: pyruvate/alanine: glyoxylate aminotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 16028-16033.