



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

Facultat de Química
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**GLICOGEN SINTASA MUSCULAR:
ELEMENTS DE CONTROL DE LA DISTRIBUCIÓ
SUBCEL·LULAR I IDENTIFICACIÓ DE RESIDUS
CRÍTICS PER A LA CATÀLISI**

EMILI CID I ROLDÓS
Barcelona, juliol de 2002

Memòria presentada per EMILI CID I ROLDÓS, llicenciat en Bioquímica, per optar al grau de Doctor en Bioquímica, Programa de Doctorat de Bioquímica i Biologia Molecular, Bienni 1997-1999

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

L'interessat

Vist-i-plau dels Directors

Emili Cid

Joan J. Guinovart

Joan C. Ferrer

Barcelona, juliol de 2002

Als meus pares

Agraïments

A tantes persones! Per començar als meus primers professors. Perque són els educadors els que condueixen la curiositat i la transformen en passió. Al Sr. Teixidor i la Maria Fanés.

Als meus amics antics i nous perque l'amistat només es pot fer créixer o destruir-se. Per formar part de la meva vida, per suportar-me en les hores baixes, per ajudar-me a anar endavant. Per cert, continueu posant-hi molt de la vostra banda!

A l'Anna, per ser tal com ets, per fer-me adonar que la vida és senzilla si un ho vol. A la Sira per estar allà quan et necessitem i no donar res per suposat. A la Mò per la teva generositat, per confiar en mi. Al Juan Vicente perque és impossible desampallegar-se de tu i per no creure en les distàncies ni físiques ni mentals. I a tots els altres: Santi, Mònica T., Sandra B., Daniel, les Creus, Belén, Esther, Jose, Richie, Marta, Núria C., Xavi, Anai s i Xevi, per les estones que hem gaudit junts i les que ens esperen!

Als companys de facultat de Química amb qui vaig descobrir que sempre es pot estudiar més, escriure més petit, beure més cafè i trepitjar més biblioteques: Montse, Xevi, Ismael, Eli, Yolanda, David i Virginia, si ens trobem atureu-me, que la farem petar.

A molts dels professors de la Universitat de Barcelona dels que he après no només matèria.

A la meva estimada classe 9, pel bon rotllo i la distensió. Qui deia que els bioquímics som repelents? Especialment a la Carmina i el Roger F., la Cristina i el Santi. Mariona tu també com no, per ser pura vida.

I arribem a l'inici d'aquesta tesi doctoral, a tot el grup d'enginyeria metabòlica i terapèutica de la diabetis per l'ajuda en aquesta experiència que s'anomena doctorat però que més aviat és un curs de formació vital. Al Dr. Guinovart (Guino, Joan segons el context) per acollir-me en el seu grup i mostrar-me que la ciència és més complexa del que sembla. He pres notes. Al Joan Carles Ferrer (Dr., Dr., Dr.) per tenir en compte no només la feina i repartir capacitat de responsabilització. Si m'agradés el futbol t'escolliria d'entrenador. A la Susanna Baqué perque no conec ningú amb la teva capacitat de treball i a la vegada la facilitat amb que alegres el lloc de feina. A la Mar, (la meva canària catalanòfila) encara que tu no ho sapigues és impossible no estimar-te. Al Jorge per ajudar sempre, sempre. Vigila, que no se n'aprofitin. Al Josep Maria per les converses. Als que ja van volar, Albert per iniciar-me en el món de la investigació, Joan per tenir-ho tot tant clar, a mi les coses em semblen sempre

més grises, Àngela, Mohamed, Cristina G., Raquel, Lourdes, Susana E., Pep i Alicia m'ha agradat molt compartir les hores amb vosaltres.

Al Roger, per acompanyar-me una tarda al laboratori i compartir moltes situacions de forma simbiòtica. A l'Anna, com sempre em rendeixo als teus poders, gràcies per tota l'ajuda rebuda i l'extra de les xerrades a través de les ampolles de PBS. A la Cornèlia, la meva primera alumna interna, ets una joia. A l'Ivet, pels cops de mà i els somriures. Al Daniel, per sorprendre'm amb la última tècnica disponible i la capacitat innovadora i a la Dèlia per calmar els ambients amb la teva sola presència. Al Cristián per portar els aires frescos de l'oceà i el meu reconeixement a l'Antonio per ser capaç de contenir-los tots en els pulmons.

Mentre treballava en aquesta tesi vaig sentir dir dues vegades i per dues persones diferents que a la feina (si es referien a aquesta feina o a totes no ho sabré mai) no es poden fer amics. Tothom pot equivocar-se, tant al parlar com al fer amics, és clar. A la M^a Carmen, per la teva fortalesa que gairabé mai deixa entreveure el que t'amoïna. No només demostres ser una gran persona amb les paraules sino amb els fets. A la Núria, la compis més fidel, realment m'has donat tanta confiança com es pot demanar i he rigut com amb ningú durant aquests 5 anys. A la Cris, tu també... després d'aconseguir desxifrar el teu sentit de l'humor he entés que els quadres contenen molt més del que sembla a primer cop d'ull.

Als companys del Departament pel que s'ha pogut compartir (per què sempre hi ha coses intransferibles?). Especialment la Sandra, la primera i autèntica, per ser un exemple vivent de que sempre es pot anar més enllà. Al Jordi per la serenitat i la mirada escèptica. A la Sara per que les experiències es viuen doble al teu costat. Al Mario per l'alegria de viure i la companyia. Al Josepi, la Cèlia, la Laia, el Carles pel que es va gaudir en harmonia. A la Marisol, la Sílvia, la Meri, la Cristina P., l'Elena, el Carles, la Carmen, el Pau, el Lorenzo, la Susanna S., l'Esther, els Òscars, el Quim, la Sandra P., el Joan B., la Begoña, el Sr. Manolo... i tota la resta. A la gent dels Serveis, especialment a la Dra. (t'has adelantat!) Susanna C., ets la reina. Als de l'Autònoma, el Joan Enric, el Joan Ballester i la Chus, us desitjo el millor.

Finalment a la meva família, als meus pares. Com no acabaria mai d'agrair el que han fet i fan (i de segur faran) per mi, ho resumiré en un gràcies per tot. A la Marta, pel que queda entre l'infinít i el tot. A tu Carolina prefereixo dir-t'ho en directe.

Abreviatures

ADPG: adenildifosfat-glucosa

ADPGPP: adenildifosfat-glucosa pirofosforilasa

AMPC: AMP cíclic

BE: enzim ramificador del glicogen

bp: parells de bases nucleotídiques

BSA: albúmina de sèrum boví

CaM-PK: proteïna quinasa dependentde Ca^{2+} -calmodulina

CK: casèina quinasa

col.: col·laboradors

Da: dalton

DBE: enzim desramificador del glicogen

DMEM: medi de cultiu d'Eagle modificat per Dulbecco

FBS: sèrum fetal boví

G(M)S: glicogen (midó) sintasa

GFP: proteïna verda fluorescent

GGN1: glicogenina-1

GK: glucoquinasa o hexoquinasa IV

GKRP: proteïna reguladora de l'hexoquinasa

Glc 1-P: glucosa 1-fosfat

Glc 6-P: glucosa 6-fosfat

GP: glicogen fosforilasa

GS: glicogen sintasa

GSD: malaltia d'emmagatzematge de glicogen

GSK3: glicogen sintasa quinasa 3

HCA: anàlisi de clusters hidrofòbics

HK: hexoquinasa

HsMGS: glicogen sintasa de múscul humà

IGC: clusters granulars intercromàtics
kb: kiloparells de bases nucleotídiques
kDa: kilodaltons
LGS: glicogen sintasa de fetge
MGP: glicogen fosforilasa muscular
MGS: glicogen sintasa muscular
moi: multiplicitat d'infecció
NIDDM: diabetis no dependent de insulina
NRD1 α : domini de reconeixement de nucleòtid 1 α
PAS: àcid periòdic i solució Schiff
pfu: unitats formadores de plaques víriques
PGM: fosfoglucomutasa
PKA: proteïna quinasa dependent d'AMPc
PKC: proteïna quinasa dependent de calci
PML: oncoproteïna de la leucèmia promielocítica
PMM: fosfomanomutasa
PP: proteïna fosfatasa
PTG: protein targeting to glycogen
SFC: compartiment de factors d'empalmament
TRITC: isotiocianat de tetrametilrodamina
UDPG: uridildifosfat-glucosa
UDPGPP: uridildifosfat-glucosa pirofosforilasa

A. Presentació i Objectius	1
B. Introducció General	5
B.1. Metabolisme del glicogen.....	7
B.1.1. El glicogen.....	7
B.1.1.1. Estructura	7
B.1.1.2. Funció	8
B.1.1.3. Localització subcel·lular	9
B.1.2. Síntesi i degradació del glicogen.....	10
B.1.2.1. Síntesi i degradació del glicogen al múscul esquelètic	11
B.1.2.2. Regulació hormonal de la síntesi de glicogen en el múscul.....	14
B.1.2.3. Diferències entre el metabolisme del glicogen muscular i hepàtic	16
B.2. Glicogen sintasa muscular.....	17
B.2.1. El gen de la glicogen sintasa muscular	17
B.2.2. Regulació transcripcional de la MGS.....	18
B.2.3. La glicogen sintasa muscular i la regulació de la seva activitat enzimàtica.....	18
B.2.4. Localització subcel·lular.....	21
B.2.5. Sobreexpressió de la MGS	21
B.3. Glicogen sintasa i situacions patològiques	22
C. Resultats	25
1. Estudi de les similituds entre les glicogen sintases, les sintases de midó i d'altres glicosiltransferases: les glicogen sintases d'arqueobacteris com a paradigma.	27
1.1. Introducció	29
1.1.1. Les glicogen sintases d'animals i fongs.....	30
1.1.2. Les glicogen (midó) sintases de plantes i bacteris	31
1.1.3. Glicogen sintases d'arqueobacteris.....	32
1.2. Resultats	33
1.2.1. Anàlisi de la seqüència primària de les glicogen sintases i les glicogen(midó) sintases.....	33
1.2.2. Característiques de l'estructura secundària predita de les α 1 \rightarrow 4-glucà sintases	34
1.2.3. Anàlisi del genoma de <i>Pyrococcus abyssi</i> i clonatge de la PaG(M)S...41	
1.3. Discussió.....	44
2. Identificació de residus essencials de la glicogen sintasa de múscul humà	47
2.1. Introducció	49
2.2. Resultats	50
2.2.1. Anàlisi de seqüències	50
2.2.2. Activitat de la proteïna de fusió GFP _h MGS.....	53

2.2.3. Unió al glicogen intracel·lular de la proteïna de fusió GFP-HsMGS....	55
2.2.4. Caracterització de les proteïnes mutants GFP-HsMGS (E510A) i GFP-HsMGS (E518A).....	58
2.3. Discussió.....	60
3. Construcció i caracterització dels adenovirus AdCMV-GFP, AdCMV-GFP-HsMGS i AdCMV-HsMGS.....	63
3.1. Introducció.....	65
3.1.1. Biologia dels adenovirus.....	65
3.1.2. Adenovirus recombinants.....	66
3.2. Resultats.....	67
3.2.1. Clonatge dels cDNA d'interès en el plasmidi pACCMV.pLpA.....	67
3.2.2. Cotransfecció en cèl·lules 293 i recombinació homòloga.....	68
3.2.3. Caracterització de clons positius.....	69
3.3. Discussió.....	73
4. Localització de la HsMGS endògena i caracterització de la translocació nucli-citoplasma.....	75
4.1. Introducció.....	77
4.1.1. Localització de la quimera GFP-HsMGS.....	77
4.1.2. Enzims del metabolisme i distribució subcel·lular.....	78
4.1.3. El nucli i la seva arquitectura funcional.....	80
4.2. Resultats.....	82
4.2.1. Caracterització de l'anticòs MGS3 contra la HsMGS.....	82
4.2.2. Immunolocalització de la HsMGS en cèl·lules musculars en cultiu.....	85
4.2.3. Relació entre la translocació de la HsMGS i el glicogen intracel·lular.....	87
4.2.4. Immunolocalització de la MGS en un model d'adipòcits.....	88
4.2.5. Distribució subnuclear de la HsMGS i efecte de la actinomicina D....	89
4.3. Discussió.....	91
5. Estudis sobre el mecanisme de control de la localització subcel·lular de la HsMGS.....	95
5.1. Introducció.....	97
5.1.1. Senyalització per glucosa 6-fosfat.....	97
5.1.2. Residus fosforilats en la HsMGS.....	98
5.1.3. Senyals de localització i export nuclear.....	98
5.2. Resultats.....	100
5.2.1. Anàlisi de la HsMGS mitjançant mutants de deleció.....	100
5.2.2. Paper de la fosforilació en la distribució subcel·lular de la HsMGS..	102
5.2.3. Paper de la glucosa 6-fosfat en la translocació de la HsMGS.....	105
5.2.4. Efecte de la leptomicina B i anàlisi de possibles NLS i NES en la HsMGS.....	105
5.3. Discussió.....	107

D. Discussió General.....	109
E. Conclusions	117
F. Materials i Mètodes.....	121
G. Bibliografia	145
Annex	

A. Presentació i Objectius

A. Presentació i Objectius

La present tesi recull una sèrie de resultats sobre el control de la distribució subcel·lular de la glicogen sintasa muscular humana (HsMGS), així com la seva comparació amb d'altres glicosiltransferases, que permeté per una banda la descripció d'aminoàcids essencials per a la catàlisi d'aquest enzim, així com l'anàlisi de les semblances de les glicogen sintases amb proteïnes relacionades.

Els treballs del grup d'investigació en que s'ha realitzat aquesta tesi doctoral s'han centrat en la regulació del metabolisme del glicogen així com en les seves alteracions en la diabetis. Entre els temes dels que s'ha ocupat recentment destaca la distribució subcel·lular dels enzims del metabolisme del glicogen, principalment en el fetge. En el cas del metabolisme muscular encara restaven moltes incògnites per resoldre, que incloïen qüestions bàsiques com ara el mecanisme catalític de l'enzim central de la síntesi del glicogen muscular: la MGS.

Fins a la data no s'ha aconseguit la resolució d'una estructura tridimensional per a les glicogen sintases eucariotes i per tant l'arquitectura del seu centre actiu es desconeix. Tant el nostre grup d'investigació com d'altres havien provat d'obtenir l'estructura de la HsMGS però degut, probablement, a les seves complexes modificacions postraduccionals, no s'ha aconseguit.

Així doncs, el primer objectiu d'aquesta tesi doctoral fou extreure informació estructural mitjançant la comparació les seqüències aminoacídiques i la predicció d'estructura secundària entre les glicogen sintases eucariotes i les glicogen (midó) sintases, encarregades de la síntesi de midó en plantes i del glicogen bacterià. També s'estudiaren les relacions filogenètiques entre aquests enzims per tal de determinar si d'altres de relacionats eren bons candidats a esdevenir models per a la seva anàlisi estructural mitjançant cristal·lografia de raigs X.

El segon objectiu perseguia, mitjançant una estratègia similar de comparació amb d'altres glicosiltransferases, la identificació d'aminoàcids essencials per a la catàlisi i la comprovació experimental de la seva funció. El fet que el grau de conservació entre les glicogen sintases és molt elevat, no permetia esclarir quins residus posseïen en una funció crítica. Per tant es procedí a comparar aquests enzims amb d'altres glicosiltransferases per tal de cercar aquells que fossin conservats en un grup més ampli d'enzims.

Prèviament a la realització d'aquesta tesi doctoral, el nostre grup havia descrit que la fusió de la HsMGS amb la proteïna fluorescent verda (GFP)

presentava una localització subcel·lular regulada entre el citoplasma i el nucli dependent de la concentració de glucosa extracel·lular. Per la qual cosa, el tercer objectiu d'aquest treball fou la caracterització d'aquesta translocació nucleocitoplasmàtica. Per una banda calia investigar el comportament de la HsMGS endògena en un model que l'expressés de forma natural, i estendre aquest estudi a d'altres models cel·lulars que presentessin la MGS per tal de determinar si aquest fenomen era comú a tots els teixits que expressen la isoforma muscular d'aquest enzim. A més es pretenia aprofundir en quines eren els senyals metabòlics que induïen tant l'import com l'export de laHsMGS del nucli.

L'últim objectiu de la tesi consistí en esbrinar el mecanisme de control de la localització subcel·lular de la HsMGS. Aquesta tasca se centrà en la cerca de determinants o residus claus en la seqüència de la HsMGS responsables de la translocació nucleocitoplasmàtica.

B. Introducció General

B. Introducció General

B.1. Metabolisme del glicogen

B.1.1. El glicogen

La pràctica totalitat de les cèl·lules contenen alguna molècula de reserva energètica. La glucosa, metabòlit central de la majoria d'organismes s'emmagatzema en forma de glicogen o bé de midó, essent el primer característic de les cèl·lules animals, i el segon de les cèl·lules vegetals.

B.1.1.1. Estructura

El glicogen és un polisacàrid ramificat d'alt pes molecular format per unitats de glucosa. Aquests monòmers s'uneixen mitjançant enllaços glicosídics $\alpha(1\rightarrow4)$ i les ramificacions s'estableixen gràcies a enllaços glicosídics $\alpha(1\rightarrow6)$ (Fig. B.1.). Així doncs, el glicogen no té una mida i una massa establertes. Les observacions electromicroscòpiques [Rybicka, 1996] indiquen que els grànuls de glicogen varien des dels 2-3 nm de diàmetre (partícules γ), a acumulacions molt més denses, en forma de rosassa, i d'uns 100 nm, anomenades α i que són característiques del fetge. En el múscul només es troben les partícules β de grandària intermèdia (20-30 nm).

La seva estructura molecular continua essent un problema complex, ja que el nombre de residus de glucosa i l'estructura de cada molècula de glicogen en particular és variable. Whelan, l'any 1969, ja establí un model per al glicogen, acceptat actualment [Gunja-Smith et al., 1970; Whelan 1971]. En essència, el glicogen disposa d'una cadena C, amb l'aldehid reductor lliure en un extrem, cadenes B (unides a la cadena C o a d'altres B) que posseeixen ramificacions, i cadenes A que estan unides a les cadenes B però que al seu torn no es ramifiquen. Les cadenes contenen, de mitjana, 13 residus i aquelles que disposen de ramificacions (B i C) presenten dues branques per terme mitjà (fig. B.1).

Tot i que el glicogen podria, en principi, créixer indefinidament, els models teòrics basats de la disposició espacial dels residus de glucosa dins la molècula prediuen que per raons estèriques la capa externa de la partícula es faria inaccessible per als enzims del seu metabolisme més enllà de la dotzena capa. Així doncs, les molècules madures de glicogen que pronostiquen aquests models estarien formades per 12 capes, pesarien aproximadament 10^7 Da i contindrien 55000 residus de glucosa [Meléndez et al., 1998]. Aquests

paràmetres teòrics concorden amb els del glicogen aïllat de diferents fonts i amb la mida de les partícules β observades en les preparacions microscòpiques.

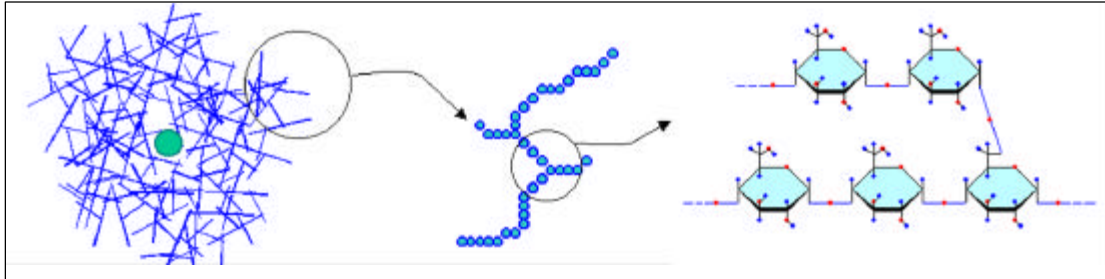


Fig. B.1. Esquema de l'estructura del glicogen animal. Una molècula de glicogen d'origen muscular conté al seu interior la proteïna glicogenina 1 unida a l'extrem reductor (esfera verda). A partir d'aquesta cadena C, es disposen les cadenes B formant diverses capes, finalment les cadenes A que no estan ramificades delimiten la molècula. Els residus de glucosa s'uneixen mitjançant enllaços glicosídics de tipus α 1-4 i en els punts de ramificació per enllaços α 1-6. Les unitats glicosídiques es representen en blau clar en la projecció de Haworth mostrant els àtoms d'hidrogen en blau i els d'oxigen en vermell.

B.1.1.2. Funció

La funció bàsica del glicogen és la reserva energètica. Per una banda, la seva natura macromolecular permet l'emmagatzematge de glucosa sense un augment significatiu de l'osmolaritat cel·lular, i per una altra, la ramificació li confereix una alta accessibilitat per a que la degradació enzimàtica pugui ésser molt ràpida en resposta a una demanda d'energia. A més a més, el glicogen és soluble, a diferència del midó, també mercès al seu alt grau de reamificació i això permet la seva distribució pel citoplasma.

En els mamífers, existeixen dos reservoris principals de glicogen. La quantitat de glicogen més important es troba en la massa muscular esquelètica [Cohen, 1986], però és en el fetge on la seva concentració és més elevada [Roach, 1986]. El glicogen se sintetitza després de la ingesta d'aliments, quan la concentració de glucosa en sang és elevada i en canvi es degrada, en línies generals, durant el dejú en el fetge, i durant l'exercici en el múscul.

En el cas dels llevats, el glicogen se sintetitza quan el creixement deixa de ser exponencial i la concentració de glucosa comença a disminuir o bé quan manca algun altre nutrient i no els és possible realitzar la divisió cel·lular. El glicogen es degrada un cop la glucosa ha estat esgotada [Sillje et al., 1999]. En la majoria dels bacteris també s'emmagatzema glicogen, i aquest comença a acumular-se quan es passa de la fase de creixement exponencial a l'estacionària degut principalment a la limitació en la concentració d'algun nutrient, com ara el nitrogen [Preiss, 1984]. En ambdós tipus d'organismes, els mutants de pèrdua de funció d'enzims implicats en la síntesi de glicogen que

presenten una absència total d'aquest polisacàrid, continuen essent viables. S'argumenta però que la capacitat de produir i mobilitzar reserves de glicogen i trehalosa, en el cas dels llevats, els confereix certs avantatges adaptatius [Sillje et al., 1999].

Moltes proteïnes s'uneixen al glicogen i mercès a aquesta associació s'afavoreixen les interaccions entre elles, com ara les de les subunitats de les proteïnes fosfatases dirigides al glicogen amb la glicogen sintasa (GS) i la glicogen fosforilasa (GP) [Newgard et al., 2000]. També la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3) es troba associada al glicogen [Ragano-Caracciolo et al., 1998]. S'ha proposat que, el glicogen i les seves proteïnes associades, formarien un quasi orgànel, que ha estat anomenat glicosoma [Rybicka, 1996].

Una altra funció per al glicogen que ha estat descrita, també està relacionada amb la seva capacitat d'unir i organitzar d'altres molècules. Segons Hartl i col. els extractes d'oòcits de *Xenopus* són capaços d'organitzar un nucli al voltant d'un DNA exogen si el glicogen és present. La falta d'aquest component provoca la formació d'una cromatina esponjosa i el bloqueig de la formació del nucli [Hartl et al., 1994].

B.1.1.3. Localització subcel·lular

El glicogen es distribueix en el citoplasma de les cèl·lules. Els estudis electromicroscòpics mostren la presència de grànuls de glicogen α o β en preparacions de múscul, fetge, cervell i molts altres teixits així com en cèl·lules ã llades d'organismes que comprenen totes les branques filogenètiques [Calder, 1991; Kessel i Beams, 1990; Couлары et al., 2001 i Rybicka, 1996]

Tradicionalment, s'ha descrit l'existència d'una associació entre del glicogen i el reticle endoplasmàtic/sarcoplasmàtic. La presència de glicogen en les preparacions de microsomes per fraccionament cel·lular foren les primeres indicacions [Dallner i Ernster, 1968]. Les imatges de microscòpia electrònica també corroboraven la presència de grànuls de glicogen al voltant o properes al reticle endoplasmàtic llis [DiMauro et al., 1971; Wanson i Drochmans, 1972].

En el múscul esquelètic i mitjançant la tinció de Schiff-PAS, específica per a carbohidrats, es detectà la presència de glicogen en la zona perinuclear, subsarcolemmal i en les bandes I i M. Aquestes observacions reforçaven la idea de la participació de les estructures de membrana en la biosíntesi del glicogen [Engel, 1961]. El clonatge i expressió de la subunitat reguladora R_{G1}/G_M de la proteïna fosfatasa 1 va aportar una prova més directa de l'associació del glicogen amb les membranes. Aquesta proteïna, present en el

múscul esquelètic, conté un domini d'unió a glicogen i un altre a membranes, a més a més del lloc d'unió a la subunitat catalítica de la PP1 [Tang et al., 1991].

En el fetge la disposició subcel·lular del glicogen podria estar condicionada pel fet que s'acumula en grans quantitat en aquest teixit. En aquest sentit apunten els estudis realitzats en el nostre laboratori. En ells es mostra que la síntesi de glicogen es realitza de forma ordenada en els hepatòcits. Comença en l'exterior, en les zones més properes a la membrana i continua cap a l'interior de la cèl·lula [Fernández-Novell et al., 1997; García-Rocha et al., 2001]. Aquesta acumulació ordenada podria ésser un mecanisme d'optimització de càrrega per tal d'assegurar una capacitat d'acumulació màxima del polisacàrid.

En el llevat de la cervesa, *Saccharomyces cerevisiae*, i mitjançant microscòpia electrònica s'ha descrit una estructura membranosa originada per invaginació de la membrana plasmàtica al voltant de la qual apareixen concentrades reserves de glicogen [Coulary et al., 2001]. Aquesta recurrència en l'associació amb membranes també ha estat observada en *Lophomonas blattarum*, un flagel·lat paràsit intracel·lular, en el qual el glicogen es concentra als voltants del reticle endoplasmàtic llis [Kessel i Beams, 1990].

A part d'aquesta localització citoplasmàtica, entre els anys 1960-1970, es descobrí que en alguns cultius de cèl·lules derivades de tumors, apareixia una gran quantitat de glicogen en l'interior del nucli. [Karasaki, 1971; Zimmermann et al., 1976; Granzow et al., 1981]. Aquestes observacions van despertar certa controvèrsia [Oron et al., 1980; Kopun et al., 1982], però finalment la qüestió deixà d'estudiar-se. Tot i això no només es demostrà que en alguns casos (patològics) existia glicogen intranuclear, si no que també hi era present l'activitat GS.

B.1.2. Síntesi i degradació del glicogen

Tradicionalment es descriu que l'inici de la via de biosíntesi de glicogen comença amb la formació de glucosa 1-fosfat (Glc 1-P) a partir de glucosa 6-fosfat (Glc 6-P) mitjançant l'acció de la fosfoglucomutasa. Tot seguit aquesta glucosa 1-fosfat es transforma en UDP-glucosa (UDPG) (o ADP-glucosa en bacteris) per la pirofosforilasa corresponent i a continuació aquest glucòsid de nucleòtid es usat per la glicogen sintasa (GS) per allongar una cadena preexistent d'amilosa. Posteriorment aquest polímer lineal serà ramificat per l'acció de l'enzim ramificant.

La degradació es realitza gràcies a l'acció concertada i simultània de l'enzim desramificant i la GP. La GP degrada les cadenes lineals produint Glc 1-P i s'atura quan es troba a tres o quatre residus d'un punt de ramificació.

Aleshores l'enzim desramificant elimina la ramificació transferint la branca (exceptuant el residu unit per l'enllaç $\alpha(1\rightarrow6)$) a una altra cadena del glicogen mitjançant la formació d'un enllaç $\alpha(1\rightarrow4)$. Finalment elimina el residu del punt de ramificació alliberant glucosa [Roach, 1986; Preiss, 1984].

B.1.2.1. Síntesi i degradació del glicogen al múscul esquelètic

El múscul esquelètic dels mamífers ha estat un dels models més utilitzats per estudiar les vies metabòliques de síntesi i degradació del glicogen. La glucosa es transportada a l'interior de la fibra muscular on ràpidament es transforma en Glc 6-P i que es dirigeix cap a la glucòlisi, la via de les pentoses fosfat o la síntesi de glicogen.

Una de les característiques específiques del metabolisme del glicogen en el múscul es troba en el transport i la fosforilació de la glucosa. El transport de glucosa en tots els teixits, exceptuant el tracte intestinal i el ronyó, es duu a terme mitjançant transportadors que no depenen del transport d'ions o de la hidròlisi d'ATP. Aquests han estat identificats i caracteritzats i reben els noms de GLUT1 a 5 [Olson i Pessin, 1996]. Mentre que GLUT1 s'expressa en la majoria de cèl·lules i es troba majoritàriament en la membrana plasmàtica, GLUT4 s'expressa només en teixits sensibles a insulina com el múscul esquelètic i el teixit adipós. El transportador GLUT4 transloca des de l'interior de la cèl·lula, on s'emmagatzema en vesícules, cap als túbuls transversals i la membrana citoplasmàtica, en resposta a la insulina [Birnbaum, 1992; Rea i James, 1997]. En els últims anys, però, s'ha descrit l'existència, en el múscul esquelètic, d'un subgrup de vesícules que contenen GLUT4 que transloquen de forma independent de la insulina i que responen en canvi a la contracció muscular [Coderre et al., 1995]. En la via de senyalització d'aquest fenomen s'ha implicat la proteïna quinasa dependent d'AMP (AMPK) [Kurth-Kraczek et al., 1999].

Un cop la glucosa és dins el citoplasma, l'hexoquinasa la fosforila en posició 6 i està disponible per a ésser usada en la síntesi de glicogen. En el múscul coexisteixen dues isoformes d'hexoquinasa (HK), la I, minoritària, i la II. Ambdues són capaces d'unir-se a la membrana externa dels mitocondris, tot i que apareixen també en la fracció soluble. Aquesta localització mitocondrial s'ha justificat com una possible canalització de l'ATP que prové de la fosforilació oxidativa cap a la fosforilació de la glucosa [Wilson, 1997].

La Glc 6-P dirigida cap a la síntesi de glicogen es transformada seqüencialment en Glc 1-P, després en UDPG i finalment gràcies a l'acció de la isoforma muscular de la GS, en glicogen. La MGS està altament regulada per fosforilació múltiple, que provoca la inactivació de l'enzim [Skurat et al., 1994].

A més a més, l'enzim s'activa de forma al·lostèrica per la Glc 6-P, que a la vegada també afavoreix la seva desfosforilació i conseqüentment l'activació covalent [Villar-Palasi i Guinovart, 1997].

La síntesi de glicogen pot realitzar-se a partir d'una molècula preexistent del polisacàrid tot augmentant-ne la seva mida o bé de novo. La proteïna glicogenina 1 és l'encebador de la síntesi de novo de glicogen ja que és capaç d'autoglicosilar-se en un residu de tirosina per després afegir-hi fins a unes 7 a 10 unitats de glucosa més. Aquesta petita cadena de residus de glucosa units per enllaços $\alpha(1\rightarrow4)$ ja susceptible de ser allongada per la GS [Cao et al., 1993]. La glicogenina 1 (GGN1) va ser descrita al analitzar el glicogen del múscul esquelètic. Es determinà que existia una molècula de GGN1 unida covalentment a cada molècula madura de glicogen muscular [Smythe et al., 1990]. Sembla ser que existeix una interacció directa entre la GGN1 i la glicogen sintasa muscular (MGS) en l'inici de la síntesi de glicogen i que després aquesta proteïna roman unida covalentment a la molècula de glicogen creixent. Recentment s'ha descrit una proteïna activadora de l'activitat GGN1, GNIP, que podria tenir d'altres funcions en regulació de la transcripció ja que conté dominis d'unió a DNA [Skurat et al., 2002].

L'enzim ramificant introdueix les ramificacions en $\alpha(1\rightarrow6)$ del glicogen. Aquest enzim no ha rebut tanta atenció com d'altres participants de la via de síntesi del glicogen. Es coneix però que el múscul esquelètic i el fetge expressen la mateixa isoforma derivada del gen GBE1 [Thon et al., 1993]. També ha estat descrit que l'activitat d'aquest enzim no és limitant per a la síntesi de glicogen tot i la seva relativa baixa abundància en comparació amb d'altres enzims del metabolisme del glicogen [Caudwell i Cohen, 1980].

Un cop formades les molècules de glicogen aquestes resten emmagatzemades llestes per a la seva degradació en els casos en que la cèl·lula muscular necessiti glucosa. La degradació del glicogen és realitzada per la glicogen fosforilasa (GP) i l'enzim desramificant.

La primera presenta 3 isoformes: muscular, de fetge i de cervell [Newgard et al., 1989]. La GP està regulada tant covalentment com de forma al·lostèrica i produeix Glc 1-P a partir de glicogen i fosfat inorgànic. Es coneix la seva estructura tridimensional i han estat descrites moltes de les seves característiques catalítiques i de regulació. Una de les més interessants és la fosforilació del residu de serina 14 que activa la proteïna mitjançant els canvis estructurals que provoca [Madsen, 1986].

La fosforilació de la GP està catalitzada per una proteïna específica anomenada glicogen fosforilasa quinasa. És un complex hexadecamèric format per quatre còpies de quatre subunitats diferents [Kilimann, 1990]. Al seu torn

aquesta quinasa és activada per l'augment en les concentracions de calci i per fosforilació per part de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (AMPC) [Heilmeyer, 1991].

També intervé en la degradació del glicogen l'enzim desramificant encarregat de degradar els enllaços $\alpha(1\rightarrow6)$ -glicosídics, així com d'eliminar per transferència a una altre cadena, els residus propers als punts de ramificació. Existeixen isoformes diferents per a múscul i fetge derivades d'empalmament alternatiu d'un únic gen: AGL [Bao et al., 1997].

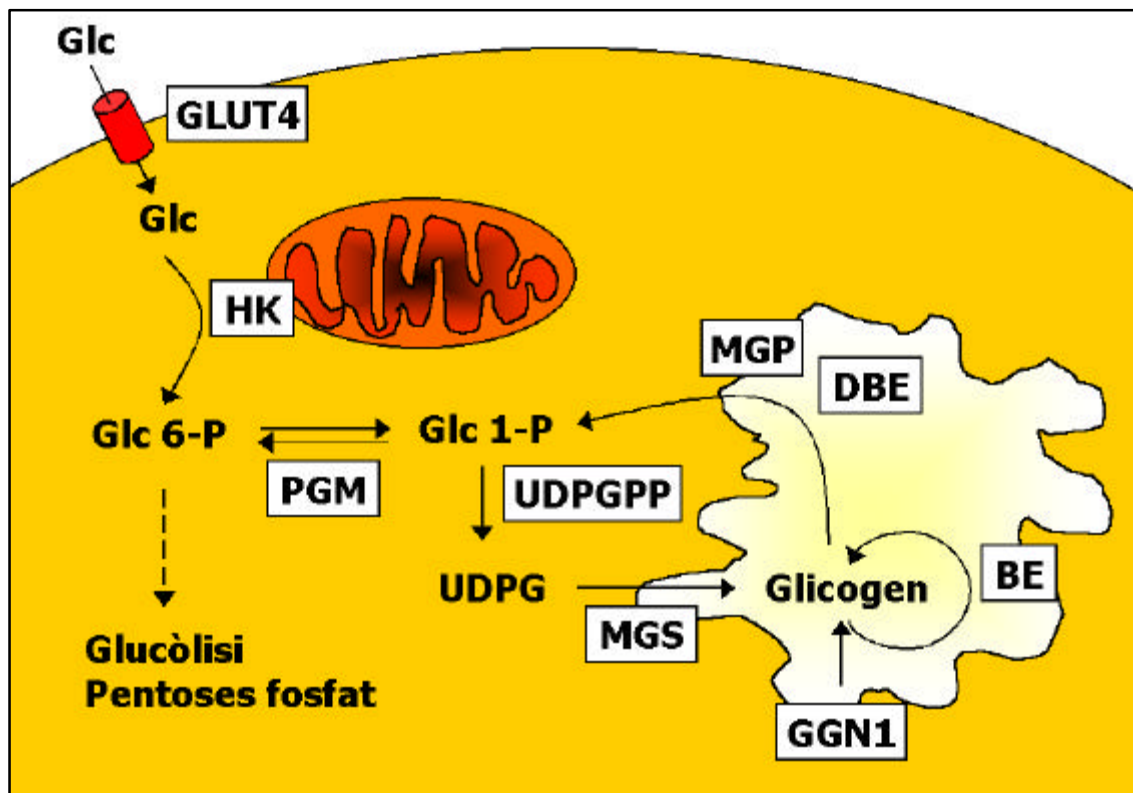


Fig. B.2. Esquema del metabolisme del glicogen en cèl·lules musculars. Es mostren els enzims implicats en la síntesi i degradació del glicogen, així com els metabòlits intermediaris. GLUT4: transportador facilitatiu de glucosa 4 (en la seva localització a la membrana plasmàtica); HK: hexoquinasa, unida a mitocondris (en múscul existeixen dues isoformes I i II); PGM: fosfoglucomutasa; UDPGPP: UDP-glucosa pirofosforilasa; la resta d'enzims que participen en aquest metabolisme es troben associats a la molècula de glicogen, bé covalentment com la GGN1: glicogenina 1; amb alta afinitat com la MGS: glicogen sintasa muscular i la MGP: glicogen fosforilasa muscular; i amb una afinitat menor com el BE i el DBE: enzim ramificant i desramificant, respectivament. Les abreviatures per als metabòlits són, Glc 6-P: glucosa 6-fosfat; Glc 1-P: glucosa 1-fosfat i UDPG: UDP-glucosa.

B.1.2.2. Regulació hormonal de la síntesi de glicogen en el múscul

Les dues hormones que més influeixen en el metabolisme del glicogen en el múscul són la insulina i l'adrenalina.

La insulina promou la conversió de la glucosa en glicogen muscular i pertorbacions de l'acció d'aquesta hormona provoquen alteracions en el metabolisme del glicogen. La insulina activa tant el transport de la glucosa com la GS. La combinació d'aquestes dues etapes, transport i fosforilació (que són considerades a efectes de regulació una de sola) i l'acció de la GS, controlarien la síntesi de glicogen [Manchester et al., 1996].

El mecanisme pel qual la insulina promou la síntesi de glicogen és complex. Per una banda controla l'estat de fosforilació tant de la GS com de la GP. La insulina promou la desfosforilació de la MGS especialment en els llocs 3a, b i c [Parker et al., 1983] així com dels llocs 2 i 2a [Smith i Lawrence, 1985]. S'ha descrit que aquests 5 residus són els que exerceixen un major control sobre l'activitat de l'enzim [Skurat et al., 1994].

A priori, el mecanisme de la insulina podria estar mediat, bé per la inactivació de les quinases que fosforilen la GS, bé per l'activació de proteïnes fosfatases (PP) que desfosforilen l'enzim, principalment la PP1.

La insulina al unir-se al seu receptor de membrana provoca l'autofosforilació en tirosina del receptor i l'activació de l'activitat quinasa vers d'altres substrats [White i Kahn, 1994]. Aquests substrats són bàsicament les proteïnes anomenades substrats del receptor de la insulina (IRS) de les quals se'n coneixen diverses isoformes: IRS-1 a 4 [Giovannone et al., 2000]. Un cop fosforilats aquests substrats serveixen de punt d'ancoratge d'altres proteïnes que contenen dominis SH2. La unió als IRS provoca l'activació de les seves capacitats catalítiques. Una de les més importants és la fosfatidilinositol 3-quinasa, que provoca un augment en les concentracions d'inositol 3, 4, 5-trifosfat. Una altra proteïna que s'uneix als IRS és Grb2 que permet la unió de mSOS i finalment l'activació de la via de les MAP quinases. Es proposa que l'activació de PKB, via les quinases dependents d'inositols, inactivaria la glicogen sintasa quinasa 3 [Cross et al., 1995]. D'altres autors proposen que la p90 rsk quinasa fosforilaria la R_{G1}/G_M activant-la [Sutherland et al., 1993]. Aquests últims resultats han estat discutits i encara resta per definir clarament com participa la insulina en l'activació de la PP1. Les subunitats reguladores de la PP1 que s'uneixen a glicogen, R_{G1}/G_M , G_L , PTG i PPP1R6 semblen tenir un paper destacat en l'activació de la GS. La sobreexpressió de la PTG (protein targeting to glycogen) provoca un fort augment en la concentració de glicogen intracel·lular, i també es produeixen augments significatius amb la R_{G1}/G_M i la G_L [Newgard et al., 2000].

B.1.2.3. Diferències entre el metabolisme del glicogen muscular i hepàtic

Durant els darrers anys s'han fet paleses les nombroses diferències en el metabolisme del glicogen entre el fetge i el múscul esquelètic. Des d'un punt de vista teleològic, aquestes diferències són degudes a la diferent funció que el glicogen realitza en aquests teixits. El glicogen muscular és un reservori exclusiu del teixit on es troba i es consumit principalment durant l'exercici [Cohen, 1986]. En canvi, el glicogen hepàtic representa una reserva de glucosa per a tot l'organisme, ja que es degrada durant el dejú i, mercès la capacitat desfosforiladora de Glc 6-P del fetge, transformat en glucosa lliure que passarà al corrent circulatori [Roach, 1986].

Existeixen isoformes específiques de fetge per a la pràctica totalitat dels enzims claus de la síntesi i degradació del glicogen. A part de la GS hepàtica codificada pel gen GYS2, també s'expressa el transportador GLUT2 [Olson i Pessin, 1996] i la isoforma IV d'hexoquinasa, anomenada glucoquinasa (GK) [Iynedjian, 1993].

L'entrada de glucosa en l'hepatòcit es realitza bàsicament per el transportador GLUT2. La baixa afinitat per glucosa i l'elevada capacitat d'aquest transportador permet que l'entrada del monosacàrid en la cèl·lula sigui de forma quasi exclusiva dependent de la glucèmia. Així doncs només en estats postpandrials el flux d'entrada de glucosa en els hepatòcits esdevé significatiu. Un cop en l'interior de la cèl·lula, l'enzim encarregat de la fosforilació de glucosa és la GK. Aquest enzim es troba en el nucli en el dejú i transloca al citoplasma quan els nivells de glucosa augmenten, permeten la fosforilació del monosacàrid [Fernàndez-Novell et al., 1999]. La GK també presenta característiques cinètiques que la diferencien de la resta d'hexoquinases. En primer lloc no s'inhibeix pel seu producte, la Glc 6-P, i a més presenta un comportament cooperatiu, malgrat que no s'ha demostrat la seva oligomerització i que l'existència de centres d'unió a glucosa alternatius al catalític és un aspecte en controvèrsia [Cárdenas, 1995; Agius i Stubbs, 2000].

Ambdues etapes, transport i fosforilació estan clarament adaptades per tal de produir un flux màxim de síntesi de Glc 6-P en situacions d'alta concentració de glucosa extracel·lular.

L'altra etapa clarament diferent en el múscul esquelètic i el fetge és la realitzada per la GS. La GS hepàtica es regulada de forma similar a la isoforma muscular però l'activació per Glc 6-P provoca un augment en la velocitat màxima de l'enzim, mentre que en la isoforma muscular només té lloc un augment de l'afinitat pels substrats [Villar-Palasi i Guinovart, 1997]. No s'ha descrit per a la isoforma de fetge una fase d'activació independent de Glc 6-P

com en el cas del múscul esquelètic, en que després d'una depleció elevada de glicogen, l'augment de quocient d'activació no correlaciona amb les concentracions de Glc 6-P [Montell et al., 1999]

El nostre laboratori ha descobert, a més a més, que la Glc 6-P produïda per la GK és capaç d'activar tant la MGS com la LGS mentre que la Glc 6-P sintetitzada per la HKI no és accessible a la LGS i en canvi sí que permet l'activació de la isoforma muscular [Gomis et al., 2002].

L'inici de la síntesi de glicogen en fetge ha estat assignat a un enzim homòleg de la glicogenina 1, anomenat glicogenina 2, que presenta diferents isoformes per empalmament alternatiu. A diferència de l'isoforma muscular, la glicogenina 2 no roman unida covalentment al glicogen i per tant s'especula que pot proporcionar un major nombre de molècules inicials amb una menor quantitat d'enzim present per cèl·lula [Mu et al., 1997; Mu et al., 1998].

Treballs del nostre grup d'investigació també han posat de manifest la localització subcel·lular regulada de la LGS. En aquest cas, en situacions d'absència de glucosa extracel·lular, l'enzim es troba dispers arreu del citoplasma, mentre que en resposta a glucosa, la LGS s'acosta a la perifèria de la cèl·lula on s'inicia la síntesi del glicogen. Com ja s'ha esmentat abans, aquest fenomen podria estar relacionat amb la necessitat d'optimitzar l'emmagatzematge del glicogen ja que l'hepatòcit és el tipus cel·lular que n'acumula una major quantitat.

Es fa evident, doncs, que el propòsit de la síntesi i la degradació del glicogen en aquests dos teixits és diferent i que les proteïnes que intervenen en el seu metabolisme reflecteixen aquestes peculiaritats.

B.2. Glicogen sintasa muscular

B.2.1. El gen de la glicogen sintasa muscular

En mamífers, la GS presenta dues isoformes, codificades pels gens GYS 1 i 2 i que corresponen als gens muscular i hepàtic, respectivament. En el cas dels humans el gen GYS 1 es troba en el cromosoma 19 inclòs en la banda citogenètica 19q13.3. Està format per 16 exons que s'estenen al llarg de 27 kb de DNA. [Orho et al., 1995]. La MGS s'expressa de forma ubiqüa en pràcticament tots els teixits a excepció del fetge [Kaslow i Lesikar, 1984; Kaslow et al., 1985].

Molts estudis han cercat mutacions en aquest gen per tal de relacionar-les amb la diabetis no dependent d'insulina (NIDDM). De tots els estudis realitzats només s'ha descrit una mutació de canvi d'aminoàcid que provoqui

un canvi en l'activitat de la HsMGS i que aparegui en pacients de NIDDM: la mutació Pro442Ala, que és molt poc freqüent [Orho-Melander et al., 1999]. També s'ha detectat una mutació en l'intró 14 que està lligada a la pèrdua de l'estimulació de la transcripció de la HsMGS lligada a l'exercici continuat. Els individus que realitzen exercici de forma contínua presenten uns valors d'activitat GS més elevats que els sedentaris. Aquest efecte es perd en els portadors d'aquest polimorfisme de restricció XbaI en l'intró 14, tot i que no es coneix el mecanisme pel qual aquest fenomen té lloc. Aquesta mutació està força estesa i apareix amb una freqüència d'entre un 10 i un 20 % segons les poblacions analitzades [St-Onge et al., 2001].

B.2.2. Regulació transcripcional de la MGS

No es coneixen amb detall els mecanismes que regulen la transcripció de la GS de múscul, tot i que s'ha clonat la zona 5' adjacent al gen GYS1 i s'ha determinat la presència de caixes GC i l'absència de caixa TATA [Nakayama et al., 1994]. Els dos factors coneguts que activen la transcripció del gen GYS1 són la insulina i l'exercici.

En individus sans la insulina promou la transcripció del missatger de la HsMGS. Es coneix però que els pacients de NIDDM presenten un decrement en l'expressió de l'mRNA de la HsMGS i una falta d'estimulació d'aquesta expressió per part de la insulina [Huang et al., 2000]. Malgrat aquests resultats, d'altres obtinguts usant cèl·lules en cultiu de pacients de NIDDM mostren que la insulina present en grans quantitats provoca un augment dels nivells de missatger [Nikoulina et al., 1997]. En tot cas sembla clar que la insulina és necessària per tal de mantenir uns nivells basals estables a llarg termini.

També l'exercici provoca un augment de l'expressió del gen GYS1 i això s'ha comprovat tant en atletes [Vestergaard et al., 1994] com en individus sotmesos a exercici controlat [Dela et al., 1995].

B.2.3. La glicogen sintasa muscular i la regulació de la seva activitat enzimàtica

Històricament, aquest enzim va ser el tercer per al qual es descrigué una regulació mitjançant fosforilació reversible i les seves característiques cinètiques han estat estudiades extensivament. La forma activa de la MGS està formada per l'oligomerització d'una única subunitat de uns 85 kDa i probablement és un tetràmer [Cohen, 1986]. L'enzim s'uneix al glicogen i per tant a l'hora de purificar-lo cal degradar el polisacàrid. La fracció que s'obté

d'aquest procés està formada per la MGS i la glicogenina 1 en una relació molar 1 a 1 [Pitcher et al., 1987].

No es coneix l'estructura tridimensional de la GS i existeixen pocs estudis referents a les relacions estructura-funció de l'enzim. Abans d'iniciar-se aquesta tesi, es coneixia que els extrems amino i carboxil, que contenen els llocs descrits de fosforilació, són les regions més variables entre isoformes [Farkas et al., 1990], i que el motiu KVGG, al voltant de la lisina 38 de la MGS de conill, estaria implicada en la unió a UDPG [Tagaya i Fukui, 1987; Mahrenholz et al., 1988].

Es coneixen diferents metabòlits que afecten l'activitat de la MGS. Entre els inhibidors es troben diversos nucleòtids: ATP, ADP, AMP i UDP mentre que el principal activador és la Glc 6-P [Villar-Palasi i Guinovart, 1997]. Recentment s'ha descrit una zona rica en arginines que participaria en l'activació alostèrica per aquesta molècula a través, probablement, de canvis conformacionals en l'enzim [Hanashiro i Roach, 2002].

La MGS de conill conté 9 residus de serina que són fosforilats in vivo. S'anomenen 1a, 1b, 2, 2a, 3a, 3b, 3c, 4 i 5, i corresponen a les serines 697, 710, 7, 10, 640, 644, 648, 652 i 656, respectivament. Aquests llocs estan conservats en la HsMGS [Skurat et al., 1994]. La fosforilació d'aquests residus provoca un augment de varis ordres de magnitud de la concentració de UDPG per aconseguir la meitat de la velocitat màxima de catàlisi. Endemés aquesta modificació covalent produeix també un augment molt elevat de la concentració necessària de l'activador Glc 6-P per aconseguir la meitat de la velocitat màxima. En canvi, la velocitat màxima no resulta afectada sensiblement [Roach et al., 1976].

Les quinases que participarien en aquesta inactivació són múltiples. El lloc 2 seria fosforilat per la quinasa dependent d'AMPc (PKA) [Cohen i Hardie, 1991] tot i que també es proposen la quinasa dependent d'AMP (AMPK) [Carling i Hardie, 1989] i la fosforilasa quinasa [Roach et al., 1978]. El lloc 2a seria aleshores fosforilat per la casèna quinasa 1, que necessita d'una fosforilació prèvia ja que reconeix motius del tipus S(P)-X-X-S. La mutació de la serina del lloc 2 per alanina provoca la pèrdua de la fosforilació tant del mateix lloc 2 com el del 2a, reforçant aquesta hipòtesi [Skurat et al., 1994].

Els altres dos llocs importants que regulen l'activitat de la MGS són el 3a i el 3b. En aquest cas sembla que la principal quinasa implicada és la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK-3), tot i que no es descarta la participació d'altres. La fosforilació per part de la GSK3 implicaria també una fosforilació prèvia per part de la casèna quinasa 2 en el lloc 5 per tal que la GSK3 fosforilés seqüencialment els llocs 4, 3c, 3b i finalment el 3a [Fiol et al., 1987]. La fosfo-

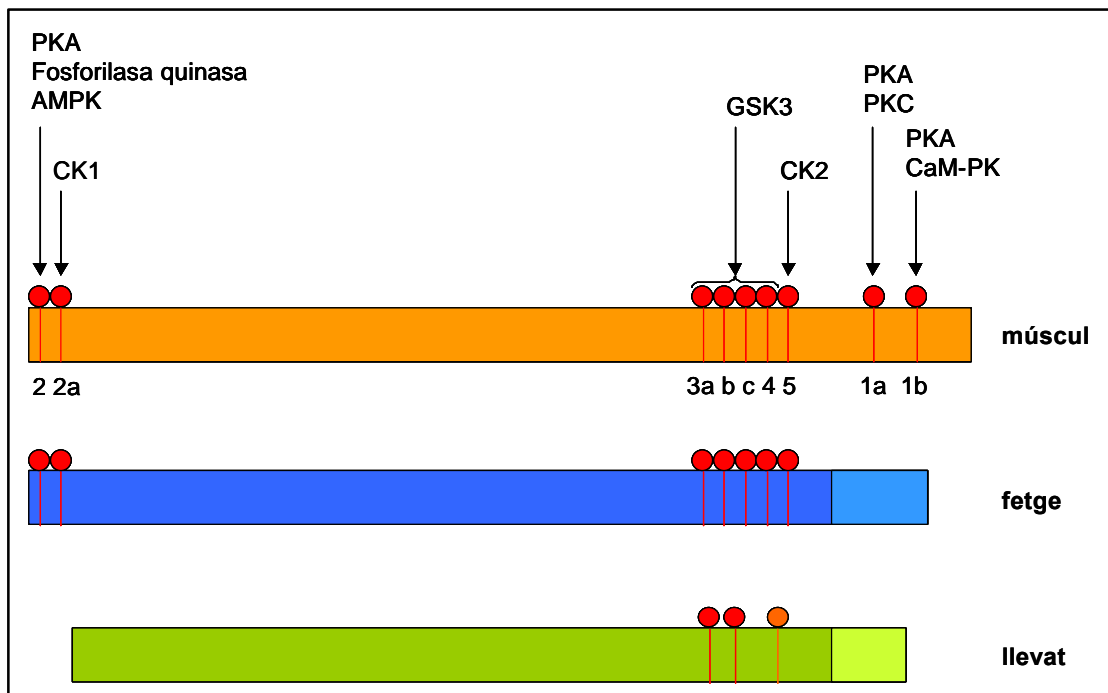


Fig. B.3. Esquema dels diferents llocs de fosforilació de les glicogen sintases. Es mostren les posicions dels llocs de fosforilació de la MGS de conill i les quinases que actuen en cada residu. PKA: proteïna quinasa dependent d'AMPc; CK1: caseïna quinasa 1; CK2: caseïna quinasa 2; GSK3: glicogen sintasa quinasa 3; PKC: proteïna quinasa dependent de calci; CaM-PK: proteïna quinasa dependent de Ca^{2+} -calmodulina. La GS de fetge no posseeix els llocs 1a i 1b, mentre que la resta de serines fosforilables estan conservades. En el cas de la GS de llevat només han estat descrits tres llocs de fosforilació un dels quals és una treonina (en taronja), i que no són homòlegs als de les GS animals. En la GS de llevat també apareix una zona de baixa similitud amb la resta de GS en l'extrem carboxil.

rilació dels llocs 1a i 1b no té un efecte significatiu en l'activitat de l'enzim i es desconeix quina és exactament la seva funció [Skurat et al., 1994].

In vivo la concentració de Glc 6-P present en múscul és insuficient, segons els estudis in vitro, per a activar la MGS fosforilada, per tant cal que l'enzim sigui desfosforilat per tal d'aconseguir una activació GS efectiva per a la síntesi del glicogen. La desfosforilació es catalitzada principalment per la PP1, tot i que també s'ha implicat la isoforma PP2a [Farkas et al., 1988]. En aquest procés participen especialment les subunitats reguladores de la PP1 que s'uneixen al glicogen. El múscul expressa principalment les subunitats G_M/R_{G1} i la PTG (protein targeting to glycogen). La unió de la G_M/R_{G1} a la subunitat catalítica augmenta la desfosforilació de la MGS i activa la glicogenogènesi. En resposta a adrenalina, aquesta subunitat reguladora es fosforila provocant la dissociació de la subunitat catalítica i per tant la inactivació del complex G_M/R_{G1} -PP1 [Hubbard i Cohen, 1993]. Més recentment també s'han descrit les subunitats PTG i PPP1R6 [Armstrong et al., 1997] que també activen la síntesi

de glicogen i es troben en diversos teixits, com el múscul i el fetge [Newgard, 2000].

B.2.4. Localització subcel·lular

La síntesi de glicogen té lloc al citoplasma per la qual cosa se suposà que la MGS era un enzim estrictament citoplasmàtic. Tot i això, el nostre laboratori demostrà que la fusió de la MGS amb la proteïna verda fluorescent (GFP) transloca al nucli en cèl·lules cultivades en absència de glucosa [Ferrer et al., 1997]. El fet que en determinades condicions metabòliques la MGS es trobi en l'interior del nucli també està recolzada per diferents treballs anteriors on es descrigué la síntesi de glicogen nuclear [Karasaki, 1971; Zimmermann et al., 1976; Granzow et al., 1981; Kopun et al., 1982] i l'existència d'activitat GS en l'interior de nuclis de cèl·lules tumorals de l'ascites HD33 Ehrlich-Lette [Granzow, 1981]. Alguns treballs foren incapaços de detectar la MGS en l'interior del nucli en situacions que mimetitzen l'exercici, en aquest cas sotmetent a electroestimulació les extremitats inferiors de conills [Nielsen et al., 2001].

B.2.5. Sobreexpressió de la MGS

Abans d'iniciar-se aquesta tesi doctoral, es descrigueren els efectes de la sobreexpressió específica en múscul esquelètic de la MGS de conill en animals transgènics [Lawrence et al., 1997; Manchester et al., 1996]. Un augment de GS, de fins a 10 vegades, produïa també un augment en l'acumulació de glicogen (d'unes 5 vegades) i de la quantitat de GP (fins a 3 vegades). En canvi el transport de glucosa a través de membrana no es veia afectat i la concentració d'UDP-glucosa disminuïa.

Això contradia la teoria fins aleshores acceptada que en el múscul el control de la via de síntesi del glicogen era exercit exclusivament pel transport de glucosa (incloent-hi també la fosforilació de la glucosa, ja que mitjançant els seus mètodes d'anàlisi els feien indistingibles), és a dir principalment per GLUT4 i que la GS simplement regulava la concentració de Glc 6-P per tal de mantenir-la en uns nivells estables [Shulman i Roden, 1999].

Aquests treballs també mostraven algunes dades molt interessants, com el fet que la GP s'expressés més en les fibres musculars transgèniques. Es discutia que l'augment de GP seria una resposta a la major concentració de glicogen i que el polisacàrid en seria l'inductor. Però en el cas dels animals transgènics de GLUT1 en el múscul, que també presenta unes concentracions semblants de glicogen no s'observa un augment de l'activitat GP [Ren et al., 1993]. Així doncs, podria tractar-se d'un efecte directe de la sobreexpressió de la MGS.

B.3. Glicogen sintasa i situacions patològiques

No s'ha descrit cap malaltia d'emmagatzematge de glicogen degut a mutacions de la MGS. Tampoc s'han realitzat experiments d'inhibició per antisense d'aquest enzim en models cel·lulars ni s'han construït animals knock-out. Probablement l'absència de MGS produeix efectes deleteris durant el desenvolupament, ja que és en un enzim central del metabolisme i a més s'expressa en la pràctica totalitat de l'organisme. Però la falta d'informació no permet anar més enllà de les hipòtesis.

En canvi l'absència o disminució de l'activitat LGS sí que ha estat descrita en humans, i s'ha anomenat GSD 0. Aquesta malaltia apareix en nadons o infants de curta edat, que durant el dejú presenten hipoglicèmia, hipercetonèmia i baixes concentracions d'alanina i lactat en sang. Tot i que la ingesta alleugera aquests símptomes també provoca hiperglicèmia i hiperlacticèmia. L'activitat GS en les biòpsies hepàtiques d'aquests pacients és molt baixa o no es detectable. Ha estat descrit que aquest fenotip es degut a diferents mutacions en el gen GYS2 que provoquen pèrdua de funció i que es presenten majoritàriament de forma homocigòtica en els individus afectats [Orho et al., 1998].

Però és en la patogènesi de la diabetis mellitus no dependent d'insulina (NIDDM) així com en pacients obesos o amb predisposició familiar a patir NIDDM on la participació de la MGS ha estat més discutida. En els pacients diabètics apareix una menor o nul·la activació de la MGS per insulina, [Golay, 2002] [Schalin-Jantti, 1992]. També s'ha detectat una menor activitat GS en pacients obesos hagin desenvolupat o no una NIDDM [Golay et al., 2002] i en pacients de NIDDM [Thorburn et al., 1991]. Apareix doncs un conjunt de defectes tant en l'activació com en la quantitat d'enzim present en les cèl·lules dels malalts o de pacients potencials. La qüestió que sorgí d'aquests estudis era determinar si aquests defectes eren causa o conseqüència de la NIDDM. Algunes evidències com l'aparició primerenca d'aquests defectes en individus sense una diabetis establerta suggerien que formaven part de les causes. Per altra banda tant l'activació i la regulació transcripció basal de la MGS són dependents d'insulina i degut a que la senyalització per insulina en aquests individus estava alterada, la disminució en l'activació i la quantitat basal de MGS resultarien ésser una conseqüència de la resistència a aquesta hormona.

Per intentar establir si els defectes en l'activitat MGS eren causa de NIDDM es realitzaren diferents anàlisis genètiques a la recerca de mutacions en el gen de la MGS i estudis de linkage en diferents poblacions i pacients de NIDDM. Mentre que alguns detectaren un cert lligam entre mutacions presents en el locus GYS1 i la NIDDM [Shimomura et al., 1997; Schalin-Jantti et al., 1992; Nakayama et al., 1995] d'altres no obtingueren resultats positius [Majer,

1996] [Elbein, 1994]. En estudis amb bessons, un dels quals era diabètic i l'altre no, es demostrà que existien efectes ambientals importants per a l'etiogènesi de la NIDDM, que els defectes en el metabolisme muscular del glicogen eren un efecte secundari i que la manca d'activació de la MGS per insulina no era suficient per a explicar el decrement en el metabolisme no oxidatiu de la glucosa [Vaag et al., 1996].

Tot i que no es pot descartar la presència de mutacions en la MGS que provoquin de forma concertada amb d'altres defectes genètics la NIDDM, sembla clar que és la regulació de l'enzim el que veu més afectat. Una de les mutacions més freqüents que apareixen en la població és el polimorfisme XbaI que presenta dos al·lels A1 i A2 situat en un intró del gen GYS1 [Orho-Melander et al, 1999a]. L'al·lel A2 està associat a NIDDM i a la síndrome metabòlica X. S'ha argumentat que aquest al·lel mutant estaria lligat amb d'altres defectes en locus diferents ja que no sembla probable que una mutació en un intró produeixi susceptibilitat per a NIDDM. Ara bé, els individus que duen aquesta variant no presenten l'augment de MGS basal en resposta a l'exercici continuat tal i com ocorre en individus amb l'al·lel A1 [St-Onge et al., 2001].

Resta doncs encara establir de forma definitiva la participació de la MGS i els seus mecanismes reguladors en la NIDDM.