

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**EVOLUCIÓ DELS MECANISMES DE CONTROL
DEL METABOLISME DEL GLICOGEN**

DANIEL CIFUENTES BUIRA

Barcelona, maig de 2006

Programa de Doctorat de Biotecnologia
Bienni 2000-2002

Memòria presentada per en DANIEL CIFUENTES BUIRA,
llicenciat en Bioquímica, per optar al grau de Doctor en Bioquímica,
Programa de Doctorat de Biotecnologia, Bienni 2000-2002 de la
Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Joan
Josep Guinovart i Cirera, Catedràtic de Bioquímica i
Biologia Molecular, en el Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona.

L'interessat

Vist-i-plau del Director

Daniel Cifuentes Buirra

Joan J. Guinovart

Barcelona, maig de 2006

Als meus pares

-Adso -va dir Guillem-, resoldre un misteri no és el mateix que fer una deducció de primers principis. I no equival tampoc a arreplegar tot de dades particulars per inferir-ne una llei general. Vol dir més aviat plantar-se de cara a una, o dues, o tres dades particulars que aparentment no tenen res en comú i provar d'imaginar-se si poden ser casos d'una llei general que encara no ha enunciat mai ningú.

Quart dia, vespres.

Umberto Eco, "*El nom de la rosa*"

ABREVIATURES

ATP	Adenosina 5'-trifosfat
ADP	Adenosina 5'-difosfat
AMP	Adenosina 5'-monofosfat
BSA	Albúmina de Serum Boví
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FBS	Serum Fetal Boví
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
GFP	Proteïna Verda Fluorescent. (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GK	Glucoquinasa
GKRP	Proteïna reguladora de la glucoquinasa
G6P	Glucosa 6-fosfat
GLUT	Transportador de glucosa de classe 1
GP	Glicogen fosforilasa
GS	Glicogen sintasa
HsMGS	Glicogen sintasa humana, isoforma muscular
kDa	kiloDaltons
kbp	kiloparells de bases
LGS	Glicogen sintasa, isoforma hepàtica
MGS	Glicogen sintasa, isoforma muscular
G6Pasa	Glucosa 6-fosfatasa
HK1	Hexoquinasa de tipus 1
HK2	Hexoquinasa de tipus 2
ScHxk2	Hexoquinasa de llevat de tipus 2
kDa	Kilo Dalton
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PKA	Proteïna quinasa A
PP1	Proteïna fosfatas de tipus 1
PPR	Proteïna reguladora de la fosfatasa
UDPG	UDP-Glucosa

ÍNDEX

A. PRESENTACIÓ I OBJECTIUS	1
B. INTRODUCCIÓ GENERAL	5
C. RESULTATS	27
CAPÍTOL 1: EVOLUCIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA	31
1.1 INTRODUCCIÓ	31
1.2 RESULTATS	34
1.2.1 Filogènia de la glicogen sintasa.	34
1.2.2 Dominis de les glicogen sintases eucariotes	40
1.2.2.1 Aminoàcids importants per a la catàlisi.	40
1.2.2.2 Clúster d'arginines	42
1.2.2.3 Centres de fosforilació.	46
1.2.3 Impacte dels centres de fosforilació i del clúster d'arginines sobre la translocació nucleocitoplasmàtica de l' <i>HsMGS</i>	52
1.3 DISCUSSIÓ	60
CAPÍTOL 2: EFICIÈNCIA AL·LOSTÈRICA DE LA G6P	67
2.1 INTRODUCCIÓ	67
2.2 RESULTATS	70
2.2.1 Activació al·lostèrica de la glicogen sintasa hepàtica.	70
2.2.1.1 Caracterització de les hexoquinases presents en FTO2B.	70
2.2.1.2 Eficàcia de la G6P.	71
2.2.1.2.1 Unió d'HK1 a la mitocòndria.	72
2.2.1.2.2 Hxk2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
2.2.1.2.3 Sobreexpressió d'HK1 i GK en FTO2B	75
2.2.1.2.4 Activitat específica de HK1 i GK en FTO2B	78
2.2.1.2.5 $M_{0,5}$ de les isoformes de glicogen sintasa respecte a la G6P.	80
2.2.2 Efecte dels nucleòtids d'adenina sobre el metabolisme del glicogen	81
2.2.3 Activació covalent de l'LGS en FTO2B.	84
2.3 DISCUSSIÓ	86
CAPÍTOL 3. CO-EVOLUCIÓ DELS ENZIMS DEL METABOLISME DEL GLICOGEN	95
3.1 INTRODUCCIÓ	95
3.2 RESULTATS	97
3.2.1 Evolució de les Hexoquinases	97

3.2.1.1 Filogènia	97
3.2.1.2 Conservació estructural	99
3.2.1.3 Localització subcel·lular	100
3.2.2 Evolució dels transportadors de glucosa	102
3.2.3 Evolució de la glicogen fosforilasa	105
3.2.4 Co-evolució dels enzims implicats en el metabolisme del glicogen	108
3.2.5 Avaluació de la pressió selectiva en els enzims implicats en el metabolisme del glicogen	111
3.2.6 Contingut de G+C i ús preferent de codons en els gens dels els enzims implicats en el metabolisme del glicogen	115
3.3 DISCUSSIÓ	121
CAPÍTOL 4: ESTUDI DEL METABOLISME DEL GLICOGEN HEPÀTIC EN EMBRIONS DE RATOLÍ.....	131
4.1 INTRODUCCIÓ	131
4.2 RESULTATS	133
4.2.1 Caracterització bioquímica del fetge d'embrió E16 de ratolí.....	133
4.2.1.1 Quantificació de glicogen i G6P.....	133
4.2.1.2 Immunodetecció de GK, HK1 i HK2.	134
4.2.1.3 Identificació de la isoforma de GS expressada en fetge embrionari.....	135
4.2.1.4 Quantificació dels nivells d'expressió de les hexoquinases.	136
4.2.5 Determinació de l'activitat hexoquinasa.....	137
4.2.6 Quantificació de glicogen en embrions i adults dejunats.....	138
4.3 DISCUSSIÓ.....	139
D. DISCUSSIÓ GENERAL.....	147
E. CONCLUSIONS	157
F. MATERIALS I MÈTODES.....	159
G. BIBLIOGRAFIA.....	207
H. APÈNDIX.....	227