

C. Resultats

Capítol 1

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.

1.1. Introducció

Gairebé tots els éssers vius usen glicogen o bé midó com a molècules d'emmagatzematge energètic [Roach et al., 1998; Buleon et al., 1998]. El glicogen es present en els animals [Calder, 1991], fongs [François i Parrou, 2001] i bacteris [Preiss i Romeo, 1989] i s'acumula en el citoplasma per tal d'abastar de glucosa l'organisme en cas necessari. El midó, el seu equivalent en les plantes, se sintetitza i emmagatzema dins dels plastidis i està format per dos polímers de glucosa diferents: l'amilopectina, el component principal i que és suficient per formar els grànuls de midó, i l'amilosa [Ball et al., 1996].

Tant el glicogen com l'amilopectina són molècules ramificades formades per unitats de glucosa unides per enllaços glicosídics $\alpha(1 \rightarrow 4)$ i amb punts de ramificació $\alpha(1 \rightarrow 6)$. El grau de ramificació i la llargada de les branques és variable i depèn de cada organisme [Calder, 1991; Buleon et al., 1998]. El fet que la bioquímica de glúcids dels animals, i la de les plantes i la resta d'organismes hagin estat sempre abordades per separat ha fet créixer les diferències aparents entre les vies sintètiques del midó i el glicogen, que per altra banda són conceptualment equivalents.

En tots dos casos el glucà $\alpha(1 \rightarrow 4)$ se sintetitza mitjançant l'acció d'una sola glicosiltransferasa usant UDP-glucosa o ADP-glucosa com a donadors de residus glucosil. En el cas dels animals i els fongs el pas limitant de la síntesi de glicogen és la reacció catalitzada per la glicogen sintasa mentre que per als bacteris i les plantes el control recau sobre la ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGPP). Aquests organismes usen ADP-glucosa en comptes d'UDP-glucosa com donador de sucre (Fig. 1.1.).

Campbell et al. [Campbell et al., 1997; Campbell et al., 1998] classificaren les glicosiltransferases usant com a criteris la similitud de seqüència i la retenció, o inversió, de la configuració del carboni anomèric del sucre transferit. D'entre les 43 famílies descrites, només 10 utilitzen un mecanisme de retenció (famílies 3, 4, 5, 6, 8, 15, 20, 32, 34 i 35), 25 són enzims amb mecanisme d'inversió i per a les altres 8 famílies, l'estereoquímica de la reacció es desconeix.

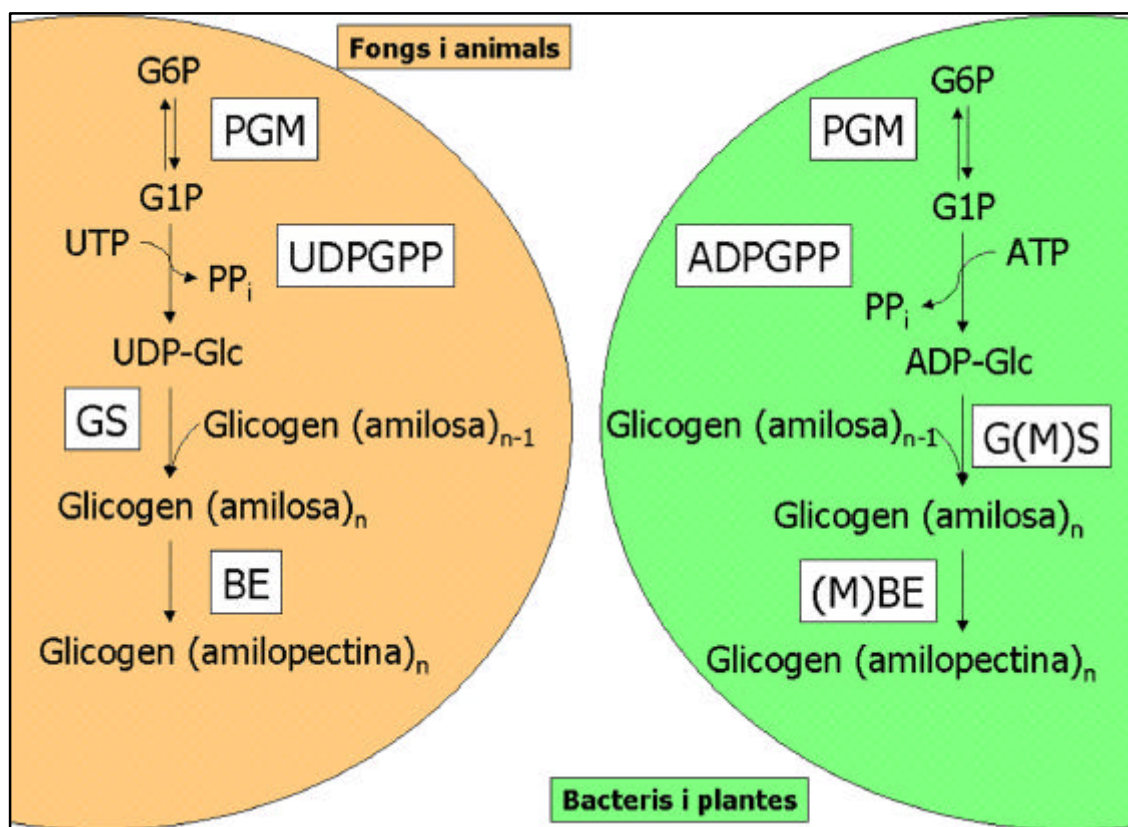
Basant-se en aquests criteris les $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glucà sintases s'han agrupat en dues famílies: les glicogen sintases (GS, família 3 de les glicosiltransferases i que reuneix els enzims d'animals i fongs) i les glicogen (midó) sintases (G(M)S, família 5 on es troben les sintases de midó de plantes i les glicogen sintases de

bacteris i arqueobacteris). Tant les GS com les G(M)S actuen amb retenció de la configuració del carboni C-1 del residu de glucosa transferit, però no hi ha una similitud de seqüència global significativa entre ambdues famílies.

1.1.1. Les glicogen sintases d'animals i fongs (família 3 de glicosiltransferases)

Els enzims d'aquesta família no només comparteixen una identitat de seqüència considerable (45-50 %), si no que a més a més posseeixen dues importants característiques comunes: usen UDP-glucosa com a donador de sucre (Fig. 1), i la seva activitat està altament regulada. La regulació es produeix a dos nivells: inactivació per fosforilació en residus de serina o treonina i una potent activació al·lostèrica per glucosa 6-fosfat que és capaç de contrarestar totalment la inactivació produïda per fosforilació [Villar-Palasi i Guinovart 1997]. Les regions amino i carboxil-terminal de les GS d'animals i fongs són les més variables pel que fa a seqüència i contenen els llocs de fosforilació [Roach et al., 1991]. Dins d'aquest grup les GS de llevat i de mamífer han estat les més estudiades.

Figura 1.1. Esquema de les vies de biosíntesi del glicogen i el midó. Les abreviacions



usades són: ADPGPP, ADP-glucosa pirofosforilasa; G(M)S, glicogen (midó) sintasa; (M)BE, enzim ramificant del midó; UDPGPP, UDP-glucosa pirofosforilasa; GS, glicogen sintasa; BE, enzim ramificant; PP_i, pirofosfat inorgànic.

Saccharomyces cerevisiae presenta dues isoformes de GS, Gsy1p i Gsy2p. La segona isoforma és la que ha rebut més atenció ja que la seva

transcripció està regulada per l'estrès nutricional. [Farkas et al., 1990; Farkas et al., 1991]. Ambdós isoenzims només mostren fosforilació en la regió carboxil-terminal i les seves activitats estan controlades per les condicions extracel·lulars i el cicle cel·lular [Hardy i Roach, 1993].

Els mamífers presenten dues isoformes de GS, la muscular [Zhang et al., 1989] i l'hepàtica [Bai et al., 1990]. Comparteixen característiques com ara la regulació complexa i una alta similitud de seqüència, i difereixen bàsicament en el seu extrem carboxil més llarg en l'enzim muscular. Han estat descrits, fins ara, 9 residus de serina fosforilats en la glicogen sintasa de múscul de conill [Nakielny et al., 1991] [Skurat et al., 1994] [Skurat i Roach, 1995] mentre que l'isoforma hepàtica presenta només 7, ja que no posseeix una zona de l'extrem carboxil on es troben els llocs de fosforilació 1a i 1b [Bai et al., 1990]. En el cas de l'enzim muscular la fosforilació (inactivació) de l'enzim té lloc després de l'acumulació de glicogen i en situacions de dejú. Ambdós controls, l'al·lostèric i el covalent, responen a estímuls metabòlics, principalment la contracció muscular i a senyals hormonals, com la insulina i l'adrenalina [Lawrence et al., 1983].

A més de la regulació de l'activitat enzimàtica de la GS, l'enzim canvia la seva localització subcel·lular segons l'estat metabòlic de la cèl·lula. En absència de glucosa, la GS hepàtica està distribuïda homogèniament pel citoplasma i es dirigeix a la perifèria de l'hepatòcit quan s'inicia la síntesi de glicogen en resposta a un augment de la concentració de glucosa extracel·lular [Fernàndez-Novell et al., 1997] [García-Rocha et al., 2001]. En canvi, l'isoforma muscular fusionada a GFP és al nucli i transloca cap al citoplasma quan els nivells de glucosa augmenten [Ferrer et al., 1997].

L'existència d'un gran nombre d'estudis que tracten de la regulació de la GS contrasta amb la poca atenció que s'ha prestat al mecanisme catalític d'aquest enzim i que roman pràcticament desconegut [Mahrenholz et al., 1988]. Aquesta falta de coneixement s'ha degut principalment a la impossibilitat d'aconseguir cristal·litzar la proteïna per tal de realitzar estudis estructurals.

1.1.2. Les glicogen (midó) sintases de plantes i bacteris (família 5 de glicosiltransferases)

Les G(M)S estan involucrades en la síntesi del midó i el glicogen bacterià. Presenten dues diferències remarcables respecte a la família de les GS: per una banda utilitzen ADP-glucosa com a donador de residus glucosil (Fig.1.1); i no s'ha detectat ni inactivació per fosforilació ni activació al·lostèrica per glucosa 6-fosfat en aquests enzims. De fet, la disponibilitat de

ADP-glucosa és el factor determinant per a la síntesi de midó, ja que la ADP-glucosa pirofosforilasa està altament regulada per factors al·lostèrics tant en plantes com en bacteris [Preiss, 1996].

En molts bacteris, els gens de la via de síntesi i degradació del glicogen estan agrupats en clústers gènics i que contenen a més de la G(M)S, la fosfoglucomutasa (PGM), els enzims ramificant i desramificant, la glicogen fosforilasa i sovint també l'ADPGPP [Romeo et al., 1988; Kiel et al., 1994; Takata et al., 1997; Ugalde et al., 1998; Igarashi i Meyer, 2000]. Les plantes superiors, en comparació amb els bacteris, presenten una multiplicació d'isoformes de G(M)S, i per tant molta més heterogenètat. Aquest conjunt d'enzims han adquirit una major especialització, degut als requeriments d'un organisme pluricel·lular, que normalment implica l'aparició d'isoformes, a més de la localització intraplàstidial de les G(M)S, que requereix d'un pèptid de trànsit.

Gairebé tots els estudis que s'han realitzat tracten de la regulació de la ADP-glucosa pirofosforilasa, que és el pas que exerceix el control de la via metabòlica, deixant en segon terme el mecanisme catalític de la síntesi de $\alpha(1\rightarrow4)$ glucà. L'anàlisi de les seqüències de les G(M)S mostra que totes comparteixen una zona que molt probablement conté el centre catalític, dins del qual apareix una variant del motiu E-X₇-(E) del qual tractarem més detingudament en el capítol 2 [Cid et al., 2000].

1.1.3. Glicogen sintases d'arqueobacteris (família 5 de glicosiltransferases)

La seqüenciació sistemàtica del genomes dels arqueobacteris ha provocat la descoberta de proteïnes hipotètiques similars a les G(M)S, tant per anotació automàtica com per cerques directes mitjançant BLAST, als genomes de *Pyrococcus abyssi* (sotmetiment directe, Genoscope, 1999), *Pyrococcus furiosus* (seqüència genòmica incompleta, Utah Genome Center), *Pyrococcus horikoshii* [Kawarabayasi et al., 1998], *Methanococcus jannaschii* [Bult et al., 1996], *Sulfolobus acidocaldarius* [Cardona et al., 2001], *Sulfolobus solfataricus* [She et al., 2001] i *Sulfolobus tokodaii* [Kawarabayasi et al., 2001]. A més, s'ha detectat glicogen en *Methanococcus methylutens* [Maitra et al., 2001], i la presència de enzims del metabolisme del glicogen en extractes de *Methanobacterium thermoautotrophicum* [Jansen et al., 1982] [Fuchs et al., 1983] i *Methanococcus maripaludis* [Yu et al., 1994].

Una de les característiques més importants dels arqueobacteris, és la hipertermofília d'algunes de les seves espècies, com les del gènere *Pyrococcus*. La termoestabilitat de les proteïnes d'aquests microorganismes les fan unes bones candidates per al seva expressió heteròloga i posterior purificació. Un

clar exemple és l'enzim Pfu, una DNA polimerasa d'alta fidelitat i termoestable, que s'obtingué de *Pyrococcus furiosus*.

Tot i que la seqüència primària de les G(M)S d'arqueobacteris és més semblant a les G(M)S eubacterianes (30-40 % de similitud), i que per tant estan classificades en la mateixa família de glicosiltransferases, s'ha descobert recentment que la G(M)S de *Sulfolobus acidocaldarius* és capaç d'usar UDP-glucosa com a donador de sucre [Cardona et al., 2001]. Aquest fet estaria en consonància amb l'idea de que ambdues famílies de glicosiltransferases, 3 i 5, comparteixen característiques catalítiques i potser també estructurals.

Els objectius d'aquest capítol eren doncs, cercar les similituds entre les glicogen sintases i les glicogen (midó) sintases, extreure'n informació d'estructura secundària, analitzar les seves possibles relacions filogenètiques i finalment trobar una proteïna model de tots aquests enzims per tal d'engegar un futur projecte de expressió heteròloga i determinació d'estructura tridimensional.

1.2. Resultats

1.2.1. Anàlisi de la seqüència primària de les glicogen sintases i les glicogen (midó) sintases

En una primera aproximació es varen alinear diferents seqüències de GS i G(M)S de diversos organismes. Per tal de representar homogèniament tots els grups, s'escolliren les seqüències de la forma següent: totes les seqüències de G(M)S de bacteris i arqueobacteris presents en el clúster d'ortòlegs del NCBI, extraient aquelles que no presentessin cap canvi aminoacídic respecte de les altres, s'inclogueren també totes les seqüències disponibles a les bases de dades de les GS (animals i fongs) i finalment un nombre equivalent de seqüències de diferents G(M)S de distintes plantes superiors.

L'alineament múltiple de totes aquestes seqüències mostrà que existeixen dues zones de major similitud. Una es troba a l'extrem amino i l'altra és interna però propera a l'extrem carboxil. Definim com l'extrem amino el de les GS i les G(S)S de bacteris i arqueobacteris, ja que algunes G(S)S de plantes tenen dominis previs afegits relacionats amb la seva unió a estructures subcel·lulars com ara els grànuls de midó, o bé les seqüències que contenen el pèptid de trànsit als plastidis (l'alineament complet es mostra en l'annex A).

Aquesta primera zona conté el motiu K-X-G-G, ja descrit a la bibliografia, [Mahrenholz et al., 1988 ; Tagaya i Fukui, 1987] que estaria involucrat en la unió al glucòsid de nucleòtid. Cal fer esment que aquest motiu

està conservat en gairebé totes les proteïnes escollides i els canvis aminoacídics presents són conservatius.

La segona zona, situada en l'interior de la proteïna però prop del extrem carboxil, té com a característiques principals la conservació de tres residus en totes les proteïnes: una serina, un àcid glutàmic i una glicina. En aquest cas existeix una clara homogenitat entre les GS d'una banda i les G(M)S d'altra. Aquesta zona és també la més conservada dins de cada família i per tant candidata a contenir residus importants per a la catàlisi (veure cap. 2).

Tot i aquesta alta conservació dins de cada família, en les G(M)S d'arqueobacteris s'aprecia una major semblança amb les GS que amb la resta d'enzims de la seva família. Els consenus del segment central d'aquesta zona de les GS i les G(M)S d'arqueobacteris es mostra en la fig. 1.2. Aquests consenus presenten un motiu, que consisteix en dos residus d'àcid glutàmic separats per 7 aminoàcids i anomenarem E-X₇-E, que ja s'havia descrit a la en les glicosiltransferases de la família 4 [Geremia et al., 1996].

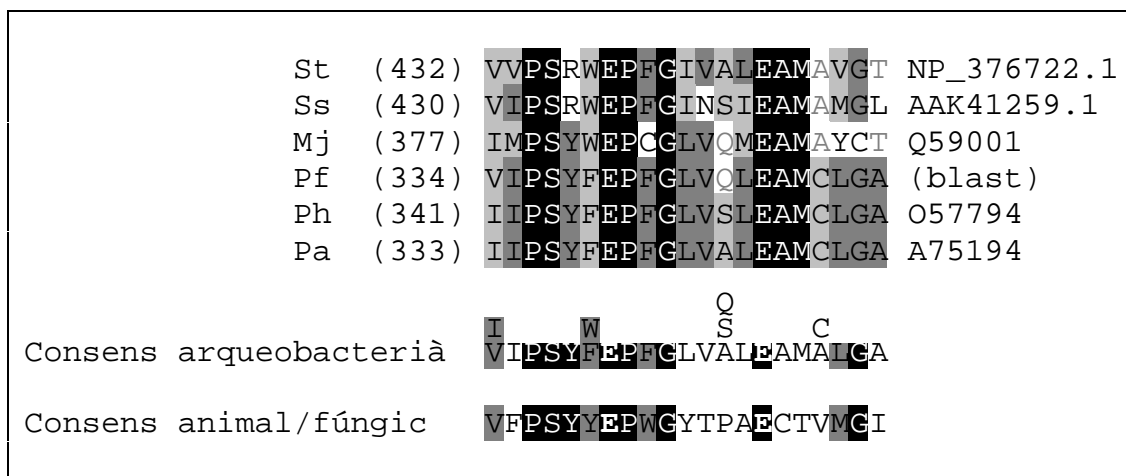


Fig. 1.2. Fragment de l'alineament múltiple de les G(M)S d'arqueobacteris predites al voltant del motiu E-X₇-E. L'alineament s'obtingué localment mitjançant CLUSTAL W. També es mostren els consenus de seqüència de les GS d'animals i fongs. El dos residus d'àcid glutàmic conservats apareixen en negreta. Les abreviacions usades són: St, Sulfolobus tokodaii; Ss, Sulfolobus solfataricus; Mj, Methanococcus janaschii; Pf, Pyrococcus furiosus; Ph, Pyrococcus horikoshii i Pa, Pyrococcus abyssi. Els nombres entre parèntesis corresponen al primer aminoàcid mostrat de cadascuna de les proteïnes. Els nombres d'accés s'indiquen a la dreta a excepció de l'enzim de Pyrococcus furiosus (la seqüència s'obtingué per BLAST del genoma).

Malgrat les semblances que mostra l'alineament múltiple, s'evidencia la major similitud entre les G(S)S, mentre que les seqüències de les GS són molt homogènies entre elles. A més, apareixen segments de seqüència en les GS que no corresponen amb les altres proteïnes produint salts en l'alineament.

L'arbre filogenètic resultant d'aquest alineament múltiple revelà que les GS estan agrupades i són evolutivament molt properes. Contràriament les G(M)S, tot i presentar zones d'alta similitud entre totes elles, són molt diverses i es divideixen principalment en sis grups: tres corresponen a diferents isoformes de midó sintases de plantes superiors, dos a les G(M)S de bacteris i les G(M)S arqueobacteris que queden associades a les glicogen sintases d'animals i fongs (Fig. 1.3.).

Així doncs existien motius de seqüència compartits per les GS i les G(M)S i una possible relació evolutiva entre les glicogen midó sintases d'arqueobacteris i les GS, com suggereix l'arbre filogenètic. Es corrent que les semblances entre protèines relacionades siguin encara més clares a nivell d'estructura secundària. Degut a la absència d'informació sobre l'estructura tridimensional d'aquestes protèines s'utilitzà el programa Jpred² per tal de predir i comparar les estructures secundàries de la glicogen sintasa de múscul humà i de les G(M)S de *Pyrococcus abyssi* i *Escherichia coli*.

1.2.2. Característiques de l'estructura secundària predita de les $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucà sintases

La comparació de les estructures secundàries predites de les glicogen (midó) sintases de *Pyrococcus abyssi*, *Escherichia coli* i la GS múscul humà (HsMGS) revelen la presència de cinc regions de característiques similars (fig 1.5.).

La regió que anomenarem I es troba a la zona amino terminal d'aquestes protèines i està formada per una hèlix α seguida d'una cadena β , una altra hèlix α i quatre cadenes β addicionals. Val a dir que en el cas de la HsMGS la primera hèlix α i la primera cadena β són més curtes i que la seqüència intercalar conté els dos llocs de fosforilació amino-terminal (2 i 2a) [Skurat et al., 1994], que no es troben en les altres glicosiltransferases ni tampoc en la GS de llevat. Es possible que aquesta regulació covalent a la regió amino-terminal hagi estat adquirida en els enzims dels metazous ja que no es troba ni en les G(M)S ni en les GS de fongs i en canvi sí que apareixen serines en la zona corresponent de les sintases de nematodes i de *Drosophila melanogaster*.

La regió II, constituïda per una sèrie alternada α - β - α - β , està unida directament a la regió I en les G(M)S i per un petit segment en la HsMGS. En aquesta protèina també es troba un altre element d'estructura secundària, en aquest cas una hèlix α , entre les regions II i III que és absent en els altres enzims.

A diferència de les dues regions anteriors, la regió III de la G(M)S de *Pyrococcus abyssi* presenta una major similitud amb la HsMGS que amb la zona corresponent de la G(M)S d'*Escherichia coli*. Aquesta regió es compon de dues hèlices α seguides d'una cadena β , una hèlix α i una altra cadena β . En la proteïna bacteriana una de les primeres hèlices es substitueix per una cadena β i a més l'última hèlix α està partida en dues.

La regió IV és molt similar per als tres enzims i consisteix en una hèlix α seguida d'una cadena β . De nou, un segment addicional connecta les regions III i IV de la HsMGS, i que en canvi no es troba en ambdues G(M)S. Això mateix ocorre entre les regions IV i V, que mostren una estructura secundària predita molt similar entre les dues G(M)S, però distinta de la zona corresponent de la HsMGS.

Finalment, la regió V, que representa l'extrem carboxil de les dues G(M)S, està format per dues o tres hèlices α que contenen entre 50 i 60 aminoàcids. Les GS, a més a més, posseeixen un extrem addicional no estructurat (ric en prolines) que conté els llocs de fosforilació, aquesta característica podria tractar-se de nou d'una adquisició evolutiva posterior.

Totes les proteïnes estudiades presenten un clúster ric en arginina en una posició equivalent dins la regió V. En les GS de mamífers i llevats aquests residus d'arginina estan implicats en la transducció intramolecular de l'activació alostèrica per glucosa 6-fosfat [Pederson et al., 2000; Hanashiro i Roach, 2002]. Tot i que només està conservada la presència d'aquest clúster i no la posició exacta de les arginines, podríem hipotetitzar que aquesta regió ja existia en una possible proteïna ancestral i que va ser parcialment modificada per tal d'acomplir els requeriments de regulació de les GS.

Existeixen també similituds al comparar les regions IV i V amb l'estructura secundària de les glicosiltransferases T4 β GT (no classificada) [Morera et al., 2001], GtfB (família 1) [Mulichak et al., 2001] i MurG (família 28) [Ha et al., 2000] (només es mostra l'enzim T4 β GT en la fig. 1.4).

Aquestes proteïnes són funcionalment molt diferents de les GS i les G(M)S: inverteixen la configuració del carboni anomèric del donador de sucre i a més les seves especificitats són molt diverses: T4 β GT glucosila DNA en residus de 5-hidroximetilcitosina [Tomaschewski et al., 1985], MurG transfereix N-acetilglucosamina (GlcNAc) de l'UDP-GlcNAc a l'àcid N-acetilmuràmic unit mitjançant pirofosfat a l'undecaprenol [Crouvoisier et al., 1999] i GtfB utilitza UDPG per glucosilar l'aglicona de la vancomicina [Aoki et al., 1986].

Figura 1.3. Arbre filogenètic resultant de l'alineament múltiple de les GS i les G(M)S.

L'arbre es calculà localment mitjançant l'algoritme del neighbor joining [Saitou i Nei, 1987]. El fons acolorit agrupa els enzims segons l'organisme al que pertanyen: en verd, plantes i algues; en groc, arqueobacteris; en morat, fongs; en vermell: animals; en blau: bacteris. Les seqüències s'indiquen mitjançant el seu nombre d'accés en les bases de dades: VC1726: GS de *Vibrio cholerae*; UGST_WHEAT: G(M)S unida a grànuls de *Triticum aestivum*; UGST_SORBI: G(M)S unida a grànuls de *Sorghum bicolor*; UGST_MAIZE: G(M)S unida a grànuls de *Zea mays*; UGST_ORYGL: G(M)S unida a grànuls de *Oryza glaberrima*; Q43012: : G(M)S unida a grànuls de *Oryza sativa*; UGST_MANES: G(M)S unida a grànuls de *Manihot esculenta*; UGST_ANTMA: G(M)S unida a grànuls de *Antirrhinum majus*; AF210699_1: G(M)S unida a grànuls de *Perilla frutescens*; BAA82346: G(M)S unida a grànuls I de *Phaseolus vulgaris*; AAC70779: G(M)S unida a grànuls d'*Astragalus membranaceus*; CAC69955: G(M)S unida a grànuls de *Pisum sativum*; AF433156_1: G(M)S unida a grànuls I de *Chlamydomonas reinhardtii*; UGS3_SOLTU: G(M)S de *Solanum tuberosum*; O65365: G(M)S d'*Ipomoea batatas*; AF1739900_1: G(M)S unida a grànuls II de *Manihot esculenta*; O48900: isoforma zSSII-2 de G(M)S de *Zea mays*; AF395537_1: G(M)S soluble II-2 d'*Oryza sativa*; O48899: isoforma zSSII-1 de G(M)S de *Zea mays*; O64926: G(M)S soluble de *Chlamydomonas reinhardtii*; AF383878_1: G(M)S soluble II-1 d'*Oryza sativa*; UGS2_WHEAT: G(M)S soluble de *Triticum aestivum*; AF234163_1: G(M)S I d'*Hordeum vulgare*; O49064: G(M)S I de *Zea mays*, AAD45815: G(M)S soluble de *Sorghum bicolor*; O24206: G(M)S soluble d'*Oryza sativa*; UGS2_SOLTU: G(M)S soluble de *Solanum tuberosum*; Q9SEI7: G(M)S soluble d'*Arabidopsis thaliana*; UGS4_SOLTU: G(M)S soluble de *Solanum tuberosum*; O64293: G(M)S DULL1 de *Zea mays*; AF432915_1: G(M)S III d'*Oryza sativa*; sll1393: G(M)S de *Synechocystis* ssp.; NP_484075: G(M)S de *Nostoc* sp. PCC 7120; CT798: G(M)S de *Clamydia trichomatis*; AAF39055: G(M)S de *Chlamydia muridarum*; BAA99156: G(M)S de *Chlamydomonada pneumoniae* J138; O64927: G(M)S soluble de *Clamydia reinhardtii*; PH0069: G(M)S de *Pyrococcus horikoshii*; PAB2292: G(M)S de *Pyrococcus abyssi*; CAC08537: G(M)S de *Sulfolobus acidocaldarius*; AAL64907: G(M)S de *Pyrobaculum aerophilum*; MJ1606: : G(M)S de *Methanococcus janaschii*; GYS_NEUCR: GS de *Neurospora crassa*; GYS2_YEAST: GS 2 de *Saccharomyces cerevisiae*; GYS1_YEAST: GS 1 de *Saccharomyces cerevisiae*; GYS_DROME: GS de *Drosophila melanogaster*; GYS2_RAT: GS de fetge de *Rattus norvegicus*; GYS2_HUMAN: GS de fetge d'*Homo sapiens*; GYS1_RABIT: GS de múscul d'*Oryctolagus cuniculus*; GYS1_HUMAN: GS de múscul d'*Homo sapiens*; GYS1_MOUSE: GS de múscul de *Mus musculus*; GYS_CAEEL: GS de *Caenorhabditis elegans*; AAK28335: GS de *Steinernema feltiae*; TM0895: G(M)S de *Thermotoga maritima*; aq_721: G(M)S d'*Aquifex aeolicus*; L98347: G(M)S de *Lactococcus lactis*; BAB79770: G(M)S de *Clostridium perfringens*; BS_glgA: G(M)S de *Bacillus subtilis*; BH1085: G(M)S de *Bacillus halodurans*; sll0945: G(M)S de *Synechocystis* ssp.; DR0594: G(M)S de *Deinococcus radiodurans*; PM0544: G(M)S de *Pasturella multocida*; HI1360: G(M)S d'*Haemophilus influenzae*; glgA: G(M)S d'*Escherichia coli*; GLGA_RHITR: G(M)S de *Rhizobium tropici*; GLGA_AGRTU: G(M)S d'*Agrobacterium tumefaciens*; CAC47425: G(M)S de *Sinorhizobium meliloti*; BAB54020: G(M)S de *Mesorhizobium loti*; CAC49811: G(M)S (codificada en el plasmidi de simbiosi pSymB) de *Sinorhizobium meliloti*; CAD17393: G(M)S de *Ralstonia solanacearum*; AE004643_6: G(M)S de *Pseudomonas aeruginosa*.

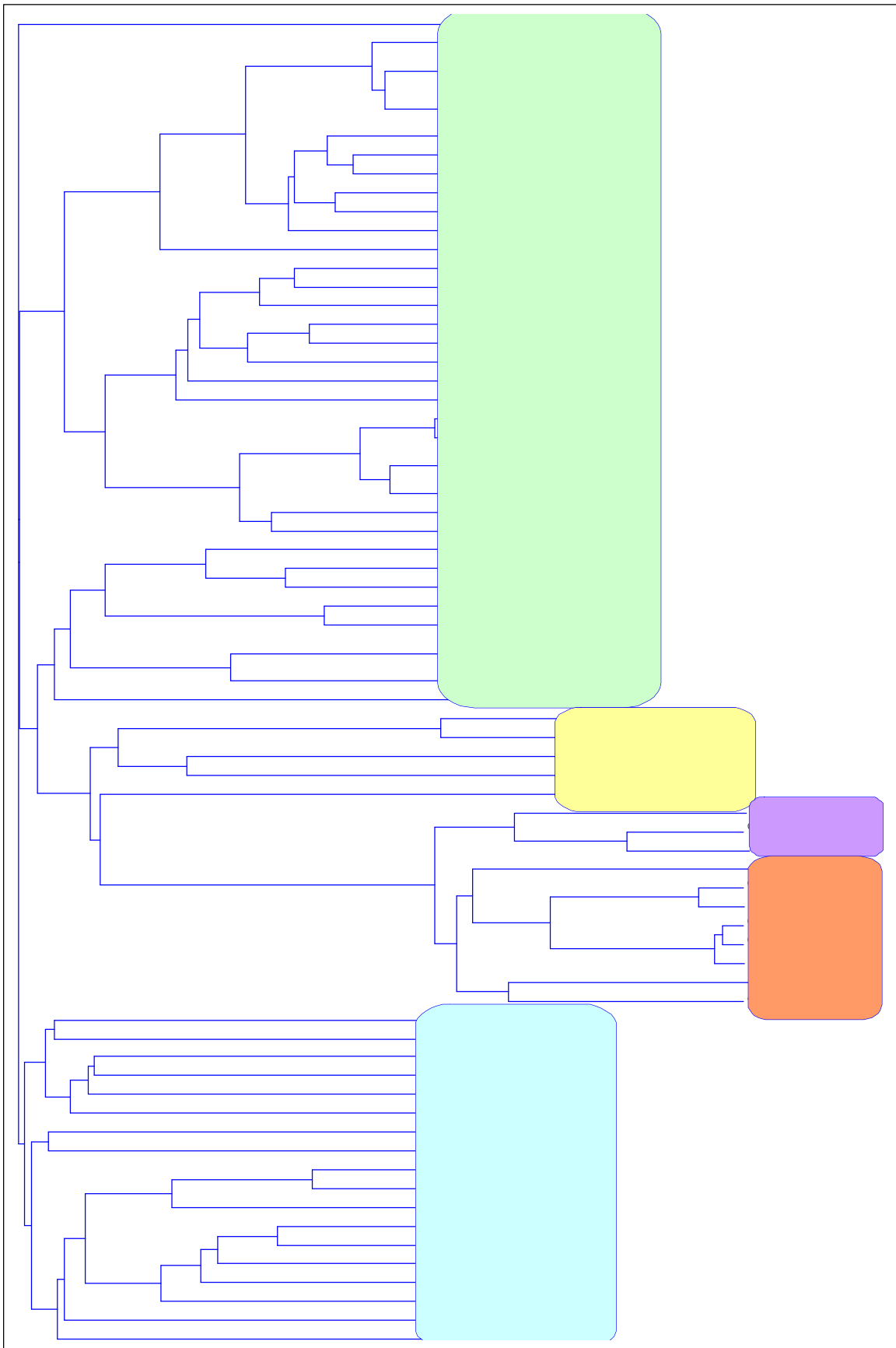
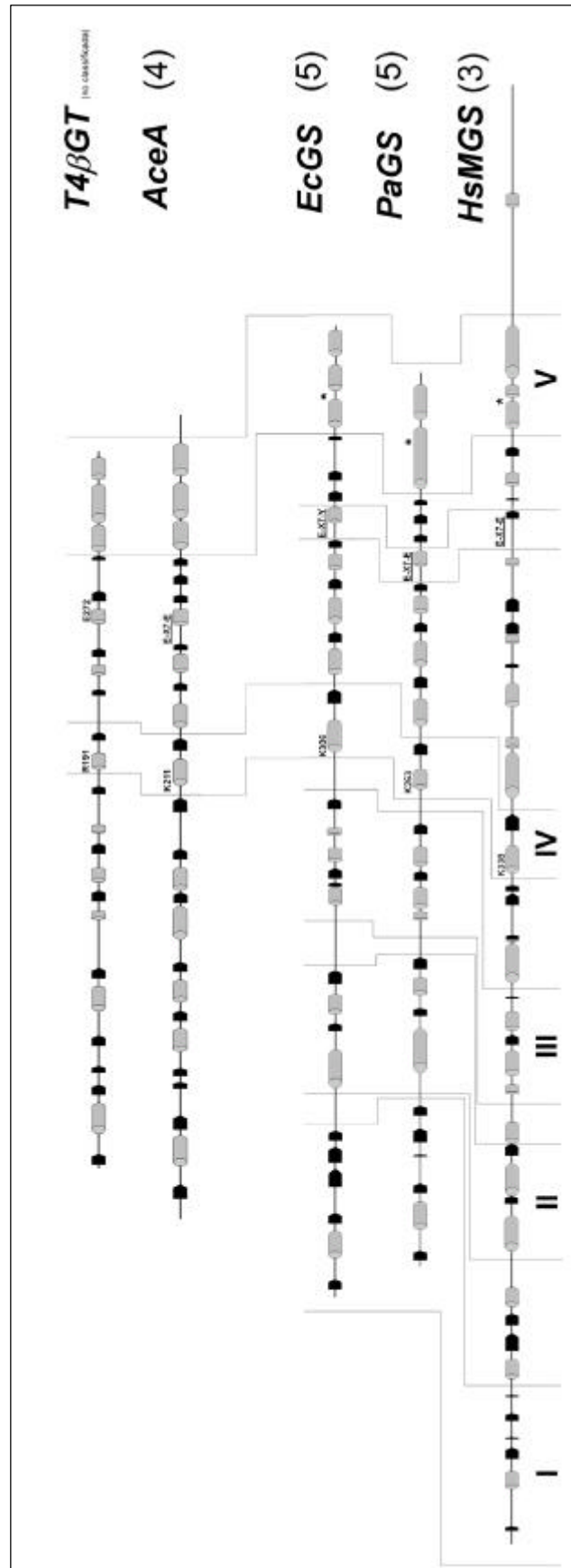


Figura 1.4. Predicció d'estructura secundària de la GS d' Homo sapiens (Hs MGS), les G(M)S d'Escherichia coli (EcGS), Pyrococcus abyssii (PaGS) i la manosiltransferasa d'Acetobacter xylinium Ace A i l'estructura secundària real de la glicosiltransferasa del bacteriofag T4 (T4bGT). La predicció d'estructura secundària s'obté del servidor Jpred² i es realitzà sobre el resultat d'una anàlisi BLAST automàtica després d'eliminar les seqüències redundants. La predicció d'estructura secundària representa com a mínim 99, 49, 8 i 80 proteïnes de seqüència similar, respectivament, per a cada enzim. La posició del residu de lisina de la regió III es confirma mitjançant l'ús dels gràfics d'anàlisi de clústers hidrofòbics. Els cilindres grisos representen hèlices α i les fletxes negres cadenes β . En el cas de la T4 β GT només es mostren les hèlices α i les cadenes β canòniques. Els nombres entre parèntesis indiquen la família de glicosiltransferases de cada proteïna.



Aquests enzims, que han estat cristal·litzats i resolts estructuralment, presenten dos dominis: el domini carboxil-terminal està implicat en la unió del donador de residus glicosil i a l'amino-terminal se li assigna el paper d'unió a l'acceptor.

Dins la regió IV de les G(M)S i la HsMGS, hi ha un residu de lisina just abans o a l'inici d'una hèlix α , aquesta disposició l'assimila a la Arg¹⁹¹ de T4 β GT, que està implicada en la unió al fosfat α del donador de sucre [Morera et al., 2001], i al loop-G 3 de MurG per al qual es proposa la mateixa funció [Ha et al., 2000]. Aquest residu de lisina (Lys³²⁵) juntament amb una arginina propera (Arg³¹⁹) han estat mutades a alanina en la Gsy2p, i l'enzim resultant mostrà únicament un 0.2% de la activitat de la proteïna salvatge. [Pederson et al., 2000].

La estructura secundària predita de la regió V de les G(M)S i les GS és també molt similar a la estructura secundària coneguda de la zona corresponent de les glicosiltransferases esmentades abans. És interessant destacar que en l'estructura terciària de MurG, T4 β GT i GtfB la tercera hèlix d'aquesta regió interacciona amb el domini amino-terminal. En el cas de MurG aquesta hèlix contacta amb l'hèlix α 1 i les cadenes β 4, β 5, β 6 and β 7 del domini amino-terminal. Una disposició espacial similar de la HsMGS reuniria els llocs de fosforilació amino i carboxil-terminals, que intervenen en el control de la seva activitat.

En l'apartat anterior esmentàvem la presència del motiu E- X₇-E en les GS i les G(M)S. Una variant d'aquest motiu es pot trobar en una posició equivalent en T4 β GT i MurG, però en ambdós casos només el segon glutàmic està conservat. El paper d'aquest residu es coneix únicament per a T4 β GT (Glu²⁷²), i és el de formar un pont d'hidrogen amb la ribosa del donador de sucre. L'estructura secundària predita al voltant d'aquest motiu és diferent per a la HsMGS, però això es degut a la presència d'un residu de prolina just abans el primer residu de glutamat. Aquesta característica també es troba en totes les G(M)S d'arqueobacteris (Fig. 1.3.), però degut a la similitud de la GS arqueobacteris amb un nombre major de glicosiltransferases, la predicció generà un consensus sense aquesta prolina i idèntic a la G(M)S de E. coli. Així doncs, malgrat que probablement existeix un alta similitud estructural en aquesta zona entre les G(M)S d'arqueobacteris i les GS, aquest fet no queda reflectit en la predicció.

La família 4 de glicosiltransferases comprèn més de 300 proteïnes, que funcionen amb retenció de configuració, i està format per un grup heterogeni ja que els enzims que la componen catalitzen reaccions entre substrats molt diversos. Malgrat que catalitzen reaccions de transferència glicosídica molt variades, estan molt relacionades amb les famílies 3 i 5. Com a representant

de les glicosiltransferases de la família 4, que contenen el motiu E-X₇-E s'ha inclòs en la figura 1.4. l'estructura secundària predita de la proteïna AceA. S'observa la gran similitud de les regions IV i V d'aquesta proteïna amb la resta d'enzims representats. A diferència de la relació que existeix entre les famílies 3 i 5, en la que la funció bàsica de la superfamília, que és la síntesi d' α 1 \rightarrow 4-glucà, s'ha conservat, la mateixa estructura global ha estat utilitzada per la família 4 per encarregar-se de catalitzar diferents reaccions amb substrats diversos.

1.2.3. Anàlisi del genoma de *Pyrococcus abyssi* i clonatge de la PaG(M)S

L'anàlisi filogenètic mostrava que de totes les G(M)S, les d'arqueobacteris eren les més properes a les GS. De totes elles la de *Pyrococcus abyssi* era la de mida més reduïda i a més al provenir d'un organisme hipertermòfil la feien molt atractiva a l'hora de considerar una possible expressió heteròloga.

Abans de procedir al clonatge del gen que codifica per a la G(M)S de *Pyrococcus abyssi* es decidí estudiar si en aquest organisme existia un operó del glicogen tal i com ocorre en molts bacteris. Així doncs primer es varen identificar totes les seqüències anotades en el genoma de *Pyrococcus abyssi* com a enzims que pertanyien al metabolisme del glicogen. El marc obert de lectura que contenia el gen que codificava la PaGS es trobava sota l'assignació PAB 2292 i la glicogen fosforilasa que pertany a la família 35 constava com a PAB 2414. En canvi eren absents candidats clars per als enzims ramificant i desramificant del glicogen. El fet que els arqueobacteris també presentin operons com els bacteris feia recomanable dur a terme una anàlisi amb més deteniment de la zona adjacent a la PaGS.

Per tant, malgrat que la anotació no indicava la existència d'un clúster gènic implicat en la síntesi de glicogen en Pa, van estudiar-se les seqüències que flanquejaven la mateixa cadena codificant de la GS, traduint en tots tres marcs oberts de lectura, mitjançant el programa de cerca de marcs oberts de lectura ORFinder, i sotmetent la estructura primària a una anàlisi de similitud de tipus tBLASTn amb baix grau d'astringència. Malgrat això no apareixen proteïnes semblants a les trobades en un operó de glicogen de tipus bacterià (GS, GP, BE, DBE, PGM, ADPGPP).

Les proteïnes adjacents no presenten homologia amb cap proteïna de funció coneguda (PAB2291/2289/2293) o bé realitzarien funcions que no semblen tenir relació amb la síntesi i degradació del glicogen (PAB2288 proteïna relacionada amb la síntesi de molibdopterina, PAB2294 relacionada amb la L-asparaginasa) (Fig. 1.5.).

Es va comparar aquesta estructura genòmica amb la que presentava *Pyrococcus furiosus*, també anotada, i es comprovà l'existència d'una organització idèntica amb les mateixes proteïnes. En canvi *Methanococcus janaschii* tot i que posseeix GS no conserva aquestes proteïnes al seu voltant.

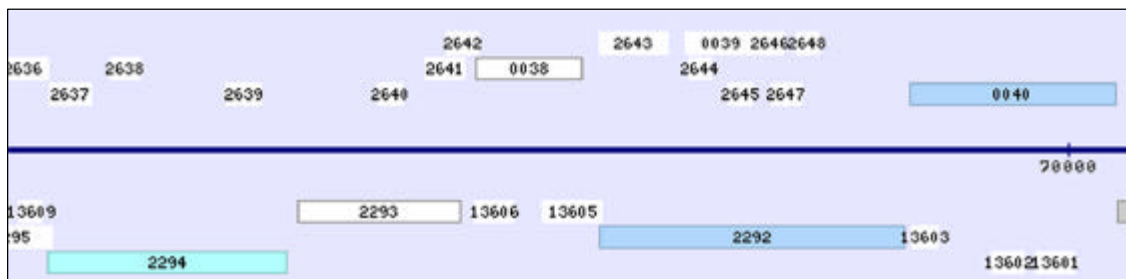


Figura 1.5. Estructura genòmica de *Pyrococcus abyssi* als voltants de la glicogen sintasa. El marc obert de lectura 2292 va ser anotat com a glicogen sintasa i en la mateixa orientació es troben els marcs oberts de lectura 2293, corresponent a una proteïna hipotètica de funció desconeguda, i el 2294, que codificaria per a una proteïna semblant a la L-asparaginasa.

Així doncs en el gènere *Pyrococcus* aquesta organització es mantenia.

També va estudiar-se l'existència de les pirofosforilases de l'ADP i l'UDP-glucosa i de fosfoglucomutasa (PGM). Mentre que l'UDPGPP (PAB0771) era clarament identificable, no existia un candidat clar per a la ADPGPP, tot i que apareixien moltes NDP-sucres pirofosforilases putatives. L'UDPGPP es troba en un clúster organitzat juntament amb proteïnes relacionades amb la síntesi d'exopolisacàrids; adjacents a aquest enzim es troben: l'UDPG deshidrogenasa (PAB0770), una glicosiltransferasa que opera amb inversió de configuració (PAB0772), una acetiltransferasa putativa (PAB0773), etc...

La PGM es trobava anotada com a fosfomanomutasa (PMM) tot i que en bacteris aquest enzim és bifuncional i també posseeix activitat PGM [Videira et al., 2000]. Aquest marc obert de lectura es troba en una altra zona del genoma distant tant de la GS com de la GP i les NDP-sucres pirofosforilases. Quant a la GP també s'analitzaren les proteïnes adjacents i tots els marcs oberts de lectura propers eren assignats a proteïnes hipotètiques de funció desconeguda.

Així doncs restava estudiar la presència d'enzims amb capacitat $\alpha(1\rightarrow4)$ endoglucanasa per tal d'identificar tant l'enzim ramificant com el desramificant. Les úniques proteïnes putativament capaces de ramificar i desramificar polisacàrids (tot i no posseir similitud clara amb els enzims bacterians o eucariotes) es trobaren incloses en un possible operó de maltosa que va estudiar-se amb més deteniment.

Aquest clúster comptava amb quatre proteïnes típiques d'un sistema de transport bacterià ABC. Una proteïna receptora (malE), un transportador (malC) i una permeasa (malG) a més d'una quinasa que promouria el transport mitjançant hidròlisi d'ATP. Així les seqüències aminoacídiques de amy-a i apu (les dues glicosilhidrolases) van ser introduïdes en un programa de predicció de localització subcel·lular per a bacteris (G+) (PSORT <http://psort.nipp.ac.jp>.) Mentre que amy-a va ser considerada citoplasmàtica, apu resultà considerada com a transmembranal. Aquests resultats i el fet que es trobessin associades a un operó de maltosa, suggereix que apu estaria implicada en la degradació de polisacàrids externs per tal de formar maltosa i segurament amy-a ja dins la cèl·lula hidrolitzaria aquesta maltosa en glucosa per a la seva incorporació al metabolisme central.

Finalment i donades les característiques hipertermofíliques de *P. abyssi* i la semblança a nivell d'estructura secundària de la seva G(M)S amb les GS d'animals i fongs, es decidí clonar-la per tal d'estudiar la possibilitat de la seva expressió heteròloga.

Es disposava en el laboratori del genoma de *P. abyssi*, cedit pel Dr. Guerrero, i per tant es decidí clonar el marc obert de lectura PAB 2292. Es dissenyaren un oligonucleòtids específics per tal d'amplificar-lo a partir del genoma i s'utilitzà la PCR amb l'enzim Pfu per tal de minimitzar els errors durant l'amplificació. El producte de la reacció era molt específic ja que s'obtingué únicament una banda en el gel d'agarosa i presentava el pes molecular esperat de 1326 bp (Fig. 1.6.). Aquest fragment de DNA es purificà mitjançant una reacció d'intercanvi iònic i el DNA fou clonat en l'interior del vector pGFPCR, que utilitza la GFP com a marcador d'inserció. Diferents colònies van ser analitzades i aquelles que no presentaven senyal fluorescent es feren créixer, s'afegí el DNA plasmídic i s'analitzà per restricció la presència de l'insert. S'escollí una colònia positiva i es va realitzar una preparació a gran escala de DNA plasmídic. Per acabar es comprovà per seqüenciació el clonatge específic del marc obert de lectura PAB2292 i l'absència d'errors en la seqüència.

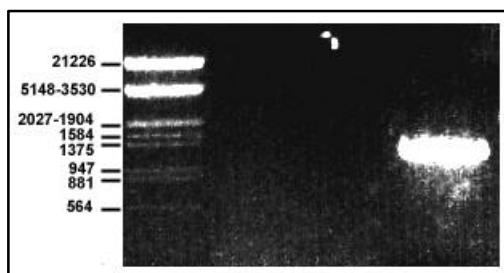


Fig. 1.6. Clonatge de la G(M)S de *Pyrococcus abyssi*. La imatge mostra un gel d'agarosa al 1% amb el producte de la PCR usant el DNA genòmic de *P. abyssi* com a motlle i els oligonucleòtids Pya-UP i Pya-DN. La banda resultant correspon al marc obert de lectura de la G(M)S. A l'esquerra es mostren els marcadors de pes molecular Lambda EcoRI/HindIII en bp.

1.3. Discussió

Els nostres resultats, juntament amb d'altra informació disponible en la bibliografia, indica que les GS (família 3) i les G(M)S (família 5) comparteixen un mecanisme catalític similar i que les diferències observades en els seus productes es deuen principalment als diferents contextos biosintètics en que s'inclouen. La major diferència entre ambdues famílies és la major complexitat de les GS, que es deu bàsicament a l'adquisició d'una regulació complexa. Això es reflexa clarament en la seva seqüència primària però en canvi, és menys palès en l'estructura secundària predita.

La similitud de les estructures secundàries, la presència d'aminoàcids conservats implicats en la unió a substrats i en catàlisi i el fet que tots aquests enzims catalitzin la mateixa reacció dona arguments a favor de l'agrupació de les famílies 3 i 5 en una "superfamília". Aquesta proposta podria considerar-se obvia, però durant molts anys les midó sintases juntament amb les glicogen sintases de bacteris han estat estudiades i considerades a part de les glicogen sintases de mamífers o de llevat.

Seria, doncs, interessant estudiar amb més deteniment les seves relacions estructurals.

Tenint en compte les similituds existents sembla raonable assumir que la regulació de les GS ha estat adquirida partint de proteïnes no regulades, utilitzant i reordenant elements estructurals preexistents. És interessant destacar que alguns dominis involucrats en la regulació alostèrica de les GS per glucosa 6-fosfat també estan presents en les glicogen (midó) sintases que no estan regulades. Això permet proposar la hipòtesi que aquests dominis involucrats en la transducció intramolecular estan sempre "encesos" en les G(M)S, mentre que estan "apagats" en les GS animals i de fongs, esperant la senyal d'activació. De fet mutacions dels clústers rics en arginines de Gsy2p i de la MGS de conill eliminen completament la regulació alostèrica [Pederson et al., 2000; Hanashiro i Roach, 2002].

Sense discutir l'origen filogenètic d'aquestes proteïnes, és raonable veure en les G(M)S d'arqueobacteris el nexa entre les GS i les G(M)S. Comparteixen propietats catalítiques de les glicosiltransferases de les famílies 3 i 5 i algunes de les seves característiques estructurals es troben conservades en una, l'altra o ambdues famílies. Tot això ens condueix a proposar que només existeix un tipus d'enzim per a l'allongament dels $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucans, i que d'entre totes les proteïnes de la superfamília, la de *Pyrococcus abyssi*, que és la de mida menor, representaria la unitat catalítica mínima per a aquest tipus de reacció enzimàtica.

Donada la falta d'informació tridimensional de les glicosiltransferases amb retenció i molt especialment de la HsMGS, en el laboratori feia temps que s'havia encetat un projecte per tal d'expressar aquesta proteïna heteròlogament. Tots els estudis iniciats no han donat, fins al moment, fruits i com d'altres investigadors no s'han assolit ni la quantitat ni puresa necessàries per tal abordar una possible cristal·lització d'aquest enzim. El treball aquí presentat mostra que la G(M)S de *P. abyssii* presentaria característiques similars a la de la GS humana, tant a nivell bioquímic com estructural i que seria un bon model per a totes les α (1 \rightarrow 4)-glucà sintases. Si a més afegim les característiques hipertermofíliques de l'organisme, probablement les etapes de purificació en un sistema com *E. coli* siguin molt favorables.

A l'hora de clonar la G(M)S de *P. abyssii*, s'aprofitaren les dades disponibles sobre el seu genoma per tal d'estudiar si existia un operó del glicogen en aquest organisme tal i com existeix en bacteris. Els resultats indicaren que aquesta organització no apareix en els arqueobacteris estudiats i que les proteïnes encarregades d'una possible ramificació i desramificació del glicogen o bé són molt diferents a les bacterianes i s'escapen a una identificació per similitud de seqüència, o bé no existeixen.

Si *P. abyssii* no compta amb aquestes activitats enzimàtiques el polisacàrid sintetitzat per la G(M)S seria no ramificat i per tant produiria amilosa. Aquest carbohidrat posseeix una disposició helicoidal gràcies a la formació d'un patró regular de ponts d'hidrogen i és més estable que el glicogen. Es pot hipotetitzar que l'amilosa seria capaç de suportar millor les altes temperatures ambientals en les que viu l'organisme.

Capítol 2

2. Identificació de residus essencials de la glicogen sintasa de múscul humà

2.1. Introducció

La glicogen sintasa (GS) és una glicosiltransferasa que, segons les normes de l'Enzyme Commission, rep el nombre EC 2.4.1.11. Les glicosiltransferases junt amb les glicosilhidrolases catalitzen la transferència de residus glicosídics des d'un sucre donador a un acceptor. En el cas de les hidrolases, aquest acceptor és una molècula d'aigua, mentre que en les transferases es tracta, normalment, d'una cadena naixent de carbohidrat. Tot i així d'altres compostos poden ésser acceptors de les glicosiltransferases, com ara proteïnes i lípids, esdevenint glicoproteïnes i glicolípid, respectivament, i també d'altres molècules diverses formant glicoconjugats (bilirubina, flavonones, carotenoids...) [Davies et al., 1998]. Alhora les glicosiltransferases se subdivideixen segons la natura del donador glicosídic: nucleòtid fosfosucre (tipus Leloir), o bé oligosacàrids. En ambdós casos, la reacció que catalitzen és una substitució en el carboni anomèric d'un sucre i aquesta substitució transcorre bé amb retenció o bé amb inversió de la configuració del centre quiral. Així doncs, les glicosiltransferases es classifiquen, segons l'estereoquímica del producte resultant, en enzims amb retenció de la configuració (si respecten l'estereoquímica del sucre donador) o amb inversió de la configuració (si aquesta s'inverteix).

La GS catalitza el pas limitant de la síntesi de glicogen en animals i fongs. En mamífers s'han descrit dues isoformes principals, l'isoenzim muscular [Browner et al., 1989] que s'expressa en la majoria dels teixits [Kaslow i Lesikar, 1984] i l'isoforma hepàtica [Bai et al., 1990], que sembla ser específica d'aquest teixit [Kaslow et al., 1985]. La GS aconpleix un paper molt important en l'homeòstasi i en el metabolisme de la glucosa i una disminució o absència de la seva activitat enzimàtica està associada amb algunes malalties metabòliques com ara la diabetis mellitus [Thornburn et al., 1991][Bak et al., 1992] i la malaltia d'emmagatzematge de glicogen tipus 0 [Orho et al., 1998].

Les GS de mamífers catalitzen la transferència d'un residu de glucosa des de l'UDP- α -glucosa a una cadena creixent de glicogen mitjançant un enllaç $\alpha(1\rightarrow4)$. L'estereoisomeria de l'enllaç glicosídic resultant és la mateixa que la del nucleòtid fosfosucre donador, per tant la GS és una glicosiltransferasa de tipus Leloir i amb retenció de la configuració. El decurs de la reacció, tal i com ocorre en les glicosilhidrolases [Sinnott, 1990], determina la presència de dos aminoàcids catalítics, per tal de permetre un mecanisme de doble desplaçament. D'acord amb aquest model, aquest residu han de situar-se propers dins del centre actiu de l'enzim [Koshland 1953; Saxena et al., 1995].

Tot i que molts gens que codifiquen per a glicosiltransferases han estat seqüenciats i expressats de forma recombinant, no s'ha resolt cap estructura tridimensional d'una glicosiltransferasa amb retenció, ni per cristal·lografia de raigs X ni per espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear. Les úniques estructures conegudes actualment són les de la β -galactosiltransferasa del bacteriòfag T4 [Vrieling et al., 1994], la hipotètica nucleòtid-difosfosucre transferasa SpsA de *Bacillus subtilis* [Charnock i Davies, 1999], el domini catalític de la β 1,4-galactosiltransferasa T1 bovina [Gastinel et al., 1999] i MurG, una glicosiltransferasa bacteriana [Ha et al., 2000]. Tanmateix, tots aquests enzims actuen amb inversió de la configuració al carboni anomèric i per tant és probable que la geometria dels seus centres actius sigui distinta a la de la GS.

Gairebé tots els estudis sobre la GS hepàtica i muscular s'han centrat en la seva regulació, al·lostèrica i covalent, induïda per senyals hormonals i estímuls metabòlics [Roach, 1990; Roach et al., 1991; Bollen et al., 1998] i en canvi s'han realitzat pocs estudis per tal d'esclarir el seu mecanisme catalític [Mahrenholz et al., 1988]. Per tant l'objectiu desenvolupat en aquest capítol era el d'identificar regions conservades i aminoàcids presumiblement catalítics mitjançant la comparació de les seqüències aminoacídiques de les GS de mamífer amb d'altres glicosiltransferases amb retenció de configuració. A més a més, utilitzant mutagènesi dirigida i la glicogen sintasa de múscul humà (HsMGS) com a model, varem analitzar la funció de dos residus d'àcid glutàmic en la catàlisi d'aquesta família d'enzims.

2.2. Resultats

2.2.1. Anàlisi de seqüències

Un alineament múltiple lineal de les seqüències de totes les GS eucariòtiques conegudes (múscul humà [Browner et al., 1989], fetge humà [Nuttall et al., 1994], múscul de conill [Zhang et al., 1989], fetge de rata [Bai et al., 1990], múscul de ratolí (Seldin, anotació directa a GenBank™, número d'accès AAD09457), cervell de ratolí [Pellegri et al., 1996], el marc obert de lectura FBrf0126705 de *Drosophila melanogaster* (anotació automàtica a Celera Jamboree, FlyBase 1999), *Neurospora crassa* (anotació directa a EMBL, número d'accès O93869) i les isoformes 1 [Farkas et al., 1990] i 2 [Farkas et al., 1991] de *Saccharomyces cerevisiae*) revelà un segment de 17 aminoàcids de seqüència ⁵⁰⁷SY⁵⁰⁸Y⁵⁰⁹E⁵¹⁰P⁵¹¹W⁵¹²G⁵¹³Y⁵¹⁴T⁵¹⁵P⁵¹⁶A⁵¹⁷E⁵¹⁸C⁵¹⁹T⁵²⁰V⁵²¹M⁵²²G⁵²³ (la numeració correspon a la seqüència de la HSMGS), estrictament conservat i que es troba dins de la zona de major homologia entre els membres d'aquesta família.

Utilitzant aquest pèptid de 17 aminoàcids es realitzà una cerca de similitud de seqüències mitjançant ψ -BLAST, i s'observà que el motiu E-X₇-E (que anomenarem així per tractar-se de dos residus de glutàmic separats per set aminoàcids) estava conservat en d'altres glicosiltransferases que actuen amb retenció de configuració. Anteriorment un motiu similar al E-X₇-E ja va ser descrit en una família bacteriana d' α -manosiltransferases que actuen amb retenció [Geremia et al., 1996]. Mitjançant l'alineament múltiple de diferents glicosiltransferases diferents a les GS eucariotes, Kapitonov i Yu [Kapitonov i Yu, 1999] varen identificar un fragment conservat, que anomenaren arbitràriament domini de reconeixement de nucleòtid 1 α (NRD1 α), que es caracteritzava per la presència de dos residus d'àcid glutàmic conservats separats per set aminoàcids.

Inicialment, s'escolliren arbitràriament de sis a deu proteïnes de cadascuna de les diferents famílies de glicosiltransferases de la classificació de Campbell i Henrissat [Campbell et al., 1997; Campbell et al., 1998]. S'obtingueren les seves seqüències de les bases de dades públiques: NCBI o Swiss Protein/TrEMBL. Tot seguit s'alinearen mitjançant l'algoritme ClustalW i es cercà dins les zones més conservades la presència del motiu E-X₇-E. Només es detectà en quatre de les deu famílies de glicosiltransferases amb retenció. (3, 4, 5 i 15), i es comprovà que no era present en cap de les glicosiltransferases amb inversió o de mecanisme desconegut.

En la figura 2.1. es mostra l'alineament múltiple d'aquests fragments que provenen de membres representatius de les famílies 3, 4, 5 i 15. Tot i que la identitat global entre aquestes seqüències és molt baixa, ja que només el primer residu de glutàmic del motiu E-X₇-X (que correspon al Glu-510 de la seqüència de la HsMGS) és invariable, la similitud, tenint en compte els canvis conservatius, és molt més elevada (~70%). Es poden destacar dues característiques d'aquest motiu altament conservades en les proteïnes analitzades: la presència de residus aromàtics en les posicions -1 i +2 des del Glu conservat i dos residus de glicina gairebé invariants en les posicions +3 i +13. El segon residu de glutàmic conservat en la família 3 (Glu-518 en la HsMGS) també és present en tots membres de la família 4, mentre que la família 15 conté un residu d'histidina en aquesta posició. Finalment, en la família 5 aquesta posició és més variable, ja que l'ocupen residus de glutàmic, tirosina o histidina.

Per confirmar la validesa d'aquestes similituds es realitzà una anàlisi de clústers hidrofòbics (HCA) i una predicció d'estructura secundària (d'una extensió de 60 aminoàcids, que inclou en el motiu E-X₇-E) d'un grup de proteïnes de les famílies abans esmentades (Fig 2.2.).

Família d'accès	Nom		1	20	Número
3	ORF Y46G5A.31	(526)	FPSYYE	EPWGYTPAECTVMGI	CAB60373 ¹
3	ORF CG6904	(516)	FPSYYE	EPWGYTPAECTVMGI	AAF55132 ¹
3	UGS1_HUMAN	(505)	FPSYYE	EPWGYTPAECTVMGI	P13807 ²
3	O93869	(495)	FASYYE	EPWGYTPAECTVMGV	O93869 ²
3	UGS1_YEAST	(504)	FPSYYE	EPWGYTPAECTVMGV	P23337 ²
4	VIPC_SALTI	(477)	LF	SRYEGLPNVLI EAQMGV	Q04975 ²
4	ORF AF0045	(302)	HPSL	HEGFGLPVVEAMACGA	AAB91182 ¹
4	GPI3_YEAST	(284)	HASL	TEAFGTIIVEAASCNL	P32363 ²
4	SPS_MAIZE	(586)	NPAL	VEPFGLTLIEAAHGL	P31927 ²
4	SUS1_MAIZE	(665)	QPAFY	EAFGLTVIESMTCGL	YUZMS ²
5	P78852	(1521)	IPSR	DEPFGLVAVEFGRKGA	P78852 ²
5	ORF PAB2292	(334)	IPSY	FEFGLVALEAMCLGA	CAB49000 ¹
5	GLGA_ECOLI	(372)	VPSR	FEPCGLTQLYGLKYGT	P08323 ²
5	O48899	(628)	MPSR	FEPCGLNQLYAMAYGT	O48899 ²
5	BAA82346	(477)	IPSR	FEPCGLVQLHSMYPGT	BAA82346 ¹
15	KRE2_CANAL	(341)	GGFF	YERWGDAPVHSIAAAL	Q00310 ²
15	KRE2_YEAST	(352)	GGFF	YERWGDAPVHSIAAAL	P27809 ²
15	YUR1_YEAST	(336)	GGFF	YERWGDAPVHSIGVSL	P26725 ²
15	KTR3_YEAST	(318)	GGFF	YERWGDAPVHSIAASL	P38130 ²
15	O60160	(302)	GNFF	YERWGDAPVHSIAVSL	O60160 ¹
Consensus			XPSYYEPWGXXPVESIXXGL		

Figura 2.1. Aliniament múltiple de les seqüències aminoacídiques de les glicosiltransferases seleccionades. L'aliniament es realitzà utilitzant ClustalW i una matriu blosum62mt. Les seqüències s'obtingueren del servidor Entrez-protein¹ (NCBI) o de les bases de dades SWISS-PROT/TrEMBL². Les famílies de glicosiltransferases, segons la classificació de Campbell et al. (1997, 1998), s'indiquen a l'esquerra i els números d'accés es mostren a la dreta. El primer aminoàcid alineat de cada proteïna està indicat entre parèntesis. El residu de Glu invariant es mostra sobre fons negre i els aminoàcids conservats i homòlegs sobre fons gris. ORF Y46G5A.31: glicogen sintasa putativa de *Caenorhabditis elegans*; ORF CG6904: glicogen sintasa putativa de *Drosophila melanogaster*; UGS1_HUMAN: glicogen sintasa de múscul humà; O93869: glicogen sintasa de *Neurospora crassa*; UGS1_YEAST: isoforma 1 de glicogen sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*; VIPC_SALTI: proteïna de biosíntesi del polisacàrid VI VIPC/TVIE de *Salmonella typhi*; ORF AF0045: manosiltransferasa A putativa d'*Archaeoglobus fulgidus*; GPI3_YEAST: proteïna de biosíntesi del N-acetilglucosaminil-fosfatidilinositol de *Saccharomyces cerevisiae*; SPS_MAIZE: sacarosa-fosfat sintasa de blat de moro; SUS1_MAIZE: sacarosa sintasa isoforma 1 de blat de moro; P78852: putativa α -glicà sintasa de paret cel·lular Ags1 de *Schizosaccharomyces pombe*; ORF PAB2292: putativa glicogen sintasa de *Pyrococcus abyssi*; GLGA_ECOLI: glicogen sintasa d'*Escherichia coli*; O48899: midó sintasa isoforma zSTSII-1 de blat de moro; BAA82346: midó sintasa unida a grànul isoforma I de *Phaseolus vulgaris*; KRE2_CANAL: glicolípid 2- α -manosiltransferasa MNT1 o KRE2 de *Candida albicans*; KRE2_YEAST: glicolípid 2- α -manosiltransferasa MNT1 o KRE2 de *Saccharomyces cerevisiae*; YUR1_YEAST: probable manosiltransferasa YUR1 de *Saccharomyces cerevisiae*; KTR3_YEAST: probable manosiltransferasa KTR3 de *Saccharomyces cerevisiae*; O60160: putativa 2- α -manosiltransferasa (locus SPBC19C7) de *Schizosaccharomyces pombe*.

De nou moltes característiques es mostren conservades entre les proteïnes analitzades, recolzant la hipòtesi de que aquestes quatre famílies estan relacionades. Tant la forma dels clusters hidrofòbics obtinguts mitjançant HCA com la predicció d'estructura secundària pronostiquen la presència d'una α -hèlix uns 12 a 15 aminoàcids abans del segment E-X₇-E així com dos fulls- β , situats 5-7 i 20-30 aminoàcids respectivament, després d'aquest motiu. Endemés, els perfils dels clusters hidrofòbics just abans del primer glutàmic són compatibles amb un full- β , element que apareix en la predicció d'estructura secundària de totes les proteïnes excepte en un cas. Totes aquestes observacions indiquen que aquestes proteïnes serien similars pel que fa a la seva estructura secundària en la regió que conté el motiu E-X₇-E reforçant la idea que el glutàmic invariant juga un paper essencial en l'activitat catalítica d'aquest tipus d'enzims.

2.2.2. Activitat de la proteïna de fusió GFP-Hs MGS

Una forma habitual de mostrar que un determinat residu aminoacídic d'un enzim és essencial per a la catàlisi consisteix en procedir a la seva substitució per un altre aminoàcid i a la verificació de que l'enzim mutant té una activitat nula o molt disminuïda. Aquest mètode requereix l'ús d'un sistema d'expressió recombinant que permeti la producció de proteïna activa. Degut a les dificultats d'obtenir quantitats suficients de HsMGS soluble per sobreexpressió en *Escherichia coli* [Ferrer i Guinovart, no publicat] es decidí utilitzar l'ús de cèl·lules eucariòtiques per tal d'expressar la proteïna quimèrica formada per la fusió de la proteïna verda fluorescent (GFP) a l'extrem aminoterminal de la HsMGS. Aquest sistema permet l'observació directa de la localització intracel·lular de la quimera GFP-HsMGS, propietat que representa un mitjà adequat per tal de verificar la integritat estructural dels mutants produïts.

Per tal de comprovar si la proteïna de fusió GFP-HsMGS era catalíticament activa es transfectaren transitòriament cèl·lules COS-1 amb els plasmidis pEGFP-C1 i pEGFP-HsMGS i es determinà la activitat GS en els homogenats d'aquests cultius. Les cèl·lules que expressaven GFP mostraven activitat GS pròpia de les cèl·lules COS-1, però l'activitat GS total de les cèl·lules que sobreexpressaven GFP-HsMGS era aproximadament 8 vegades superior a la de les cèl·lules control (Taula 2.1.). Roach i col·laboradors obtingueren resultats similars quan la GS de múscul de conill s'expressava transitòriament en cèl·lules COS M9 [Skurat et al. 1994]. El quocient d'activitat (sense Glc 6-P/ 10.8 mM Glc 6-P) de la GFP-HsMGS expressada en cèl·lules COS-1 augmentà de 0.13 ± 0.05 , en cèl·lules incubades amb medi sense glucosa, fins a 0.22 ± 0.09 en cèl·lules incubades en presència de glucosa 30

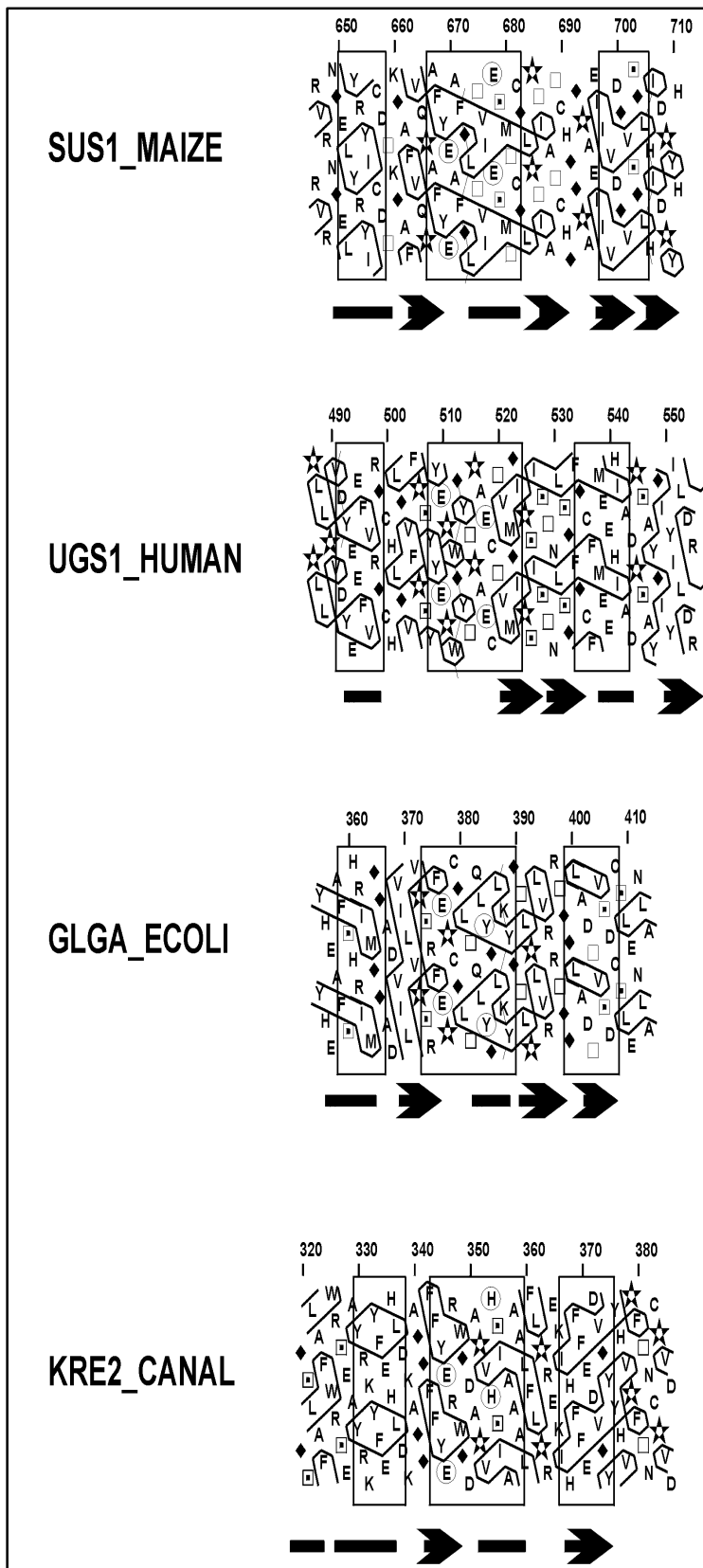


Figura 2.2. Alineament de la regió que conté el motiu E-X₇-E mitjançant HCA i predicció d'estructura secundària.

Es mostren els diagrames de HCA de un fragement de 60 aminoàcids al voltant del motiu E-X₇-E de quatre proteïnes representatives cadascuna d'elles de les famílies de glicosiltransferases analitzades. Les regions que mostren similitud de tipus HCA s'indiquen mitjançant requadres. Els cercles indiquen els residus conservats del motiu. Les seqüències de les proteïnes estan escrites en una hèlix α duplicada, i el contorn dels grups d'aminoàcids hidro-fòbics són dibuixats de forma automàtica. Per a indicar els aminoàcids s'ha usat el codi estàndard d'una lletra a excepció de prolina, glicina, serina i treonina, que es representen mitjançant estrelles, rombes, quadrats omplerts i quadrats buits respectivament. La predicció d'estructura secundària predita per l'algoritme JnetPred s'indica sota de cada diagrama HCA mitjançant barres per a representar hèlix α i fletxes per als fulls β .

SUS1_MAIZE: sacarosa sintasa isoforma 1 de blat de moro; UGS1_HUMAN: glicogen sintasa de múscul humà; GLGA_ECOLI: glicogen sintasa d'Escherichia coli; KRE2_CANAL: glicolípíd 2- α -manosiltransferasa MNT1 o KRE2 de Candida albicans.

	Activitat glicogen sintasa total (mU/mg de proteïna)	Taula 2.1. Activitat GS total d'homogenats de cèl·lules COS-1 que expressaven GFP, GFP-Hs MGS i les seves variants mutades. Es transfectaren cèl·lules COS-1 mitjançant el mètode de DEAE-dextrà i s'incubaren durant 42 h en DMEM suplementat amb glucosa i 10% de FBS per a permetre l'expressió de proteïna. Les cèl·lules que sobreexpressaven les proteïnes indicades s'homogenaren per tal de mesurar la seva activitat GS total, tal i com s'indica en l'apartat de materials i mètodes. Les dades representen la mitjana \pm SEM per a cinc experiments independents.
GFP	12.6 \pm 2.7	
GFP-Hs MGS	97.1 \pm 7.9	
GFP-Hs MGS (E510A)	11.8 \pm 4.2	
GFP-Hs MGS (E518A)	17.4 \pm 2.8	

mM durant 4 h. Aquest resultat indica que la fusió de la GFP a l'extrem amino-terminal de la HsMGS no interfereix d'una forma apreciable la seva activitat catalítica ni en la capacitat de regulació per fosforilació.

2.2.3. Unió al glicogen intracel·lular de la proteïna de fusió GFP-Hs MGS

En estudis anteriors es demostrà en el laboratori que la distribució intracel·lular de la GFP-HsMGS és depenent de la presència de glucosa en el medi d'incubació. Així doncs, en absència de glucosa la GFP-HsMGS es concentrava dins el nucli i en resposta a la presència del sucre translocava cap al citosol. En ambdós compartiments la proteïna de fusió presenta un aspecte particulat, i en el cas de les partícules del citosol, la seva mida i complexitat augmenten amb el temps d'incubació amb glucosa [Ferrer et al., 1997] suggerint que la majoria de la proteïna de fusió GFP-HsMGS estava unida a glicogen. Per comprovar aquesta hipòtesi, s'utilitzà un anticòs monoclonal que uneix específicament glicogen provinent de condrocits, hepatòcits i cèl·lules musculars, així com a glicogen purificat [Baba, 1993]. Primer es comprovà la capacitat de l'anticòs d'unir-se a partícules de glicogen formades per la GS endògena de les cèl·lules COS-1. Les cèl·lules es transfectaren amb el vector pEGFP-C1 i s'incubaren en un medi sense de glucosa. En aquestes condicions els cultius de COS-1 acumulen una quantitat negligible de glicogen i no es detectà cap senyal fluorescent vermella corresponent al marcatge del glicogen (fig. 3A).

En canvi, cèl·lules incubades durant 4 h en un medi que contenia 30 mM de glucosa acumularen $170 \pm 10 \mu\text{g}$ de glicogen per mg de proteïna i mostraven un clar patró d'immunofluorescència puntejat en les imatges de microscòpia confocal, atribuïble al marcatge del glicogen (fig. 2.3. B). A més, el tractament d'aquestes cèl·lules amb α -amilasa després de la fixació amb paraformaldehid i la seva permeabilització eliminava completament el senyal fluorescent, confirmant així l'especificitat de l'anticòs contra el glicogen. Aquest experiment també mostrava que la distribució intracel·lular de la GFP era independent de la presència de glucosa en el medi d'incubació i de l'acumulació de glicogen (fig. 2.3.).

En un altra sèrie d'experiments, cèl·lules COS-1 es transfectaren amb el plasmidi pEGFP-HsMGS i foren immunomarcades amb l'anticòs anti-glicogen (fig. 2.4.).

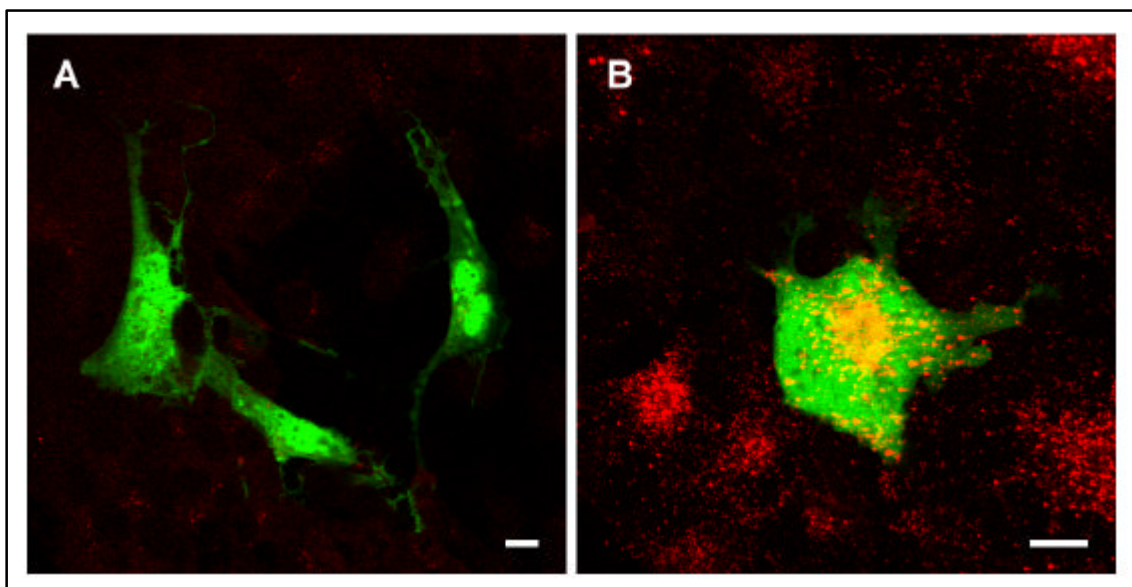


Fig 2.3. Immunocitoquímica contra glicogen de cèl·lules COS-1 expressant GFP. Es mostren dues seccions òptiques de microscopia confocal representatives de cèl·lules COS-1 transfectades transitòriament amb el vector pEGFP-C1. Les cèl·lules es fixaren amb paraformaldehid (48-52 h després de la transfecció), es permeabilitzaren amb Tritó X-100, i s'incubaren amb un anticòs monoclonal IgM anti-glicogen i un anticòs secundari conjugat amb TRITC tal i com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes. Ambdós panells mostren les imatges superposades de la fluorescència de la GFP i del TRITC. En la imatge A, les cèl·lules s'incubaren en DMEM sense glucosa i no es detectà immunofluorescència provinent del marcatge del glicogen. En la B, la fluorescència vermella prové de la tinció de les partícules de glicogen contingudes en cèl·lules COS-1 incubades durant 4 h en DMEM que contenia glucosa 30 mM. Es pot apreciar que no apareix una distribució diferent de la GFP entre les dues imatges indicant que la localització subcel·lular d'aquesta proteïna és independent de l'addició de glucosa en el medi d'incubació o de la presència de glicogen en l'interior cel·lular. La barra d'escala indica $10 \mu\text{m}$

Com en el cas anterior, en absència de glucosa (no mostrat), les cèl·lules transfectades no acumularen quantitats apreciables de glicogen i no es detectà senyal fluorescent provinent del marcatge de glicogen. Anteriorment ja s'havia descrit [Ferrer et al. 1997] que en aquestes condicions la fluorescència verda de la GFP-HsMGS es trobava principalment al nucli. Després de 4 h d'incubació amb glucosa 30 mM, la GFP-HsMGS es troba gairebé exclusivament en el citosol, majoritàriament en formacions anulars (fig. 2.4. A i D).

Sorprenentment, el nombre de partícules immunomarcades amb l'anticòs anti-glicogen era molt inferior en les cèl·lules que sobreexpressaven GFP-HsMGS que en les cèl·lules no transfectades de la mateixa preparació microscòpica (fig. 2.4. B i E). El tant per cent de transfecció en aquests experiment era sempre superior al 70% i els cultius de COS-1 tant transfectats com no i incubats durant 4 h amb 30 mM de glucosa assolien un nivells de glicogen similars ($170 \pm 10 \mu\text{g}$ glicogen/mg de proteïna).

Per tant, la disminució en la tinció fluorescent contra el glicogen no es podia atribuir a una disminució en la concentració del polisacàrid en les cèl·lules transfectades. En canvi, aquests resultats suggerien que la sobreexpressió de la proteïna bloquejava l'accés de l'anticòs a les partícules de glicogen. La presència ocasional d'agregats molt grans de GFP-HsMGS (fig. 2.4.D.) que també eren marcats amb l'anticòs contra glicogen (fig. 2.4.E.) recolzava aquesta hipòtesi. Tot i així la fluorescència vermella atribuïda al glicogen es trobava principalment al centre d'aquests agregats anulars, i la fluorescència verda provinent de la GFP-HsMGS es concentrava perimetralment i ambdues tincions semblaven mútuament excloents en un mateix punt (fig. 2.4.F.).

Per confirmar l'associació entre la proteïna de fusió GFP-HsMGS i el glicogen intracel·lular es transfectaren transitòriament cèl·lules COS-1 per tal que expressessin GFP o GFP-HsMGS i s'incubaren en presència de glucosa 30 mM durant 4 h i es permeabilitzaren amb digitonina prèviament a la seva fixació amb paraformaldehid i s'analitzaren amb el microscopi confocal. Aquest tractament era capaç d'alliberar proteïnes solubles com succeí amb la GFP. En canvi, la proteïna de fusió GFP-HsMGS no s'extragué completament i només quan les cèl·lules permeabilitzades s'incubaven amb α -amilasa abans de fixar s'aconseguia una extracció total de l'enzim. Es conclugué doncs, que la distribució puntejada de la quimera GFP-HsMGS es deguda a la seva estreta associació amb les partícules de glicogen produïdes quan les cèl·lules COS-1 s'incuben en presència de glucosa.

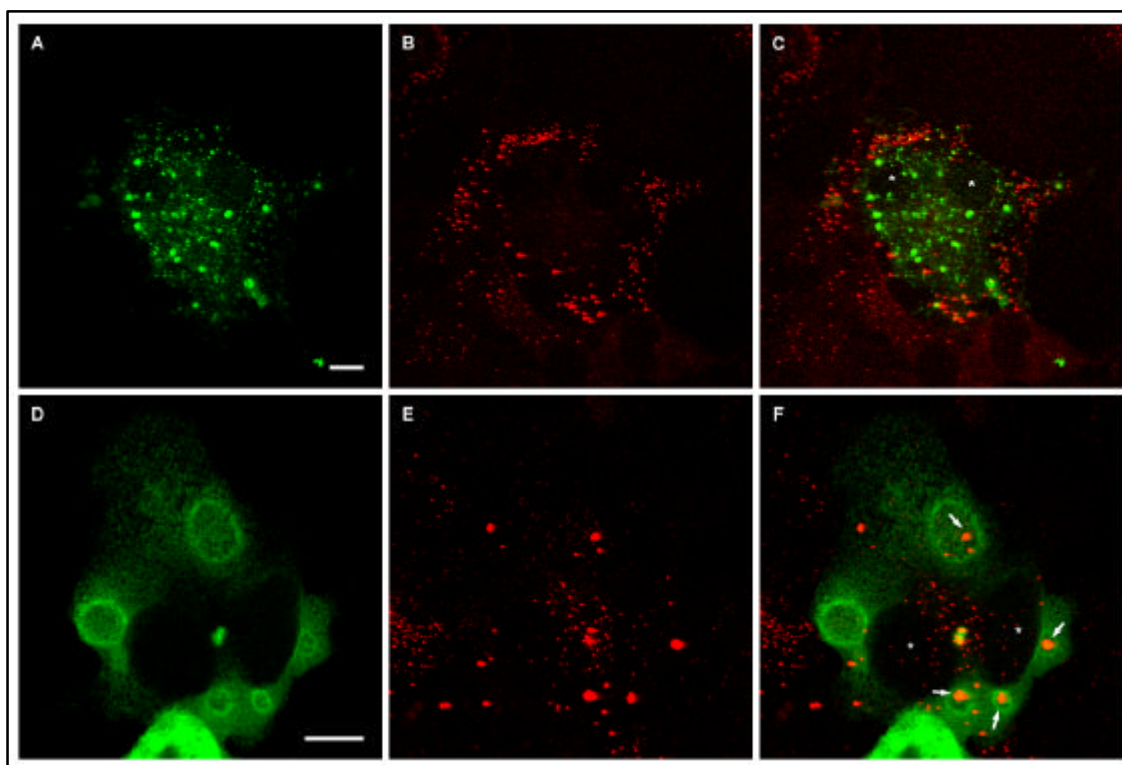


Fig. 2.4. Immunocitoquímica de glicogen en cèl·lules que expressen GFP-Hs MGS.

Es mostren dues seccions òptiques de microscopia confocal representatives de cèl·lules COS-1 transfectades transitòriament amb el vector pEGFP-HsMGS. Després de la transfecció (48-52 h), les cèl·lules es fixaren amb paraformaldehid, es permeabilitzaren amb Tritó X-100, i s'incubaren amb un anticòs monoclonal IgM anti-glicogen i un anticòs secundari conjugat amb TRITC tal i com es descriu en l'apartat de Materials i mètodes. Els panells A i D mostren la fluorescència verda de la GFP-HsMGS, els B i E la fluorescència vermella del glicogen marcat amb TRITC i els C i F, la superposició d'imatges. Els asteriscs indiquen la posició dels nuclis. Les fletxes marquen els agregats amb forma anular de la GFP-HsMGS que també estan marcats amb l'anticòs contra glicogen. La barra d'escala correspon a 10 μm .

2.2.4. Caracterització de les proteïnes mutants GFP-Hs MGS (E510A) i GFP-Hs MGS (E518A)

Per tal de determinar el paper dels aminoàcids Glu-510 i Glu-518 del motiu E-X₇-E en l'activitat catalítica de HsMGS, els codons corresponents a aquests dos residus es mutaren per tal de codificar per a alanina en el plasmidi pEGFP-HsMGS i les proteïnes mutants que en resultaren s'expressaren transitòriament en cèl·lules COS-1. Els homogenats d'aquests cultius s'analitzaren mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida i SDS i transferència Western usant un anticòs anti-GFP. Les proteïnes mutants posseïen la massa molecular esperada de ~ 110 kDa i s'expressaven en quantitat similar a la forma salvatge (fig. 2.5.). La integritat d'ambdues proteïnes, tant GFP-HsMGS (E510A) com GFP-HsMGS (E518A) es comprovà

mitjançant l'anàlisi de la seva distribució intracel·lular per microscopia confocal en cèl·lules COS-1, mioblastòcits L6 i hepatòcits de rata transfectats transitòriament.

En tots el tipus cel·lulars i tant en presència com en absència de glucosa, els enzims mutants mostraven una distribució idèntica a la de la GFP-HsMGS. La mida i forma dels agregats produïts per les proteïnes mutades en presència de glucosa eren molt similars a les de l'enzim salvatge fusionat amb GFP. Encara més, l'immunomarcatge de glicogen de cèl·lules COS-1 era parcialment bloquejat per la sobreexpressió tant de GFP-HsMGS (E510A) com de GFP-HsMGS (E518A). El fet que les proteïnes mutades retinguessin la capacitat de canviar la seva localització intracel·lular en resposta a glucosa i la unió a glicogen indicava que les mutacions no afectaven la integritat estructural de l'enzim. Per tant les diferències en l'activitat dels mutants podien ésser directament atribuïdes a modificacions locals del centre actiu.

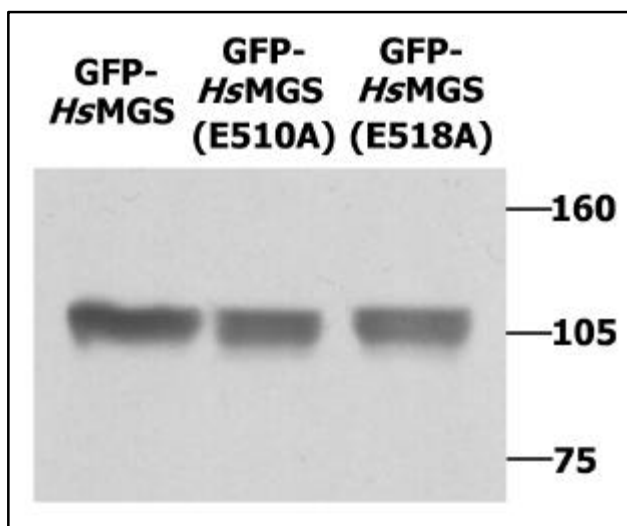


Figura 2.5. Immunodetecció de les proteïnes de fusió expressades en cèl·lules COS-1. Cèl·lules COS-1 es transfectaren transitòriament amb els vectors pEGFP-C1, pEGFP-HsMGS, pEGFP-HsMGS (E510A) i pEGFP-HsMGS (E518A). Després de la transfecció (48 h) es realitzà una electroforesi en SDS-acrilamida (10%) amb aliquotes que contenien 10 µg de proteïna de cadascun dels homogenats prèviament usats en la mesura d'activitat sintasa. Tot seguit les proteïnes es transferiren a una membrana de nitrocel·lulosa i es realitzà un transferència Western usant un anticòs policlonal de conill anti-GFP i un anticòs secundari anti-conill tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes. A la dreta es mostren els pesos moleculars en kDa.

Degut a la presència d'activitat GS endògena no es realitzaren estudis cinètics més detallats dels enzims recombinants. Tot i així, es mesurà l'activitat GS total d'homogenats de cèl·lules COS-1 transfectades transitòriament que expressaven l'enzim salvatge i els enzims mutats. Els cultius que expressaven GFP-HsMGS (E518A) mostraren un lleuger increment en l'activitat GS total comparats amb el control que expressava GFP (taula 2.1.), indicant que el

mutant E518A conservava aproximadament un 6% de l'activitat de l'enzim salvatge GFP-HsMGS en les condicions assajades. Aquest petit increment en l'activitat GS s'observà en tots els experiments independents realitzats. En canvi, els homogenats de cèl·lules que expressaven el mutant E510A no mostraven diferències significatives quan es comparaven amb el control. Així doncs, es pot concloure que ambdós residus de Glu estan implicats en la catàlisi: el Glu-510 és un residu essencial mentre que el Glu-518 té un paper secundari.

2.3. Discussió

En aquest capítol s'han combinat tant tècniques bioinformàtiques com experimentals per tal d'identificar dos residus de Glu que participen en la catàlisi de les GS eucariotes, utilitzant la HsMGS com a model. S'ha aprofitat la classificació de les glicosiltransferases en 43 famílies segons la seva similitud de seqüència i la seva estereoreactivitat proposada per Campbell et al. [Campbell et al., 1997; Campbell et al., 1998]. Mitjançant BLAST i alinaments múltiples s'ha trobat que el motiu E-X₇-E es troba altament conservat en els membres de les famílies 3, 4, 5 i 15 de glicosiltransferases, les quals mantenen la retenció de la configuració en el carboni anomèric del sucre transferit. L'anàlisi de clústers hidrofòbics i la predicció d'estructura secundària d'aquesta regió recolzaven la hipòtesi de que aquestes quatre famílies estan relacionades. En les GS eucariotes, que conformen la família 3, aquest motiu es trobava dins d'un segment de 17 aminoàcids invariants situat aproximadament en el tercer terç de les seves seqüències i en la regió en que mostren una major grau de similitud entre elles. Prèviament ja s'havia hipotetitzat que aquesta regió conservada podria contenir el centre catalític, contràriament als segments amino i carboxil terminals que inclourien els llocs de fosforilació que regulen l'activitat enzimàtica [Bai et al., 1990].

El paper funcional del Glu-510 i el Glu-518 del motiu E-X₇-E s'ha comprovat mitjançant mutagènesi dirigida. Tant la fusió amb GFP de l'enzim salvatge com dels dos mutants puntuals en que els dos Glu conservats han estat bescanviats per residus d'alanina s'expressaren transitòriament en cèl·lules COS-1. La integritat estructural de les proteïnes quimèriques mutants es confirmà gràcies a múltiples evidències. S'expressaven a nivells similars que la proteïna salvatge i també posseïen el mateix pes molecular d'aquest últim. Les proteïnes mutants conservaren la capacitat de concentrar-se en el nucli en absència de glucosa i de translocar al citoplasma en resposta a l'addició del monosacàrid [Ferrer et al., 1997]. Finalment eren capaces d'unir el glicogen intracel·lular com l'enzim salvatge. Tot i així, el mutant E518A retingué aproximadament un 6% de l'activitat de la fusió GFP-HsMGS mentre que la activitat del E510A era indetectable. Aquests resultats indicaven que les mutacions introduïdes en la HsMGS n'inutilitzen la seva capacitat catalítica.

Si assumim que en els enzims les regions altament conservades contenen residus crucials per a l'activitat catalítica, el motiu E-X₇-E deuria estar involucrat bé en el reconeixement o unió de substrats o bé en catàlisi. Tenint en compte la gran quantitat de donadors glicosídics (GDP-manosa, ADP- i UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-N-acetilglucosamina, etc.) i acceptors (mono- i polisacàrids, glicolípid, glicoprotèines, etc.) usats per les proteïnes de les famílies 3, 4, 5 i 15, només el centre actiu hauria d'ésser conservat en totes elles. El fet que ambdós mutants continuen unint-se a glicogen indicava que el lloc d'unió a glicogen no s'havia modificat apreciablement per les mutacions puntuals. A més a més, s'ha proposat que la Lys-38 de la GS de múscul de conill està implicada en la unió de UDP-glucosa, suggerint que aquest substrat s'uneix a la meitat amino-terminal de l'enzim [Mahrenholz et al., 1988]. Per tant és raonable afirmar que el Glu-510 i el Glu-518 formen part del la maquinària del centre actiu de la HsMGS i, per analogia, que els residus corresponents en les altre GS eucariotes tenen idèntica funció. El mateix podria estendre's per a les glicosiltransferases de les famílies 4, 5 i 15 de la classificació de Campbell, encara que en aquests casos caldria confirmació experimental. S'ha obtingut aquest tipus d'evidència per a Ace A [Petroni i Ielpi, 1996; Geremia et al., 1999], una manosiltransferasa que pertany a la família 4. Geremia et al. [Geremia et al., 1996] trobaren un motiu similar E-X₇-E al descrit aquí en un grup de manosiltransferases bacterianes i proposaren que ambdós Glu conservats eren importants per a la catàlisi. El bescanvi per Ala dels residus Glu-287 o Glu-295 en Ace A (equivalents a Glu-510 i Glu-518 respectivament) comportava els mateixos canvis en l'activitat enzimàtica a la observada en la HsMGS. El mutant E587A era inactiu i el E295A mostrava una activitat enzimàtica molt reduïda [Abdian et al., 2000]. A més, Nichols i col·laboradors han demostrat que el Glu-319 de la midó sintasa IIb-2 de blat de moro, una glicosiltransferasa de la família 5, és essencial per a la catàlisi [Nichols et al., 2000]. Segons els nostres alineaments aquest residu correspon al Glu-510 de la HsMGS.

Les reaccions enzimàtiques en que es produeix la substitució d'un grup en un carboni anomèric i rendeixen un producte de la mateixa configuració que el substrat, ocorren generalment mitjançant dos desplaçaments consecutius en el carboni asimètric [Koshland, 1953]. En les glicosidases que operen amb retenció de configuració, la primera etapa consisteix en la formació d'un intermediari substrat-enzim invertit mitjançant l'atac coordinat d'un nucleòfil en el centre anomèric del sucre i la protonació de l'oxigen glicosídic per un residu que actua com a àcid general. En una segona etapa, aquest últim, ara funcionant com a base general, desprotona una molècula d'aigua, que al seu tron ataca el carboni anomèric de nou alliberant el producte final. Gràcies a la mutagènesi dirigida i a l'anàlisi cinètica dels mutants han estat identificats i s'ha assignat el paper dels residus catalítics de moltes glicosidases amb

retenció, i sempre han resultat ésser residus d'Asp o Glu [Ly i Withers, 1999]. Els enzims mutants en que el nucleòfil s'ha bescanviat per alanina són essencialment inactius. Quan el residu àcid/base general s'elimina, la proteïna resultant reté certa activitat amb substrats molt bons, és a dir, aquells que duen un grup sortint molt favorable. En aquest cas, la protonació del grup sortint no és crucial per a la catàlisi [Ly i Withers, 1999].

Kapitonov i Yu descrigueren un domini (NRD1 α), present en diferents membres de la família 4 de les glicosiltransferases diferents a les α -manosiltransferases analitzades per Geremia et al. [Geremia et al., 1996], que també contenia el motiu E-X₇-E. Els autors proposaren arbitràriament que, per analogia amb les glicosidases, el primer Glu era el residu àcid/base general mentre que el segon actuava com a nucleòfil [Kapitonov i Yu, 1999]. Tot i així aquestes hipòtesis no foren corroborades experimentalment.

Els nostres resultats contradiuen les funcions assignades als dos Glu conservats per Kapitonov i Yu. Primer, les comparacions de seqüència entre les glicosiltransferases seleccionades mostra que, mentre que el primer Glu és invariant, el segon és més variable i per tant encaixa millor si funciona com a àcid/base general. Cal esmentar que en tots els enzims analitzats en aquest estudi el segon Glu és sempre un residu amb una cadena lateral que podria actuar com a donador/acceptor de protons. Segon, que la mutació E510A en la HsMGS inactiva completament l'enzim, mentre que el mutant E518A manté una activitat residual. El donador glicosil en la síntesi de glicogen és UDP-glucosa. La naturalesa química de l'UDP prediu que aquesta molècula pot actuar com a molt bon grup sortint fins i tot en el cas que no es protoni i per tant que la reacció glicogènica pugui esdevenir-se a una velocitat apreciable en l'absència d'un catalitzador àcid. Els nostres resultats són consistents amb la assignació com a nucleòfil del Glu-510 i com a àcid/base general del Glu-518 que proveiria una important però no essencial ajuda en la catàlisi.

Capítol 3

3. Construcció i caracterització dels adenovirus AdCMV-GFP, AdCMV-GFP-Hs MGS i AdCMV-Hs MGS

3.1. Introducció

La transferència de DNA mitjançant adenovirus és una tècnica que s'inicià a principis dels anys 80 i que aprofitava l'ampli coneixement de la biologia molecular d'aquests virus. Inicialment s'usà per tal d'introduir gens d'inducció de la transformació cel·lular, com ara els dels antígens T del virus 40 de simi o del poliomavirus [Solnick, 1981; Van Doren i Gluzman 1984; Berkner et al., 1987].

Posteriors refinaments van permetre establir mètodes generals per a crear virions recombinants sense capacitat de replicació per tal de sobreexpressar la proteïna desitjada [Berkner, 1992]. Tot i que actualment existeixen alguns estudis in vivo de terapèutica gènica amb adenovirus, la seva alta antigenicitat i per tant la gran resposta immunològica que provoquen han forçat als investigadors a preferir d'altres sistemes de transferència.

En canvi, on els adenovirus continuen essent una eina molt útil és en l'anomenada enginyeria metabòlica. S'han realitzat molts estudis sobre l'efecte de la sobreexpressió d'un enzim concret en el metabolisme. Aquesta tècnica permet expressar isoenzims en cèl·lules que no els expressen, per tal d'analitzar les seves propietats in situ, així com valorar la importància de l'enzim en la via metabòlica on participa. Mercès la gran capacitat d'infecció de cèl·lules quiescents que posseeixen els adenovirus, aquests han estat usats en molts tipus de cèl·lules. En hepatòcits per exemple, s'ha sobreexpressat la GP muscular [Gomez-Foix et al., 1992], la GK i l'HK I [Seoane et al., 1996; Gomis et al., 2000; Gomis et al., 2002], la glucosa 6-fosfatasa [Seoane et al., 1997] o la proteïna reguladora de la glucoquinasa [de la Iglesia et al., 2000]; i en cultiu primari de múscul: la GP [Baqué et al., 1998] i la GK [Baqué et al., 1998a].

3.1.1. Biologia dels adenovirus

Els virions dels adenovirus salvatges són partícules icosaèdriques d'uns 75 nm de diàmetre amb una regió central densa que conté el DNA genòmic. Els serotips més estudiats són el 2 (Ad2) i el 5 (Ad5) i posseeixen un DNA de doble cadena d'uns 36 kb unit covalentment a cada extrem amb una proteïna de 55 kDa. [Horwitz, 1990].

Després de l'infecció viral, el virió escapa del sistema endosomolisosomal, perd la coberta proteica i el seu genoma es dirigeix al nucli on

roman sense integrar-se amb el DNA hoste. Aleshores comencen a transcriure's les regions primerenques (Early) que codifiquen per a les proteïnes implicades en la regulació de la transcripció viral i la replicació del seu genoma. La regió E1a codifica per a activadors de la transcripció i la replicació viral i la E1b per a proteïnes implicades en la protecció del DNA viral que són necessàries per a la fase tardana del cicle lític. La regió E1 és capaç de transformar cèl·lules en cultiu. Les cèl·lules 293 es generaren mitjançant la transformació amb la regió E1 de l'adenovirus 5 de fibroblasts de ronyó d'embrió humà. Les cèl·lules que han integrat aquesta regió en el seu genoma són molt importants per a la construcció i replicació dels adenovirus recombinants [Graham et al., 1977].

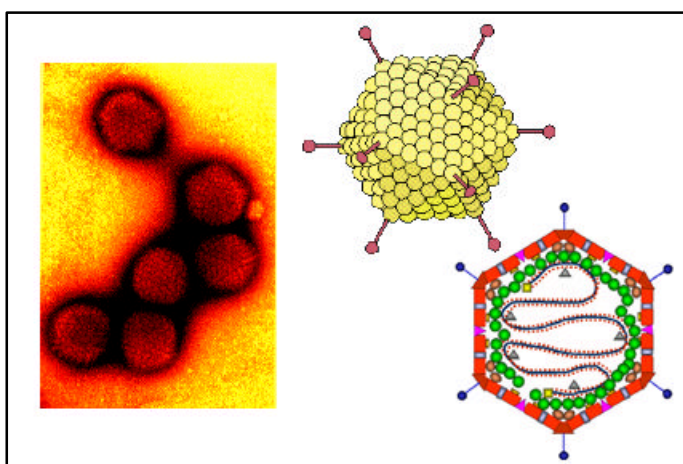


Fig. 3.1. Diversos aspectes dels adenovirus. A l'esquerra es mostra una micrografia electrònica d'adenovirus salvatges. A la dreta es representen esquemàticament els virions. Cada virió està format per 252 capsòmers i des dels àpex es projecten les fibres. En seu interior es troba el DNA de doble cadena unit covalentment en els seus extrems a proteïna (quadrats grocs). Adaptat de www.virology.net

3.1.2. Adenovirus recombinants

Els adenovirus recombinants utilitzats com a vectors de transferència gènica deriven de l'adenovirus tipus 5. Els vectors adenovírics es construeixen mitjançant la deleció d'un fragment indispensable per a la realització del cicle lític del virus. En el seu lloc s'insereix el cDNA que es desitja transferir. Els adenovirus obtinguts són infectius, produeixen l'expressió de la proteïna d'interès però no són capaços de replicar-se. Per a fer possible tant la formació com la replicació d'aquests virus recombinants cal subministrar en trans els productes gènics d'aquelles regions que li manquen. Això es realitza mitjançant línies cel·lulars que han integrat de forma estable i expressen aquests gens virals [Berkner, 92; Graham i Prevec, 1995].

Els adenovirus utilitzats en aquest treball han estat generats per deleció de la regió E1 (2.8 kb) i mitjançant l'aportació en trans d'aquesta regió per part de les cèl·lules embrionàries de ronyó 293 [Graham et al., 1977]. La capacitat màxima de DNA forà és d'aproximadament 5 kb ja que l'empaquetament dels virions està limitat a 38 kb.

En aquest capítol es descriu la construcció i la caracterització del adenovirus recombinants AdCMV-GFP, AdCMV-GFP-HsMGS i AdCMV-HsMGS així com algunes de les seves aplicacions.

3.2. Resultats

3.2.1. Clonatge dels cDNA d'interès en el plasmidi pACCMV.pLpA

El vector pACCMV.pLpA [Gluzman i Ahrens, 1982] fou creat a partir d'un plasmidi pAC en el qual s'introduí l'extrem 5' del genoma de l'adenovirus 5 deletat entre les posicions 1.3 i 9.1 mu i que correspon a la regió E1a, indispensable per a la replicació del virus. En el seu lloc s'introduí una casset de transcripció format pel promotor constituït del citomegalovirus (CMV) seguit del lloc de clonatge múltiple del plasmidi pUC19 i un senyal de poliadenilació del virus SV 40.

3.2.1.2. Clonatge del cDNA de la GFP

El cDNA de la enhanced GFP s'obtingué per digestió del plasmidi pEGFP-C2 (Clontech) amb els enzims de restricció EcoRV i BamHI. Aleshores fou clonat en l'interior del plasmidi pACCMV.pLpA previament tallat en el lloc de clonatge múltiple (EcoRI, tractament amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa, BamHI) mitjançant tècniques estàndard. Es comprovà la correcció del clonatge per restricció i transfecció en cèl·lules COS-1 per tal de veure la fluorescència que provenia de la proteïna.

3.2.1.2. Clonatge del cDNA de la GFP-HsMGS

El clonatge del cDNA de la GFP-HsMGS fou molt similar al de la GFP. El plasmidi pEGFP-HsMGS fou digerit amb NheI, tractat amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa i el fragment que contenia el cDNA d'interès tornat a tallar amb l'enzim SalI. Es purificà aquest fragment i s'introduí mitjançant lligació en el plasmidi pACCMV.pLpA previament tallat en el lloc de clonatge múltiple (EcoRI, tractament amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa, SalI) mitjançant tècniques estàndard. També es comprovà la correcció del clonatge per restricció i transfecció en cèl·lules COS-1 per mitjançant la detecció de la fluorescència que emetia de la proteïna i l'activitat GS.

replicació dels virus ja que complementen en trans la regió delecionada en el DNA víric recombinant. Finalment es produí la lisi de les cèl·lules on aquest fenomen tingué lloc alliberant-se els virions en el medi d'incubació.

3.2.3. Caracterització de clons positius

Els virus produïts per lisi de les cèl·lules 293 foren aïllats, clonats i amplificats.

3.2.3.1. AdCMV-GFP

Per tal de comprovar que l'adenovirus obtingut era capaç de dirigir l'expressió de la GFP s'infectaren cèl·lules COS-1 i es mantingueren 48 h en DMEM glucosa 25 mM per a permetre l'expressió del transgèn. Tot seguit es realitzà una transferència Western i es detectà una banda intensa de 27 kDa, el pes molecular esperat. També es fixaren cèl·lules tractades de la mateixa forma, s'observaren en un microscopi de fluorescència i es detectà una gran intensitat de fluorescència en totes les cèl·lules de la preparació (no mostrat).

3.2.3.2. AdCMV-GFP-HsMGS

En aquest cas a més de realitzar una detecció per transferència Western i immunocitoquímica de l'expressió proteica en cèl·lules COS-1 infectades, es comprovà que l'activitat GS de les cèl·lules infectades era superior respecte de les infectades amb AdCMV-GFP. S'aconseguí una activitat total GS superior i que augmentava proporcionalment amb la moi utilitzada.

També es comprovà l'eficàcia d'aquest adenovirus com a vector de transferència en miotubs. Així doncs s'infectaren miotubs en cultiu amb els virus AdCMV-GFP i AdCMV-GFP-HsMGS a una moi de 10 i es realitzà una transferència Western, 4 dies després per tal de determinar la quantitat de GS mitjançant l'ús de l'anticòs MGS3 (que descriu en el capítol 4). Com a control de càrrega s'incubà la part inferior de la membrana amb un anticòs contra l' α -actina. Les cèl·lules infectades amb l'adenovirus AdCMV-GFP-HsMGS presenten dues bandes, una corresponent a la proteïna endògena i una superior més intensa del pes molecular esperat per a la GS unida a GFP (Fig. 3.3.).

Es detectà un lleuger decrement en la mobilitat electroforètica de la MGS endògena, que suggeria un canvi en el seu estat de fosforil·lació. Aquest fenomen ja ha estat descrit per a la sobreexpressió tant de la HsMGS com de la LGS de rata en un treball del nostre grup [Gomis et al., 2002] i es deu, probablement, a una saturació del sistema de desfosforilació de la HsMGS.

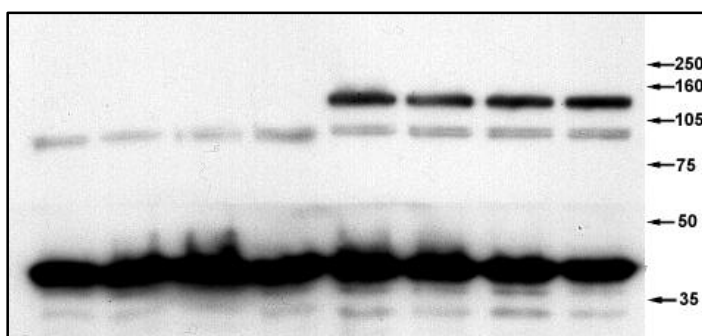


Fig. 3.3. Immunotransferència de miotubs infectats amb els virus AdCMV-GFP i AdCMV-GFP-HsMGS. Part superior : incubació amb MGS3 1/1000, secundari anti-conill a 1/10000. Part inferior: anti-actina 1/1000, secundari un anti-ratolí a 1/5000. Els 4 carrils de l'esquerra corresponen a miotubs infectats amb AdCMV-GFP a 10 moi i els quatre de la dreta a miotubs infectats amb AdCMV-GFP-HsMGS. A la dreta es mostren els pesos moleculars en kDa.

A més a més s'infectaren diferents tipus cel·lulars, es tractaren de mode similar i finalment es fixaren per analitzar la distribució de la quimera GFP-HsMGS. Es detalla el cas dels mioblasts L6 en el capítol 4, i es mostra en la fig. 4.5. Com es veu en la figura, en absència de glucosa apareix marcatge en l'interior del nucli. Així doncs la proteïna GFP-HsMGS mostrava el mateix comportament que en els experiments de transfecció, prèviament descrits pel nostre grup.

Si es manté la sobreexpressió del transgèn durant un període més llarg de temps s'observa un augment de l'expressió de la HsMGS endògena. Com es mostra en la figura 3.4. quan els extractes de cèl·lules infectades amb l'adenovirus que sobreexpressen GFP-HsMGS se sotmeten a una transferència Western amb l'anticòs MGS3, presenten a més del senyal corresponent a la proteïna sobreexpressada, una altra de la HsMGS endògena en forma de doblet. En el carril 1 es troba l'extracte de les cèl·lules de 2 dies post-infecció i en el 2 després de 20 dies. En el segon cas s'observà un augment clar de HsMGS endògena.

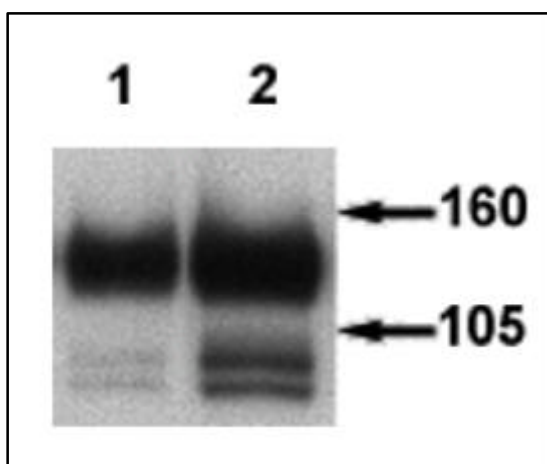


Fig. 3.4. Immunotransferència d'extractes de miotubs infectats amb els virus AdCMV-GFP-HsMGS. El carril 1 correspon a extractes de miotubs 2 dies després de la infecció amb AdCMV-GFP-HsMGS a una moi de 10. El carril 2 correspon a miotubs infectats de forma equivalent però després d'un període de 20 dies. La transferència Western es realitzà com es detalla en l'apartat de materials i mètodes. L'anticòs primari usat fou MGS3 a 1/1000 i el secundari un anti-conill a 1/10000. A la dreta es mostren els pesos moleculars en kDa.

Es comprovà que aquesta proteïna no provenia d'una degradació de la GFP-HsMGS mitjançant un a transferència Western usant un anticòs anti-GFP ja que no apareguè cap senyal d'aquesta proteïna (no mostrat).

3.2.3.3. AdCMV-HsMGS

Per determinar si l'AdCMV-HsMGS era capaç de produir una eficient sobreexpressió de l'enzim HsMGS, de forma similar al que es detalla en els apartats anteriors, s'infectaren diferents tipus cel·lulars amb l'adenovirus recombinant i s'analitzà l'activitat GS i la distribució subcel·lular de la proteïna sobreexpressada.

Se sobreexpressà la HsMGS en miotubs en cultiu així com en la línia derivada d'hepatoma de rata FTO2B. En el cas dels miotubs s'aconseguí quadruplicar l'activitat glicogen sintasa respecte el control infectat amb l'AdCMV-GFP. En la línia FTO2B l'adenovirus AdCMV-HsMGS també promogué un augment d'unes tres vegades de l'activitat glicogen sintasa tal i com es mostra en la taula 3.1.

	Infecció	GS total mU/mg prot
FTO2B	AdCMV-GFP	9.9±1.8
	AdCMV-Hs MGS	24.3±3.6
Miotubs humans	AdCMV-GFP	16.1±1.4
	AdCMV-Hs MGS	62.3 ±1.8

Taula 3.1. Sobreexpressió de la HsMGS mitjançant l'infecció amb AdCMV-HsMGS en cèl·lules FTO2B. S'infectaren les cèl·lules a una moi de 5 (FTO2B) o 10 (miotubs) i s'incubaren durant 24 h amb DMEM 10 mM glucosa (FTO2B) o DMEM 25 mM (miotubs) i després amb DMEM sense glucosa durant 14 h (FTO2B) o 24 h més (miotubs). Finalment s'incubaren amb DMEM 25 mM glucosa durant 2 h (FTO2B) o 6 h (miotubs). Les dades representen la mitjana ± SEM de sis experiments independents.

A més també es determinà la localització intracel·lular de la proteïna sobreexpressada. En la fig. 3. 5. es mostra el resultat de la immunocitoquímica de cèl·lules FTO2B infectades amb l'adenovirus AdCMV-HsMGS. Les cèl·lules s'incubaren amb DMEM sense glucosa durant 14 hores i després 2 hores més amb DMEM sense glucosa (Fig. 3.5. A, B, C) o amb glucosa 10 mM (Fig. 3.5. D, E, F). Es marcaren els nuclis cel·lulars mitjançant una tinció amb iodur de propidi i la distribució de la proteïna transgènica per immunocitoquímica usant l'anticòs MGS3.

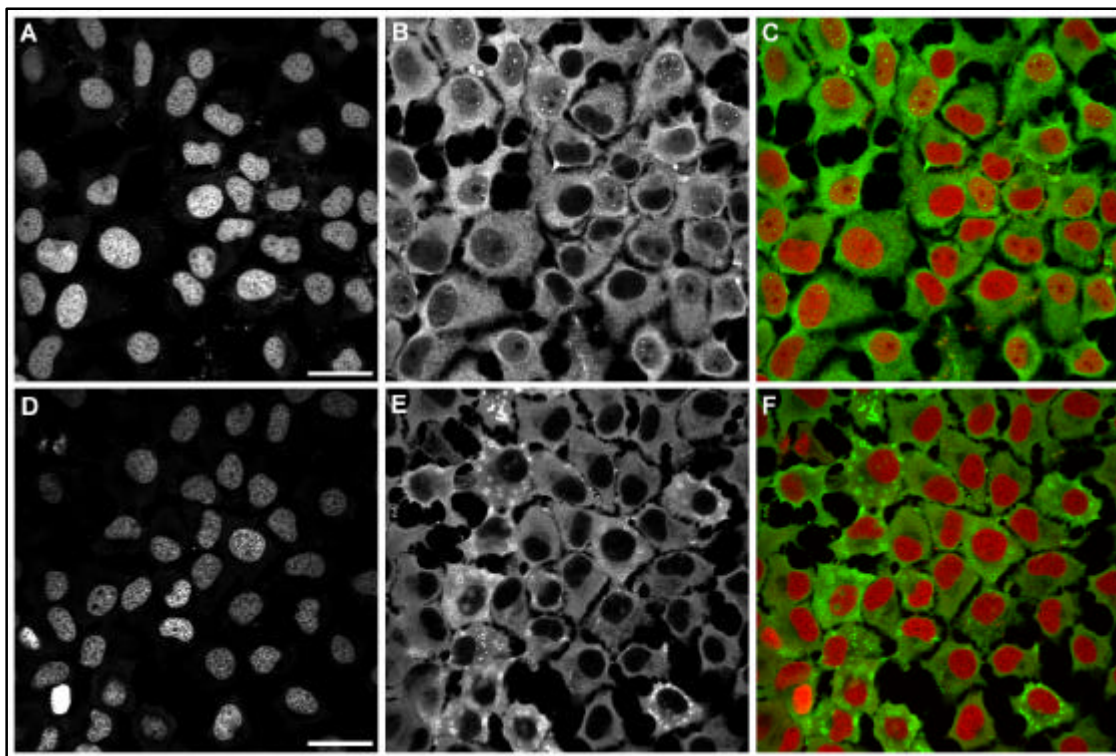


Fig 3.5. Immunocitoquímica de cèl·lules FTO2B infectades amb l'adenovirus AdCMV-HsMGS. La infecció es realitzà a una moi de 5. Després les cèl·lules s'incubaren 24 h amb DMEM 10 mM glucosa. El medi fou substituït per DMEM sense glucosa durant 14 h més i finalment les cèl·lules s'incubaren amb DMEM sense glucosa (A, B, C) o DMEM 10 mM glucosa (D, E, F) durant 2 h. Es fixaren amb paraformaldehid 4 % durant 20 min a temperatura ambient. La immunocitoquímica i l'obtenció d'imatges es realitzà tal i com es descriu en l'apartat de materials i mètodes. Les imatges representen la tinció nuclear amb iodur de propidi A i D i apareixen en vermell en les superposicions C i F. En les imatges B i E es mostra el senyal de l'anticòs anti-conill conjugat a FITC unit a l'anticòs primari MGS3 a una dilució 1/1000 i per tant representa la distribució de la MGS. En la superposició es presenta en color verd. La barra d'escala indica 20 µm.

S'aprecià que, en el cas de les cèl·lules incubades sense glucosa, apareixia un senyal nuclear en les cèl·lules infectades amb l'adenovirus. Tot i que la tinció citoplasmàtica era clara i més intensa que la nuclear s'observaren clarament partícules esfèriques en l'interior del nucli (fig. 3.5. B, C) de forma i nombre similars a les que apareixien amb la infecció amb l'AdCMV-GFP-HsMGS.

La incubació amb glucosa provocà la desaparició del senyal nuclear i la formació d'estructures anulars en el citoplasma (fig 3.5. E, F).

Així doncs, la HsMGS que sobreexpressa l'AdCMV-HsMGS conserva la distribució subcel·lular regulada descrita anteriorment per a la quimera de fusió amb GFP.

3.3. Discussió

En aquest capítol es descriu la construcció i caracterització de tres adenovirus recombinants. El primer, l'AdCMV-GFP es creà bàsicament com a eina de control de transfecció. Anteriorment s'utilitzaven virus com ara el AdCMV-lacZ, l'ús del qual necessita d'un tractament posterior amb X-gal per tal de detectar l'activitat β -galactosidasa. L'adenovirus recombinant que codifica per a la GFP elimina aquest pas ja que només cal fixar les cèl·lules i analitzar-les mitjançant microscòpia de fluorescència. També és molt útil per avaluar la transferència gènica en teixits ja que no cal tractar posteriorment les mostres i per tant s'eviten problemes de permeabilització i accessibilitat dels reactius. Usant l'AdCMV-GFP en combinació amb tècniques de microscòpia confocal o de doble fotó és possible analitzar fins i tot òrgans [Van Roessel i Brand, 2002].

Els dos virus que contenen el cDNA de la HsMGS, fusionada o no al de la GFP mostren la capacitat d'augmentar l'activitat sintasa en grau variable segons la moi utilitzada. Són per tant vectors de transferència funcionals.

L'adenovirus AdCMV-GFP-HsMGS es construí per tal de realitzar experiments de sobreexpressió de la GFP-HsMGS en models resistents a la transfecció com ara els miotubs en cultiu. La fusió a GFP de proteïnes permet el seu seguiment in vivo mitjançant tècniques de time-lapse i també és molt útil per determinar la distribució subcel·lular de la proteïna tal i com s'esmenta en la introducció. A més el fet de posseir una mida diferent de l'enzim endogen permet distingir ambdues proteïnes. Es comprovà que la proteïna sobreexpressada era catalíticament activa i que mantenia les propietats de translocació descrites.

S'observà que la sobreexpressió de la GFP-HsMGS en miotubs en cultiu durant un llarg període provocava un augment d'expressió de la HsMGS endògena. Aquest fenomen es podria justificar de formes diferents. Una possibilitat que quedava descartada era que la proteïna quimèrica es tallés en la zona d'unió entre la GFP i la HsMGS. Si aquest fos el mecanisme es formaria GFP lliure i no ha estat possible detectar-la mitjançant transferència Western. Una altra possibilitat seria que l'augment de proteïna GFP-HsMGS estabilitzés l'enzim endògen tot formant amb ell oligòmers mixts o bé que l'augment general d'enzim produís una degradació més lenta que seria detectada molt

més clarament en la forma salvatge. Finalment, la sobreexpressió de la GFP-HsMGS podria augmentar la concentració de la proteïna endògena mitjançant un augment de la seva transcripció o de l'estabilització del seu mRNA. Com es discutirà amb més detall en els capítols posteriors sembla raonable assignar a la HsMGS un paper en la regulació de la seva pròpia expressió, tot i que el mecanisme pel qual podria actuar no ha estat aclarit. El fet que la GFP-HsMGS també transloqui al nucli de forma equivalent a l'enzim salvatge suggereix que també seria capaç de realitzar aquestes tasques.

L'AdCMV-HsMGS ha estat utilitzat en estudis d'enginyeria metabòlica, per tal d'avaluar els efectes de la sobreexpressió de la HsMGS. A més a més pot usar-se també per expressar la proteïna en models on aquesta no s'expressa, com ara els hepatòcits en cultiu o línies cel·lulars d'origen hepàtic. Com ha estat demostrat l'enzim induït per la infecció amb AdCMV-HsMGS és equivalent a l'endògen. A més d'ésser catalíticament actiu també és present en el nucli de les cèl·lules infectades i tractades amb medi sense glucosa. Aquest fet confirma la no-dependència de tipus cel·lular d'aquesta translocació i que la GFP no és responsable d'aquesta distribució nuclear.

Capítol 4

4. Localització de la HsMGS endògena i caracterització de la translocació nucli-citoplasma

4.1. Introducció

Al iniciar aquesta tesi doctoral ja es coneixia que la proteïna de fusió GFP-HsMGS presentava una distribució regulada entre el nucli i el citoplasma. Tot i que ja existien alguns exemples d'enzims del metabolisme que canviaven de localització en l'interior de la cèl·lula, com ara la glucoquinasa [Fernández-Novell et al., 1999], no deixava de sorprendre que la HsMGS, encarregada de sintetitzar un producte citoplasmàtic i que posseeix una regulació molt complexa, es concentrés al nucli. Era per tant important caracteritzar més a fons aquesta translocació i sobretot, confirmar-la en la proteïna endògena de cèl·lules musculars. El fet que en absència de glucosa la proteïna s'estructurés en el nucli en partícules discretes també suggeria la possibilitat que la HsMGS posseís funcions complementaries a les metabòliques i relacionades amb els processos nuclears.

4.1.1. Localització de la HsMGS

En un treball anterior [Ferrer et al., 1997] el nostre grup havia posat de manifest que la quimera GFP-HsMGS s'acumulava en el nucli en absència de glucosa. Aquest fenomen és independent tant de la línia cel·lular en que s'expressi la proteïna com de la presència d'hormones. Es van realitzar experiments en diversos tipus cel·lulars: cultiu primari d'hepatòcits de rata, cèl·lules COS-1 i mioblasts i miotubs C₂C₁₂. En tots el casos, l'enzim unit a GFP presentava una distribució puntejada en aquelles cèl·lules incubades amb glucosa i una acumulació nuclear quan s'havia eliminat del medi de cultiu aquest monosacàrid. En el cas de les cèl·lules incubades amb glucosa, el patró citoplasmàtic que es forma correspon a estructures de síntesi de glicogen, tal i com ha estat demostrat en el capítol 2. Quan es depleciona de glucosa el medi es produeix una desaparició completa d'aquestes estructures citoplasmàtiques i es forma un patró difús i feble en el citoplasma, alhora que apareix una intens senyal nuclear. Aquesta observació podria indicar una possible relació entre el glicogen cel·lular i la translocació de la HsMGS.

La GFP-HsMGS no només s'acumula en el nucli en absència de glucosa en el medi sino que també s'estructura formant un patró puntejat en el nucleoplasma. El fet que el pes de la proteïna és de 111 kDa, superior al límit d'exclusió de transport per difusió a través del porus nuclear, exclou la possibilitat que el transport fos passiu i per difusió. Per tant aquest treball obrí un gran ventall de preguntes sobre la distribució subcel·lular de la HsMGS.

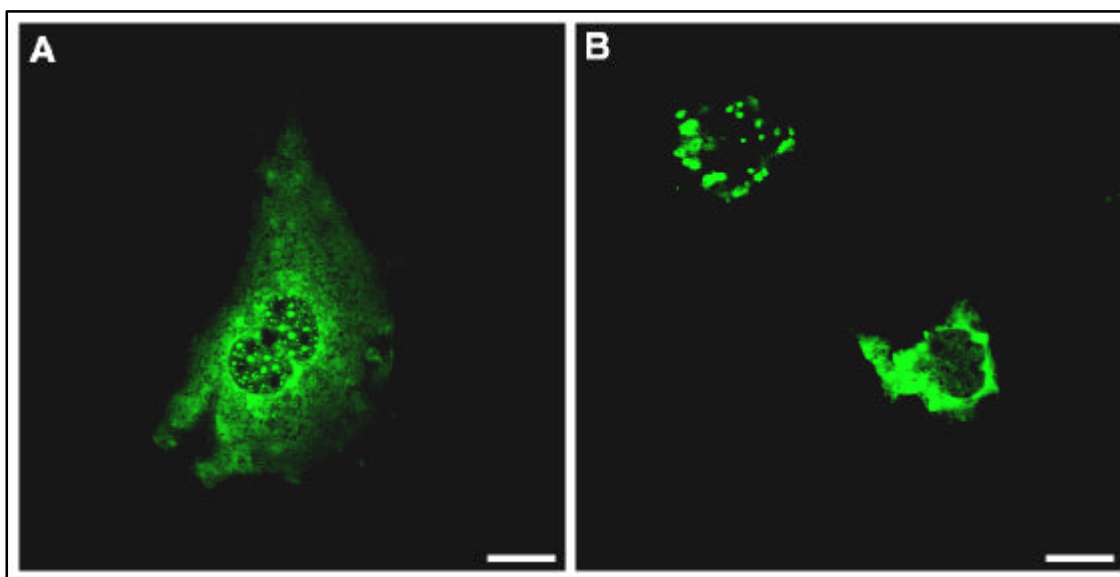


Fig. 4.1. Localització subcel·lular de la quimera GFP-Hs MGS. Es realitzà una transfecció del plasmidi pEGFP-HsMGS en cèl·lules COS-1 mitjançant Clonfectin ©. 32h després les cèl·lules s'incubaren en DMEM sense glucosa durant 16h i finalment, durant 6h amb DMEM sense glucosa, imatge A o amb DMEM que contenia 30 mM glucosa, imatge B. La fixació es realitzà amb paraformaldehid al 4% durant 20 min a temperatura ambient. L'obtenció d'imatges es realitzà tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes. La barra d'escala representa 20 μ m.

La distribució subcel·lular de la HsMGS sobreexpressada mitjançant adenovirus, tal i com es detalla en el capítol 3, és idèntica a l'obtinguda amb la quimera GFP-HsMGS, fet que confirma que la HsMGS per si sola és capaç de ser dirigida al nucli de les cèl·lules en absència de glucosa en el medi.

Altres treballs tractaren de determinar la localització subcel·lular de la MGS en mamífers i no detectaren una localització nuclear però sí una associació amb components del citoesquelet. En el treball de Lane i col·laboradors, es descriu l'associació de la MGS de conill amb el disc Z de les fibres musculars [Lane et al., 1989]. En un de més recent Nielsen i col·laboradors electroestimularen músculs de rata per tal de deplecionar el glicogen i observaren una disminució en la tinció citoplasmàtica i un augment en el senyal perinuclear. Mitjançant fraccionament cel·lular presentaren resultats que indicaven una associació de la MGS amb el citoesquelet [Nielsen et al., 2001]. Restava doncs per confirmar la translocació en la proteïna no quimèrica i determinar la possible relació amb el glicogen.

4.1.2. Enzims del metabolisme i distribució subcel·lular

Existeixen molts exemples d'enzims amb localitzacions subcel·lulars definides que o bé responen a una optimització metabòlica o bé a d'altres

funcions no relacionades directament amb el seu paper en les vies metabòliques.

Les hexoquinases de mamífers són un grup destacat en aquest aspecte. Existeixen 4 isoformes anomenades hexoquinasa (HK) I, II, III i IV aquesta última coneguda també com a glucoquinasa (GK) [Wilson, 1997; Inedjian, 1993]. Tant l'HK I com la II es troben unides a mitocondris, tot i que la segona isoforma també presenta una fracció citosòlica [Katzen et al., 1970]. S'ha relacionat la unió a mitocondris amb una millor canalització de l'ATP cap a la glucòlisi. En el cas de la HK II a més s'ha descrit que intervé en la inhibició de l'apoptosi [Pastorino et al., 2002]. En canvi l'HK III es localitza en la zona perinuclear sense que hagi estat demostrada cap funció específica per a aquesta localització [Preller i Wilson, 1992].

La GK és especialment important com a exemple de translocació nucli-citosol d'enzims metabòlics. La proteïna reguladora de la glucoquinasa (GKRP) s'uneix a la GK formant un complex tot inhibint-li l'activitat fosforiladora de glucosa. La formació d'aquest complex és depenent de les concentracions de fructosa 1-fosfat (que inhibeix la formació del complex) i de fructosa 6-fosfat (que l'afavoreix) [van Schaftingen, 1994]. Tant la GK com la GKRP es concentren en l'interior del nucli dels hepatòcits d'animals en dejuni [Fernández-Novell et al., 1999] o en condicions que imiten aquest estat [Brown et al., 1997; Toyoda et al., 1994]. En resposta a glucosa, la GK i segons alguns autors també la GKRP transloquen cap al citoplasma. Diferents treballs presenten evidències que la GKRP determina en gran mesura la localització subcel·lular de la GK tant actuant com a factor de retenció nuclear [Brown et al., 1997] com en el seu transport dins i fora del nucli [Bosco et al., 2000; de la Iglesia et al., 1999; Mukhtar et al., 1999; Shiota et al., 1999].

Un altre enzim, la isoforma hepàtica de la glicogen sintasa (LGS) també mostra canvis en la seva localització subcel·lular en resposta a diferents situacions metabòliques. El nostre laboratori ha demostrat que la LGS de rata transloca cap a la perifèria de la cèl·lula a l'hora d'iniciar la síntesi de glicogen [Fernandez-Novell, 1997; Garcia-Rocha et al., 2001] i que en canvi es distribueix uniformement pel citoplasma en situacions de dejuni. Aquesta distribució perifèrica coincideix amb la deposició de glicogen que majoritàriament s'inicia en la perifèria cel·lular i va dirigint-se després cap a l'interior cel·lular [García-Rocha et al., 2001].

La gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa és potser el paradigma de la relació entre distintes localitzacions subcel·lulars i diferents funcions no relacionades amb el metabolisme. Aquest enzim, a més de formar part de la via glucolítica en el citosol, participa en la membrana plasmàtica en endocitosi, dins el nucli en reparació i replicació del DNA i en el trànsit nucli-citoplasma en

l'export de tRNA i de nou en el citosol en la unió a 5'UTR i 3'UTR de diferents mRNA jugant un paper en el control de l'expressió gènica [Sirover, 1997].

4.1.3. El nucli i la seva arquitectura funcional

La presència del nucli cel·lular defineix el domini eukarya, els organismes eucariotes. El nucli està delimitat per una doble membrana que forma un continu amb el reticle endoplasmàtic i que s'anomena embolcall nuclear. Així doncs i des del punt de vista topològic, l'interior del nucli és equivalent al citoplasma. En aquest espai es troba el material cromosòmic i tot d'estructures més o menys definides formades per proteïnes i RNA. La diferència bàsica entre el citoplasma i el nucleoplasma és la falta d'òrgans membranosos en el nucli que sí que apareixen en el citoplasma. L'intercanvi entre el citoplasma i el nucleoplasma determina la composició específica de l'interior del nucli. El transport es regula mitjançant estructures multiproteïques: els porus nuclears, i les proteïnes de transport que determinen quines macromolècules són importades i quines exportades [Gorlich i Kutay, 1999].

El nucli conté diferents subestructures que es caracteritzen per no posseir membranes que les delimitin, però que poden considerar-se compartiments per diferents raons: contenen un seguit de proteïnes residents; poden ésser morfològicament identificades per microscòpia òptica i electrònica i també en cèl·lules vives mitjançant tècniques de marcatge amb GFP; i per que, almenys per a algunes d'elles, poden aïllar-se bioquímicament en una forma enriquida [Dundr i Misteli, 2001].

Els compartiments nuclears més estudiats són el nuclèol, els compartiments de factors d'empalmament (splicing factor compartment, SCF), els cossos de Cajal i els cossos de l'oncoproteïna de la leucèmia promielocítica (PML), però n'hi ha d'altres i constantment se'n defineixen de nous.

El nuclèol és el compartiment nuclear més important i fàcilment identificable. La seva funció principal és la formació de les subunitats ribosomals i estan compostats per diverses zones anomenades centre fibril·lar, component fibril·lar dens i component granular. El nuclèol s'estructura al voltant dels clústers dels gens ribosomals o rDNA repetits en tàndem que existeixen en el cas dels humans en els cromosomes 13, 14, 15, 21 i 22. Aquests gens són transcrits per la RNA polimerasa I, en el centre fibril·lar. Aleshores els pre-rRNA són modificats mitjançant metil·lació i transformació d'uridines en pseudouridines en els components fibril·lars densos. Finalment en els components granulars els rRNA acaben d'ésser modificats i s'ensamblen

amb les proteïnes ribosomals [Scheer i Hock, 1999; Carmo-Fonseca et al., 2000; Olson et al., 2000].

Els compartiments de factors d'empalmament o SCF estan formats per les anomenades fibril·les pericromàtiques i pels clústers granulars intercromàtics (IGC). Les fibril·les pericromàtiques estan formades per nous transcrits i per tant són els llocs primaris de transcripció. Els IGC es componen de grànuls densos connectats per fibres. Actualment es creu que el processament de RNA està unit físicament a la maquinària de transcripció i que els IGC funcionarien com zones d'emmagatzematge i ensamblatge dels factors d'empalmament. Existeixen diferents marcadors proteics per a aquests compartiments, com l'antigen Sm, que es present en les ribonucleoproteïnes petites (snRNP) i apareix en els SCF a més d'altres zones del nucli. En canvi el SC-35, un factor d'empalmament de tipus no snRNP, apareix principalment en els IGC [Misteli, 2000].

Els cossos de Cajal són estructures esfèriques que es presenten en el nucli en un nombre variable, entre 1 i 5, i que contenen alguns factors d'empalmament, factors basals de transcripció i factors activadors i especificadors de tall i poliadenil·lació, així com alguns components nucleolars. Una de les proteïnes marcadores és la p80-coilina, que és una fosfoproteïna que s'acumula bàsicament als cossos de Cajal [Raska et al., 1991]. Algunes de les funcions proposades per a aquest compartiment són: el transport i maduració de snRNP i ribonucleoproteïnes nucleolars petites (snoRNP); l'activació transcripcional per part de factors inclosos en aquests compartiments de gens de les histones i dels RNA de les snRNP i snoRNP, ja que sembla que els cossos de Cajal estan associats als loci d'aquests gens. També que podrien ser punts d'ensamblatge de la maquinària de transcripció general [Gall, 2000; Gall, 2001].

Els cossos nuclears o cossos PML es troben arreu del nucleoplasma i apareixen en nombre variable, normalment entre 10 i 30. Sovint s'associen amb els cossos de Cajal i amb uns altres tipus de compartiments anomenats cossos de tall formant triplets. Es caracteritzen per contenir la proteïna de la leucèmia promielocítica, PML i han estat implicats en diferenciació cel·lular tardana, regulació de la transcripció, emmagatzematge de productes de la transcripció dins del nucli, control del creixement i apoptosi [Zhong et al., 2000].

Els objectius desenvolupats en aquest capítol foren la caracterització d'un anticòs específic per a la HsMGS i l'avaluació de les seves possibles aplicacions; la confirmació de la translocació de la HsMGS endògena usant cèl·lules musculars humanes en cultiu i la caracterització de la localització subnuclear d'aquesta proteïna.

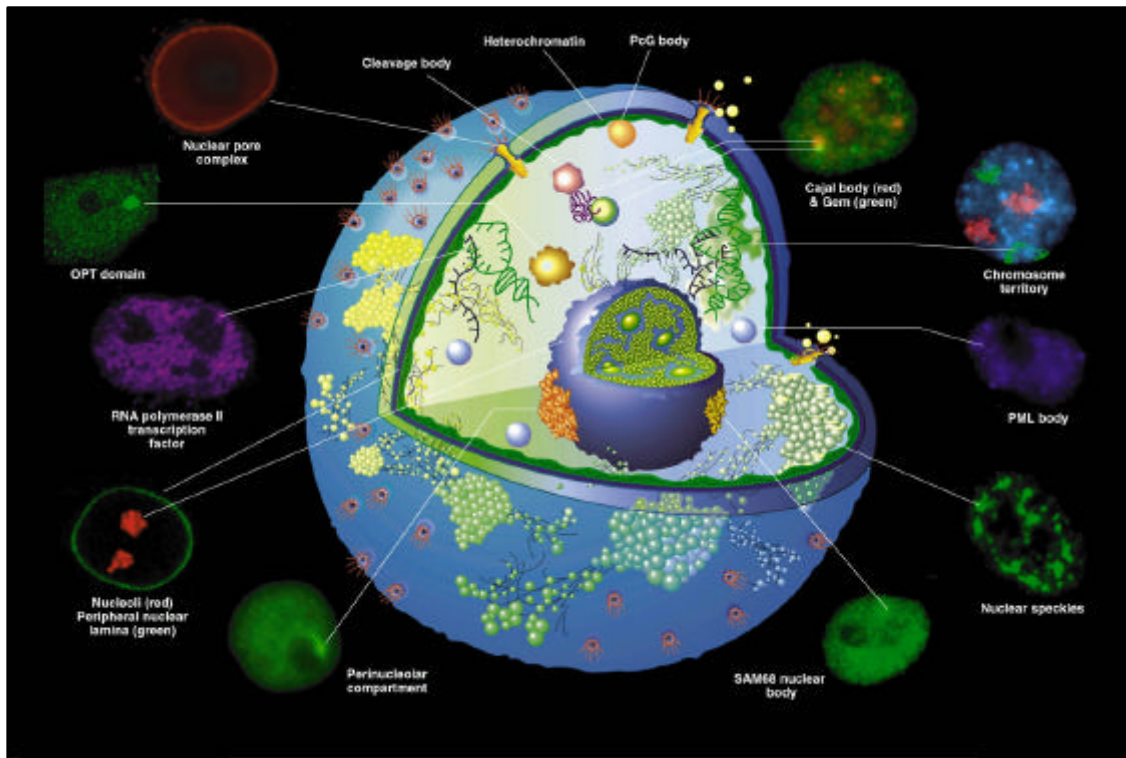


Fig. 4.2. Diagrama d'els diferents dominis nuclears. Adaptat de [Spector, 2001].

4.2. Resultats

4.2.1. Caracterització de l'anticòs MGS3 contra la HsMGS

A l'hora de determinar localització subcel·lular de la HsMGS calia disposar d'un anticòs específic i d'alta afinitat per a aquesta proteïna. El grup disposava d'un sèrum immune obtingut en conill contra un pèptid corresponent als 9 últims aminoàcids de l'extrem carboxil de la HsMGS (729 TSSLGEERN 737), però no havia estat caracteritzat.

Els passos per a la caracterització de l'anticòs MGS3 foren: detecció de la proteïna desnaturalitzada mitjançant SDS-PAGE i transferència Western; assaigs d'immunoprecipitació i detecció de l'activitat en l'immunoprecipitat i finalment immunocitoquímica.

Primer es realitzà una electroforesi desnaturalitzant amb SDS en gel de poliacrilamida i una transferència Western posterior per tal de detectar l'enzim amb diferents dilucions del sèrum immune (Fig. 4.3.). Les mostres a carregar foren extractes de cèl·lules COS-1 transfectades o no amb el plasmidi GFP-HsMGS i de cèl·lules C₂C₁₂ (mioblasts de ratolí). Els resultats mostren com l'anticòs MGS3 detectà una banda d'uns 85 kDa en el carril corresponent a

l'extracte de cèl·lules C₂C₁₂. Aquesta línia cel·lular prové de múscul de ratolí i la MGS d'aquest animal també conté l'epítip usat per crear l'anticòs. També apareix clarament una banda corresponent a la proteïna de fusió GFP-HsMGS de pes aparent aproximat de 115 kDa (85 kDa més la GFP que pesa 30 kDa). En canvi no es detectà la presència de MGS en les cèl·lules COS-1 no transfectades.

S'homogenitzaren cèl·lules COS-1 transfectades amb el plasmidi pEGFP-HsMGS i els extractes se sotmeteren a immunoprecipitació amb l'anticòs MGS3 o bé sense anticòs com a control. Tot seguit es determinà l'activitat glicogen sintasa tant els precipitats com en els sobrenedants. El sobrenedant resultat de la immunoprecipitació amb MGS3 presentà una disminució del 50% d'activitat respecte el sobrenedant tractat sense anticòs. De forma corresponent, el precipitat que provenia de l'immunoprecipitació amb MGS3 presentava el doble d'activitat sintasa que el control.

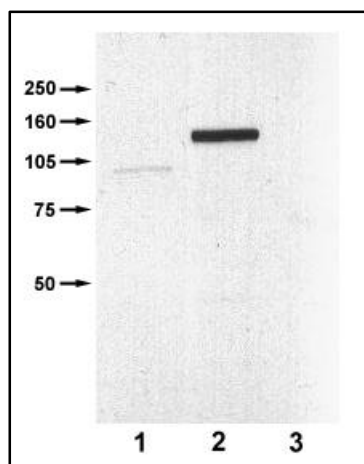
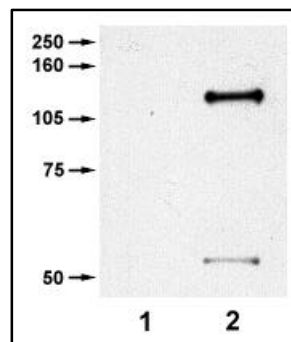


Fig. 4.3. Immunotransferència amb MGS3. Es carregaren 5 µg de proteïna d'extractes de cèl·lules preparats amb el tampó GS (veure materials i mètodes). El carril 1 conté extracte de cèl·lules C₂C₁₂, el 2 de cèl·lules COS-1 transfectades amb el plasmidi pEGFP-HsMGS i el 3 conté proteïna de cèl·lules COS-1 sense transfectar. La dilució del sèrum immune usada en la transferència Western mostrada és de 1/1000. Com a anticòs secundari s'emprà un anti-conill unit a la peroxidasa de rave a una dilució 1/5000. A l'esquerra de la figura s'indiquen els pesos moleculars en kDa.

Aquestes mostres també se sotmeteren a transferència Western per tal de confirmar la presència de GFP-HsMGS. Com es detalla en la figura 4.4. apareguè una banda d'uns 115 kDa, que corresponia a la GFP-HsMGS immunoprecipitada per l'anticòs MGS3.

Per determinar si l'anticòs MGS3 resultava útil en experiments d'immunocitoquímica s'infectaren mioblasts L6 amb l'AdCMV-GFP-HsMGS per, posteriorment sotmetre les cèl·lules a un procés d'immunocitoquímica i comparar el senyal fluorescent de la GFP-HsMGS i el derivat de la unió de l'anticòs. Dos dies després de la infecció, les cèl·lules s'incubaren amb un medi de cultiu sense glucosa durant unes 16h. El dia de l'experiment les cèl·lules crescudes sobre cobreobjectes de vidre s'incubaren amb o sense glucosa 30 mM durant 6 hores. Es fixaren i es realitzà una immunocitoquímica amb l'anticòs MGS3.

Figura 4.4. Detecció de la GFP-Hs MGS immunoprecipitada per l'anticòs MGS3. Es carregaren 5µl dels immunoprecipitats bé sense anticòs (carril 1) o amb 10 µl de MGS3 i es realitzà una SDS-PAGE al 10% d'acrilamida i posteriorment un Western blot usant l'anticòs Lawrence a 1/5000 i un secundari anti-pollastre unit a peroxidasa de rave diluït a 1/5000. A l'esquerra de la figura s'indiquen els pesos moleculars en kDa.



En la figura 4.5. es mostra la superposició de les imatges obtingudes, on en verd es representa la fluorescència que provenia de la GFP i en vermell el marcatge amb l'anticòs MGS3. Així doncs, apareixen en color groc aquelles zones on ambdós senyals col·localitzen. En el cas de les cèl·lules incubades sense glucosa (fig. 4.5. A), la GFP-HsMGS es troba principalment dins del nucli formant uns agregats puntejats i una tinció difosa, però només en els punts d'agregació apareix col·localització, en groc, mentre que la resta del nucli roman verda. Això podria explicar-se si la immunodetecció en l'interior del nucli és troba dificultada i només en aquells punts de màxima concentració de la proteïna l'anticòs produeix un senyal clar. En el citoplasma, en canvi, la col·localització és molt elevada. Les cèl·lules incubades amb glucosa (Fig. 4.5. B) mostren una col·localització completa. Ambdues MGS, l'endògena i la sobreexpressada es distribueixen al citoplasma formant agrupacions anulars al voltant del nucli. El fet que en aquestes estructures es concentri gairebé tot el senyal fluorescent no permet distingir els límits cel·lulars. Cal esmentar que el grau d'expressió de la GFP-HsMGS és diferent en cada cèl·lula fet que produeix diferents tonalitats de groc, però en cap cas, s'observaren cèl·lules incubades amb glucosa amb fluorescència verda ã llada.

La caracterització de l'anticòs MGS3 permetè establir una sèrie de conclusions. En primer lloc l'anticòs MGS3 era específic per a la sintasa de múscul i una bona eina per tal de detectar la HsMGS, tant de forma desnaturalitzada, com en el cas d'una transferència Western, com de forma nadiua. El producte de l'immunoprecipitació conservà l'activitat catalítica i per tant es confirmava l'alta especificitat del sèrum immune. Els experiments d'immunofluorescència indicaven a més que la detecció de la HsMGS dins el nucli era més difícil que en el citoplasma. Això justificava en certa forma el fet que la localització intranuclear de l'enzim no hagués estat descrita amb anterioritat.

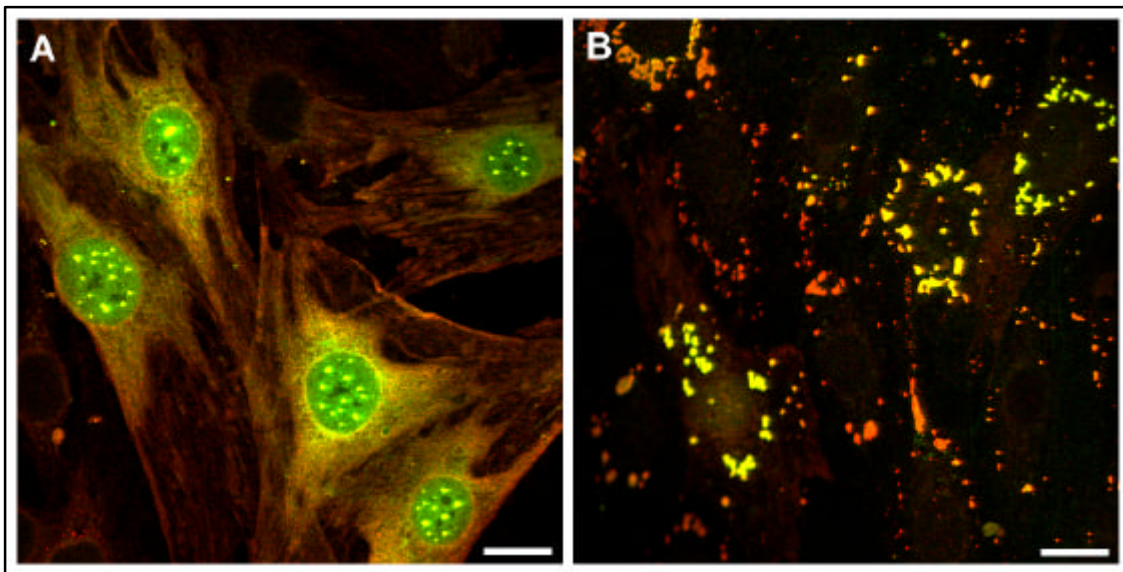


Fig. 4.5. Immunocitoquímica de mioblasts L6 infectades amb l'adenovirus AdCMV-GFP-Hs MGS. La infecció es realitzà amb una moi de 10. 32h després de la infecció les cèl·lules s'incubaren en DMEM sense glucosa durant 16h i finalment, durant 6h amb DMEM sense glucosa (imatge A) o amb DMEM que contenia 30 mM glucosa (imatge B). La fixació es realitzà amb paraformaldehid al 4% durant 20 min a temperatura ambient. La immunocitoquímica i l'obtenció d'imatges es realitzaren tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes. L'anticòs primari usat fou MGS3 a una dilució 1/1000 i el secundari un anti-conill conjugat a Texas Red a una dilució 1/200. La barra d'escala representa 20 μm .

4.2.2. Immunolocalització de la HsMGS en cèl·lules musculars en cultiu

Per tal de determinar la localització subcel·lular de la HsMGS s'escollí com a model el cultiu primari humà ja que expressava de forma endògena la proteïna i a més era possible formar miotubs multinucleats que presenten una major diferenciació cel·lular i una major expressió de la HsMGS.

Així doncs es procedí a créixer mioblasts sobre vidre per després diferenciar-los a miotubs (veure apartat de materials i mètodes). Un cop obtinguts, s'incubaren, en un primer experiment, durant 16h en DMEM sense glucosa i tot seguit amb DMEM amb o sense glucosa 30 mM durant 6 h més. Finalment es fixaren amb paraformaldehid al 4% i es realitzà una immunocitoquímica usant l'anticòs MGS3. Les cèl·lules incubades amb glucosa (fig. 4.6. B) mostraven una senyal per a la HsMGS intensa formant estructures esfèriques o anulars, especialment al voltant dels nuclis o properes a la membrana plasmàtica. En el cas de les cèl·lules tractades amb medi sense glucosa (fig. 4.6. A) aquestes estructures eren més petites i la senyal difosa del citoplasma semblava més intensa. Tot i això no desapareixien i no s'observà una tinció nuclear clara.

Calia doncs variar tant les condicions de l'experiment i de la immunocitoquímica per tractar de reproduir els resultats obtinguts amb la GFP-HsMGS. L'ús de metanol per a fixar les cèl·lules així com un pas de permeabilització addicional millorà molt la visualització. També s'empraren drogues com l'isoproterenol, un agonista adrenèrgic que activa la glicogenolisi tot augmentant la concentració del AMPc, així com la forskolina que també provoca aquest efecte gràcies a l'activació de l'adenilat ciclase. Finalment s'aconseguí detectar l'enzim en el nucli d'algunes cèl·lules. En tots els casos en que no existia una tinció granular en el citoplasma aparegué un senyal nuclear clar i intens. Així doncs, la presència de HsMGS en el nucli no era una resposta general sinó que depenia de l'estat metabòlic de cada cèl·lula (fig. 4.7.).

Aquests resultats indicaven que la translocació al nucli semblava dependre de la concentració de glicogen present en cadascuna de les cèl·lules. Com els miotubs en cultiu presenten una acumulació de glicogen molt més elevada que les cèl·lules COS-1 o L6, calia activar fortament la glicogenolisi i tot i amb això les cèl·lules responien de forma diferent. Per tant la presència dins el nucli de la HsMGS no era homogènia en les preparacions microscòpiques.

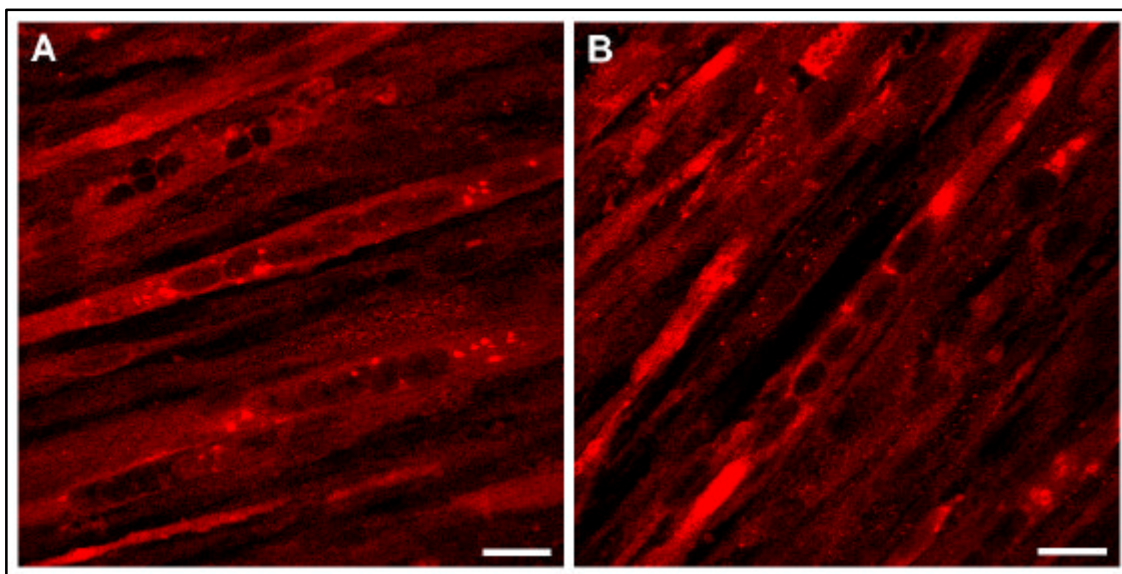


Fig 4.6. Immunocitoquímica de miotubs humans en cultiu usant l'anticòs MGS3.

Els miotubs s'incubaren durant 16 h amb DMEM sense glucosa i després amb DMEM sense (A) o amb (B) glucosa 30 mM durant 6 h. La fixació es realitzà amb paraformaldehid al 4% durant 20 min a temperatura ambient. La immunocitoquímica i l'obtenció d'imatges es realitzaren tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes. L'anticòs primari usat fou MGS3 a una dilució 1/1000 i el secundari un anti-conill conjugat a Texas Red a una dilució 1/200. La barra d'escala representa 20 μ m.

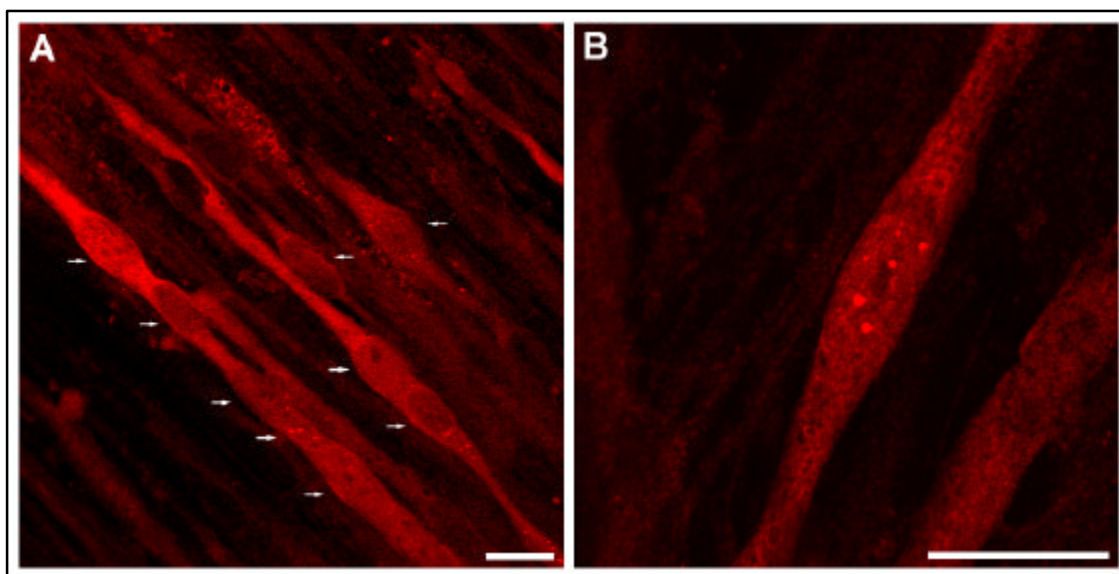


Fig 4.7. Immunocitoquímica optimada de miotubs humans en cultiu usant l'anticòs MGS3. Els miotubs s'incubaren durant 16 h amb DMEM sense glucosa i després amb DMEM sense glucosa i isoproterenol 100 μ M durant 1 h;(A) o sense glucosa durant 6 h (B). La fixació es realitzà amb metanol a -20 °C durant 15 min. L'immunocitoquímica i l'obtenció d'imatges es realitzaren tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes. L'anticòs primari usat fou MGS3 a una dilució 1/1000 i el secundari un anti-conill conjugat a Texas Red a una dilució 1/200. En el panell A les fletxes assenyalen la posició dels nuclis. La barra d'escala representa en ambdues imatges 20 μ m.

Per determinar la possible relació entre la concentració de glicogen i la translocació de la sintasa tal i com suggerien aquests experiments, es realitzà una anàlisi utilitzant cèl·lules COS-1 transfectades, que presentaven menys dispersió en la distribució subcel·lular de l'enzim.

4.2.3. Relació entre la translocació de la HsMGS i el glicogen intracel·lular

Es transfectaren cèl·lules COS-1 amb el plasmidi pEGFP-HsMGS mitjançant el mètode DEAE-dextrà. Les plaques contenien un cobreobjectes de vidre per tal de ser extret i fixat abans de la determinació de glicogen. Així el dia abans de l'experiment les cèl·lules s'incubaren amb DMEM amb glucosa 25 mM. El dia de l'experiment s'incubaren amb diferents medis que contenien sempre cicloheximida per inhibir la síntesi proteica. Les diferents condicions eren: medi amb glucosa 30 mM durant 6h, sense glucosa 6h i sense glucosa amb forskolina 100 μ M durant 1, 3 i 6 hores.

S'extragueren els cobreobjectes i es fixaren amb paraformaldehyd. Paral·lelament es determinà el contingut de glicogen de les plaques. La translocació s'avaluà per comptatge en un microscopi de fluorescència i es determinà per a 100 o més cèl·lules per cobreobjectes. Els resultat en forma

de gràfic es presenta en la figura 4.8. Com s'observa apareix una relació de tipus exponencial entre la presència de la GFP-HsMGS al citoplasma i la concentració de glicogen. Sembla doncs clar que el glicogen impedeix en certa mesura la translocació de la sintasa al nucli, ja que cal la seva degradació per a que les cèl·lules presentin l'enzim concentrat en el nucli.

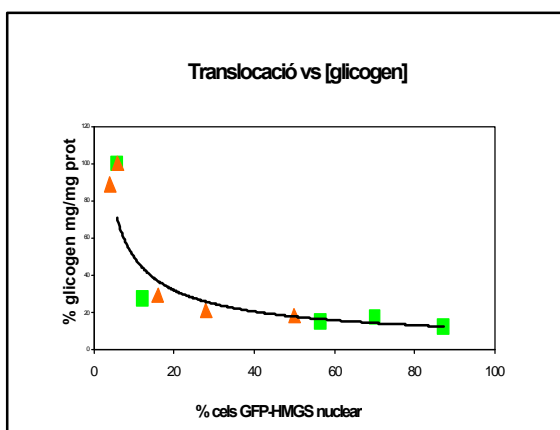


Fig. 4.8. Relació entre la concentració intracel·lular de glicogen i la distribució intracel·lular de la GFP-HsMGS. Els valors de glicogen representen el tant per cent respecte el valor més elevat per tal d'equiparar els tres experiments independents (en diferents colors). La translocació s'avaluà per microscòpia de fluorescència per a 100 o més cèl·lules per punt.

4.2.4. Immunolocalització de la MGS d'un model d'adipòcits

La isoforma muscular de la glicogen sintasa, és anomenada així per que fou caracteritzada a partir d'aquest teixit però de fet podria dir-se isoforma ubiqua o general per que és la que apareix en la majoria de teixits dels mamífers a excepció del fetge i possiblement dels testicles i el pàncrees. Així doncs es realitzaren experiments similars als exposats en l'apartat 4.2.2. en un model d'adipòcits en cultiu, les cèl·lules 3T3-L1. Aquest cultiu posseeix certes característiques dels adipòcits blancs com la capacitat d'acumular greixos en gotes lipídiques així com la seva sensibilitat a insulina.

Cèl·lules diferenciades es mantingueren durant 16 hores en DMEM sense glucosa o que en contenia a una concentració de 25 mM. Les cèl·lules es fixaren i es realitzà una immunocitoquímica usant l'anticòs MGS3. Els resultats es mostren en la figura 4.8. S'observà com en els nuclis de les cèl·lules apareixen partícules discretes amb marcatge intens per MGS3 indicant que el fenomen de translocació i agregació de la MGS no són exclusius de les cèl·lules muscuñars o deguts a la sobreexpressió de l'enzim. En el cas de les cèl·lules incubades amb glucosa aquesta tinció nuclear no apareix.

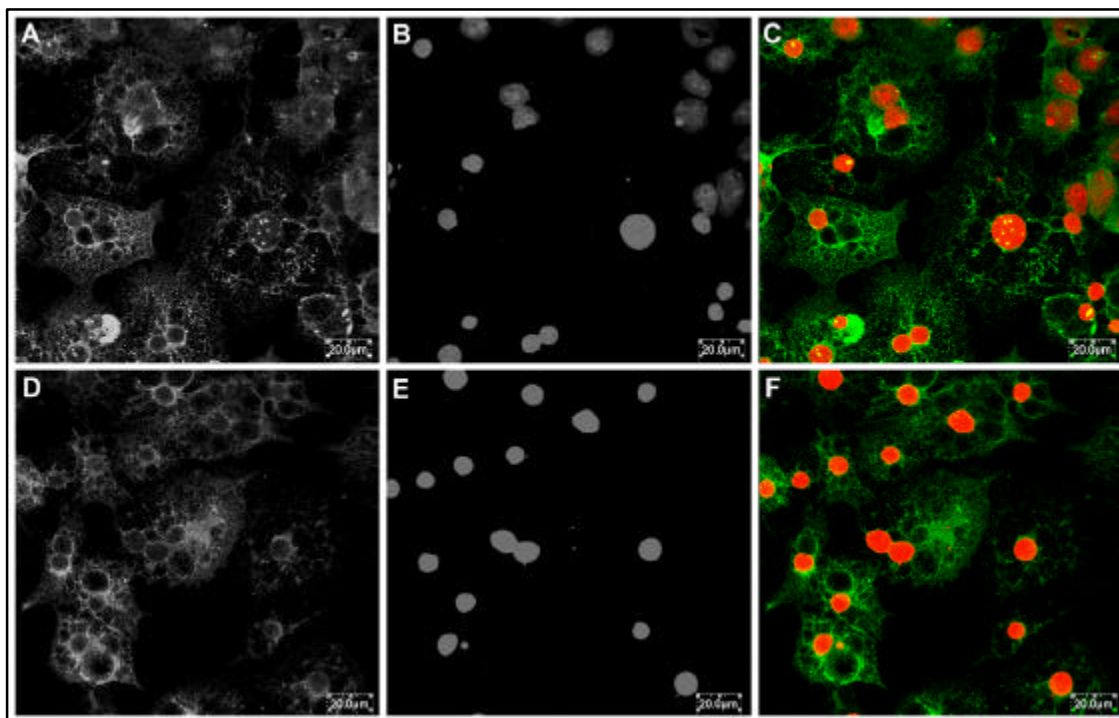


Fig. 4.9. Immunocitoquímica de cèl·lules 3T3-L1 amb l'anticòs MGS3. Cèl·lules 3T3-L1 diferenciades s'incubaren durant 16 h amb DMEM sense glucosa (A, B, C) o amb DMEM 25 mM glucosa (D, E, F). En les imatges A i D es mostra la tinció derivada de la immunocitoquímica amb l'anticòs MGS3 (en verd a la superposició d'imatges), en les imatges B i E es mostra la tinció nuclear amb iodur de propidi (en vermell a la superposició d'imatges) i en les C i F la combinació d'imatges. La fixació es realitzà amb paraformaldehid al 4% durant 20 min a temperatura ambient. La immunocitoquímica i l'obtenció d'imatges es realitzaren tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes. L'anticòs primari s'usà a una dilució 1/1000 i el secundari un anti-conill conjugat a FITC a una dilució 1/100. La barra d'escala representa 20 µm.

4.2.5. Distribució subnuclear de la HsMGS i efecte de la actinomicina D

Si s'observen detalladament les imatges tant de la GFP-HsMGS com de l'enzim endogen quan es troben en l'interior del nucli, s'aprecia que la seva distribució es dual, difosa pel nucleoplasma però també formant partícules esfèriques de nombre variable. El fet que aquestes partícules apareguessin gairebé sempre en totes les cèl·lules analitzades permetia especular que la HsMGS es dirigís a algun compartiment subnuclear com ha estat descrit per a moltes altres proteïnes nuclears. El nuclèol no apareixia mai marcat, tot i que algunes cèl·lules presentaven marcatges adjacents amb l'anticòs MGS3.

Així doncs es realitzaren experiments de doble marcatge amb l'anticòs MGS3 i diversos anticossos contra proteïnes marcadores de compartiments subnuclears.

S'escolliren marcadors de centròmers, com a control de marcatge nuclear, l'antigen Sm i les proteïnes PML, SC-35 i p80-coilina. S'usaren tant miotubs com cèl·lules COS-1 transfectades, ja que en el cas de la immunocitoquímica amb l'anticòs anti-p80-coilina existia una incompatibilitat entre el mètode de fixació amb metanol i la unió de l'anticòs.

Les cèl·lules es tractaren per tal que la GS es trobés dins del nucli i un cop fixades es sotmeteren a una doble immunocitoquímica amb els diversos anticossos dirigits contra els marcadors esmentats anteriorment. No existia col·localització entre la HsMGS i l'antigen centromèric, l'antigen Sm i SC-35. En canvi per a PML semblava que ocorria un efecte d'emascament similar a l'observat i descrit en el capítol 2 entre la GFP-HsMGS i el glicogen (Fig. 4.10. A). Mentre que per a les cèl·lules sense marcatge nuclear de MGS apareixia un senyal clar de PML, els miotubs que presentaven una distribució nuclear de la HsMGS perdien aquesta tinció. En aquest últim cas el poc senyal provinent del marcatge de PML apareixia de forma adjacent a les agregacions de HsMGS. En canvi per a p80-coilina apareixien cèl·lules amb marcatges adjacents o bé coincidents, fent pensar en una possible localització de la HsMGS en els cossos de Cajal (Fig. 4.10. B).

La formació dels compartiments nuclears depèn en gran mesura de la transcripció. És per això que els inhibidors de la transcripció produeixen un reordenament de les proteïnes i els RNA presents en els diferents dominis nuclears. Per tal de comprovar la presència de la HsMGS en una d'aquestes estructures subnuclears es realitzaren experiments de time-lapse utilitzant miotubs infectats amb l'adenovirus AdCMV-GFP-HsMGS. Es tractaren amb medi sense glucosa durant 16 h i després amb DMEM sense glucosa i 100µM forskolina durant 2 h més. Durant l'experiment les cèl·lules s'incubaren amb DMEM sense glucosa, Hepes 30 mM i actinomicina D 10 µg/ml. A aquesta concentració totes les RNA polimerases són inhibides. El resultat, en forma de vídeo, es troba en el disc compacte annex. Les agrupacions inicials de GFP-HsMGS desapareixen per formar-se'n de noves més petites i finalment el senyal es difon totalment pel nucli. Aquests resultats coincideixen amb les immunocitoquímiques de miotubs tractats amb actinomicina D a temps variables.

Sembla clar doncs que la HsMGS presenta una localització concreta en el nucli, probablement en els cossos de Cajal i que varia amb l'estat transcripcional de la cèl·lula.

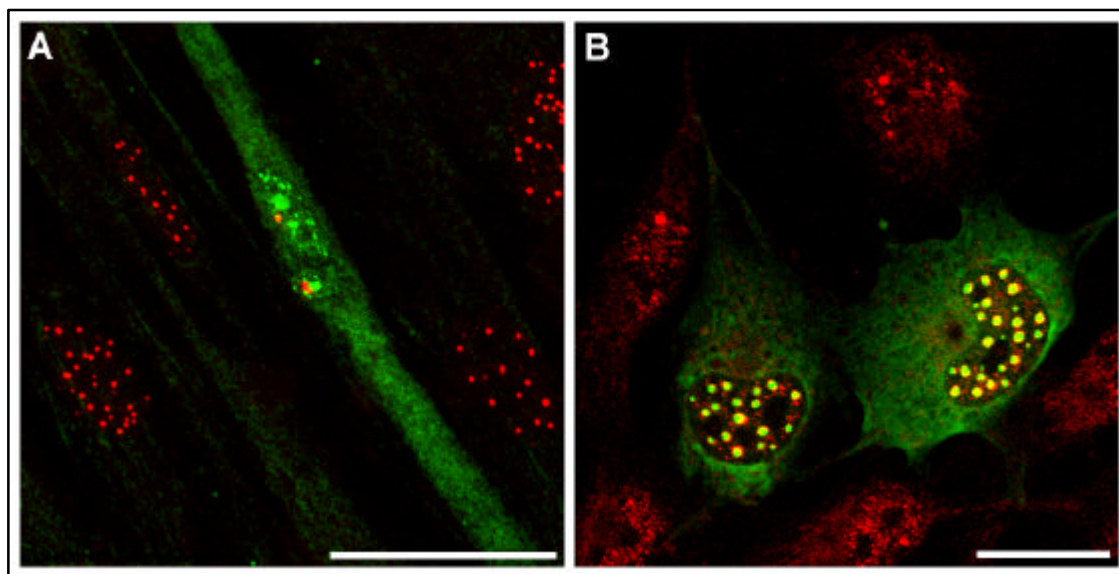


Fig. 4.10. Distribució intranuclear de la HsMGS i la GFP-HsMGS. En el panell A es mostra una doble immunocitoquímica amb MGS3 (verd) i α PML (vermell) en miotubs tractats durant 22 h sense glucosa. En el panell B es mostra una immunocitoquímica amb α p80-coilina (vermell) de cèl·lules COS-1 transfectades amb el plasmidi pEGFP-HsMGS. l'obtenció d'imatges es realitzaren tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes. Els anticossos secundaris usats foren un anti-conill conjugat a FITC a una dilució 1/100 (panell A) i un anti-ratolí conjugat a Texas Red a una dilució 1/200 (A i B). La barra d'escala representa 20 μ m.

4.3. Discussió

En aquest capítol s'han utilitzat diverses tècniques per tal de caracteritzar la translocació de la HsMGS endògena en cultius de múscul humà. Primer de tot s'ha comprovat l'especificitat i aplicabilitat de l'anticòs MGS3. La tinció intensa en el citoplasma dels miotubs responia a una gran expressió de la HsMGS i era resistent a desaparèixer amb les deplecions de glucosa del medi, de forma contrària al que ocorre en cèl·lules COS-1, degut a que els miotubs presenten una major concentració de glicogen. Així doncs les diferències en acumulació de glicogen entre aquests dos tipus cel·lulars promouen un diferent comportament a l'hora de que l'enzim transloqués cap al nucli. S'utilitzaren diverses drogues per tal d'accelerar i promoure una major degradació del glicogen que conjuntament amb l'optimització de l'immunocitoquímica permeté observar la HsMGS endògena dins el nucli en cultius de múscul humà.

S'ha demostrat la presència de HsMGS nuclear en cultiu de múscul humà i també la seva distribució en el nucleoplasma tant en forma de partícules esfèriques com difosa, de forma equivalent a la descrita anteriorment per a la quimera GFP-HsMGS. El fet que calgués una major

depleció de glicogen per tal de trobar aquesta localització suggeria que el glicogen, pel qual la HsMGS presenta una molt alta afinitat, funcionés com un factor de retenció citoplasmàtic de la proteïna. Per això es realitzaren experiments que relacionessin el contingut de glicogen amb la translocació al nucli. Els resultats d'aquests experiments mostraven que existeix una relació de tipus invers entre la concentració de glicogen i la translocació al nucli seguint una corba de tipus exponencial. Donat que el múscul conté en les mateixes condicions de cultiu, aproximadament unes 4 vegades més de glicogen que les cèl·lules COS-1, resulta lògica la major facilitat de la HsMGS per a translocar en aquestes últimes.

La formació d'estructures esfèriques en el nucli també suggeria que l'enzim era dirigit cap a algun domini nuclear específic. S'han descrit diversos d'aquests dominis i mitjançant dobles immunocitoquímiques s'ha col·localitzat la HsMGS amb p80-coilina en algunes de les cèl·lules estudiades. També apareix un fenomen d'emascament amb PML. Els cossos PML i els de Cajal sovint estan associats en les cèl·lules i per tant es pot afirmar que en algunes situacions la localització subnuclear de la HsMGS és en aquests compartiments. La confirmació d'aquesta observació hauria de realitzar-se per microscòpia electrònica.

A més la inhibició de la transcripció mitjançant l'actinomicina D i la consegüent reordenació de la HsMGS dins el nucli indica que existeix una connexió entre la maquinària de la transcripció i la distribució subnuclear de l'enzim. Tant els cossos de Cajal com els PML han estat implicats en regulació de la transcripció, a part d'altres funcions. Així doncs, la depleció de glicogen provoca una translocació cap al nucli de la HsMGS, però a més, cap a zones concretes. Tot i que no s'han detectat per anàlisi de seqüència dominis d'unió a RNA en la HsMGS seria possible que de forma directa o indirecta, la seva presència en alguns dominis nuclears modifiqués la transcripció, adaptant-la a l'estrès metabòlic que suposa una alta degradació del glicogen cel·lular.

La coincidència temporal de la depleció del glicogen amb la translocació cap al nucli de la MGS fa pensar en una possible senyalització d'aquesta degradació del glicogen través de l'enzim. Quan un múscul s'excita i es contrau repetidament i l'esforç es manté durant un interval de temps llarg, possiblement algunes de les miofibres es deplecionarien de glicogen. Aleshores la MGS translocaria a l'interior del nucli on induiria una resposta a nivell post o co-transcripcional. Una de les respostes possibles seria l'augment de l'expressió de la pròpia MGS i de la MGP. Aquesta hipòtesi està recolzada per diverses observacions. Els ratolins transgènics que sobreexpressen la MGS presenten uns nivells més elevats de glicogen fosforilasa [Azpiazu et al., 2000]; la sobreexpressió de la GFP-HsMGS en miotubs en cultiu provoca un augment de la concentració d'enzim endogen (capítol 3); i la sobreexpressió de glicogen

fosforilasa en el mateix model també indueix un augment en la quantitat global de MGS. Aquest últim fet podria explicar-se per la forta degradació del glicogen que provoca la sobreexpressió de la MGP i que provocaria la translocació de la HsMGS i finalment, segons aquesta hipòtesi l'augment de la síntesi d'ambdues proteïnes.

L'increment en la concentració dels dos enzims afavoriria un augment tant de la capacitat d'acumular glicogen com la de mobilitzar-lo, protegint la cèl·lula implicada d'una nova depleció posterior.

Una altra hipòtesi seria la de la senyalització per interleucina-6 (IL-6). Recentment s'ha descrit que el múscul esquelètic en resposta a un exercici continu allibera IL-6 i que aquesta, de forma endocrina, podria estimular la gluconeogènesi hepàtica. El més interessant d'aquests treballs és la relació inversa que mostra el glicogen present abans de l'exercici i la secreció de IL-6 per part del múscul. És a dir, com menys reserves de glicogen són presents abans de l'estimulació per exercici més IL-6 se secreta.

Calen doncs nous estudis que determinin més específicament la localització intranuclear de la HsMGS, mitjançant estudis de microscòpia electrònica així com la seva possible variació segons diferents estats transcripcionals. D'altres experiments a realitzar podrien tractar de determinar si la presència de la HsMGS en el nucli provoca un augment o un decrement en l'expressió de diferents gens començant pel mateix gen de l'enzim, el de la glicogen fosforilasa o el de l'IL-6.

Capítol 5

5. Estudis sobre el mecanisme de control de la localització subcel·lular de la HsMGS

5.1. Introducció

La HsMGS és un enzim altament regulat. El control de l'activitat de la HsMGS s'exerceix mitjançant la inactivació per fosforilació en múltiples residus de serina i l'activació al·lostèrica de la Glc 6-P, que a més de contrarestar els efectes inactivadors de la fosforilació de la proteïna, afavoreix la conversió des de l'estat fosforilat al no fosforilat [Villar-Palasi i Guinovart, 1997]. Si afegim a més el fet que també presenta canvis en la localització subcel·lular en resposta a l'estat metabòlic de la cèl·lula es podria afirmar que la regulació de la HsMGS és molt complexa.

5.1.1. Senyalització per glucosa 6-fosfat

La Glc 6-P fou descrita els anys 60 com a un activador al·lostèric de la glicogen sintasa. Alguns estudis mostren però que a més d'activar la forma fosforilada de l'enzim també promou la conversió cap a la forma desfosforilada i per tant activa. També s'especula que l'activació que s'observa in vitro no té lloc in vivo degut a la presència d'inhibidors al·lostèrics i a que la concentració de Glc 6-P dins de la cèl·lula és insuficient per a activar a la MGS fosforilada. Per tant el paper de la Glc 6-P seria principalment el de afavorir la desfosforilació de l'enzim, revisat per Villar-Palasi i Guinovart [Villar-Palasi i Guinovart, 1997].

Recentment, s'han realitzat diversos treballs per tal de determinar el mecanisme mitjançant el qual actua la Glc 6-P. Usant tant la glicogen sintasa de llevat com la muscular de conill i gràcies a una estratègia de mutagènesi dirigida s'ha determinat una zona del extrem carboxil de la proteïna que participa en la transducció del senyal de la Glc 6-P. Aquesta regió ha estat descrita en el capítol 1 i està definida bàsicament per l'agrupament de 6 residus d'arginina. Quan aquests són mutats a alanina produeixen l'eliminació de l'activació al·lostèrica. Aquesta insensibilitat es relaciona amb un paper d'aquesta regió en la conformació de la proteïna i que es veuria modificada en resposta a Glc 6-P [Hanashiro i Roach, 2002].

El fet que la glicogen sintasa retorni al citoplasma en resposta a la incubació amb glucosa, i tenint en compte que la concentració de glucosa lliure en les cèl·lules musculars és pràcticament nul·la, suggeriria que la Glc 6-P podria ésser el metabòlit implicat en el control de la localització subcel·lular de la HsMGS.

5.1.2. Residus fosforilats en la HsMGS

La glicogen sintasa muscular millor caracteritzada és la de conill. Com ja ha estat esmentat abans, s'han descrit fins a 15 llocs de fosforilació in vitro, dels quals només 9 han estat corroborats in vivo: els llocs 2, 2a situats a l'extrem amino i els llocs 3a, 3b, 3c, 4, 5, 1a i 1b que es troben a l'extrem carboxil. Els més importants per a la inactivació de l'enzim són els llocs 2, 2a, 3a, 3b i 3c. Tots aquests llocs de fosforilació corresponen a residus de serina i estan conservats en l'isoforma humana.

Existeixen però indicis que d'altres residus podrien estar fosforilats in vivo. Es detectà fosfotreonina en el fragment CB-2 de la MGS, que provenia tant de múscul esquelètic com de teixit adipós de rata [Hiken i Lawrence, 1984]. En canvi no es aparegué senyal de fosfotirosina. El fragment CB-2 produït per tractament amb bromur de cianogen correspon a l'extrem carboxil on es troben la majoria dels residus fosforilats de l'enzim. Tot i això no ha estat descrit a quina treonina correspondria aquesta fosforilació.

5.1.3. Transport nucleocitoplasmàtic: senyals de localització i export nuclear

Totes les molècules que són transportades entre el nucli i el citoplasma ho fan a través dels porus nuclears., unes estructures complexes que travessen l'embolcall nuclear. La seves característiques impedeixen la difusió passiva cap al nucli de molècules de més de 40 o 50 kDa segons els autors [Pante i Aebi, 1996]. Les proteïnes que superen aquest límit són importades i exportades del nucli mitjançant un transport actiu dependent de senyal. Existeixen tant senyals de localització nuclear (NLS), responsables de dirigir les proteïnes cap al nucli com senyals d'export nuclear (NES), que promouen el retorn d'aquestes cap al citoplasma. No totes les proteïnes que són transportades a través dels porus nuclears contenen aquests senyal, però aleshores és necessari que interaccionin amb d'altres que sí les posseeixin. De forma similar, existeixen proteïnes suficientment petites que poden entrar i sortir del nucli per difusió i que duen NES o NLS, per tal bé d'excloure-les del nucli o fer més eficient el seu transport dins del nucli.

Els NLS estan més caracteritzats que els NES, i en general es caracteritzen per la presència d'aminoàcid bàsics concentrats en un o dos grups. Segons aquesta distribució s'anomenen mono o bipartits. [Dingwall i Laskey, 1991]. Els NES en canvi no presenten un consens clar, encara que normalment són seqüències curtes i hidrofòbiques, amb un contingut alt en leucines [Mattaj i Englmeier, 1999]. Recentment també s'han descrit els senyals de transport nucleocitoplasmàtics (nuclear shuttling signals NSS) que són capaços de dirigir el transport de la proteïna en ambdues direccions, cap a

l'interior del nucli i cap al citoplasma. Fins ara, només proteïnes que interaccionen amb RNA contenen aquest tipus de senyals [Michael, 2000].

La maquinària encarregada de realitzar aquest transport actiu està conservada en tots els organismes eucariotes. El model establert consta de quatre fases, tant per al import com per a l'export de proteïnes a través dels porus nuclears, i en el que són bàsiques les proteïnes de transport i el sistema RanGTP. La proteïna per tal de ésser transportada s'uneix a una proteïna de transport, del tipus importina en el cas de l'import i exportina per a l'export nuclear.

Aleshores, en el cas de l'export nuclear, també s'uneix la proteïna Ran que és una proteïna petita que uneix GTP i aquest complex es capaç d'interaccionar amb el porus nuclear i travessar-lo. Un cop al citoplasma la hidròlisi del GTP activada per l'acció de GAP, una proteïna activadora, provoca la separació del complex. Finalment l'exportina i la RanGDP retornen al nucli per mecanismes separats. És dins en el nucli on la proteïna RCC1 intercanvia el GDP per una molècula de GTP.

Per a l'import només cal la unió de l'importina a la proteïna que serà transportada per a travessar el porus nuclear. Un cop dins la unió de la RanGTP provoca l'alliberament de la càrrega i el complex importina-RanGTP es capaç de retornar al citoplasma. La hidròlisi del GTP pel mateix mecanisme mencionat anteriorment retorna a la forma lliure a l'exportina.

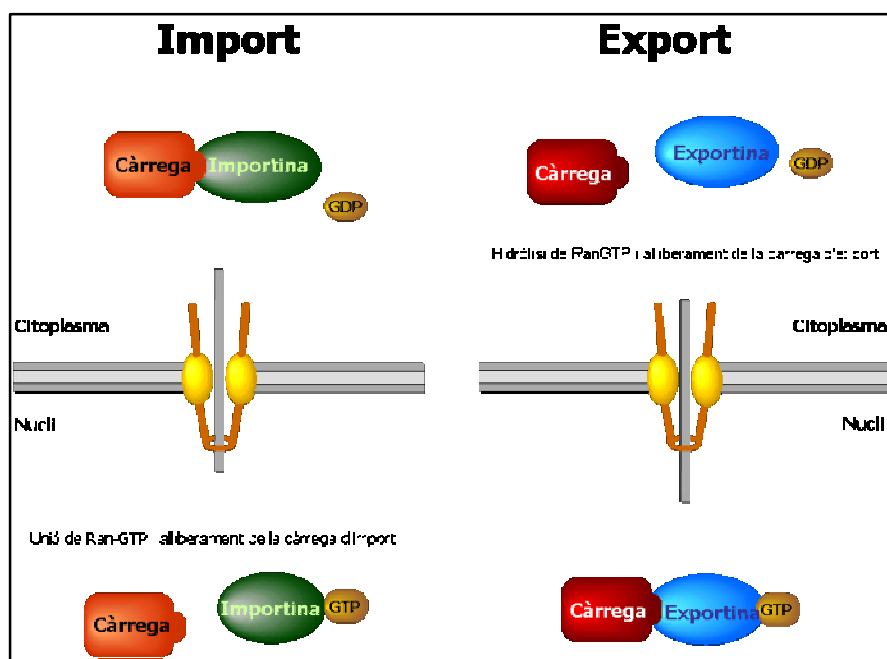


Fig 5.1. Esquema del transport nucleocitoplasmàtic.

És clar doncs que la direccionalitat del transport depèn de la formació de dos reservoris diferenciats de Ran. Un unit a GTP en l'interior del nucli mercès l'acció de la proteïna RCC1 i l'altre a GDP per hidròlisi d'aquest nucleòtid en el citoplasma mitjançant l'acció activadora de la GAP [Görllich i Kutay, 1999].

Recentment han aparegut molts estudis en que es fa palès la importància de la fosforilació en la regulació del transport nucleocitoplasmàtic. Existeixen diferents models de control per fosforilació: unidireccional, binari i d'ancoratge/alliberament. En el primer, una proteïna que circula constantment dins i fora del nucli es fosforila i aleshores s'impedeix el reconeixement per part de la maquinària d'import (restant al citoplasma) o d'export (romanent al nucli). El model binari estableix que una de les formes, fosforilada o desfosforilada és dirigida cap al nucli i que retorna al citoplasma quan canvia el seu estat de fosforilació. Finalment el mecanisme d'ancoratge/alliberament, la proteïna es troba associada amb una estructura estable d'un dels dos compartiments i la modificació d'aquest substrat o de la seu punt d'ancoratge provoca la seva dissociació i el transport a l'altre compartiment [Hood i Silver, 1999]

5.2. Resultats

5.2.1. Anàlisi de la HsMGS mitjançant mutants de deleció

Una de les estratègies inicials per tal de trobar possibles senyals de localització nuclear (NLS) o d'export nuclear (NES) en la HsMGS va consistir en construir plasmidis que codifiquessin per a fragments de la HsMGS fusionats a GFP. Aquesta aproximació permetia una anàlisi ràpida de la capacitat de translocació dels mutants per microscòpia confocal. Així doncs es crearen una sèrie de mutants aprofitant dianes de restricció ja existents dins el cDNA de la HsMGS del plasmidi pEGFP-HsMGS o bé se n'introduïren de noves mitjançant mutagènesi dirigida. En la figura 5.2 es descriuen esquemàticament la sèrie de proteïnes mutades així com la seva localització subcel·lular en COS-1 incubades amb o sense glucosa durant 6h.

De totes les construccions realitzades, el mutant Sal tail fou l'únic exclusivament nuclear, tant en presència com en absència de glucosa. La mida de la proteïna és propera del límit d'exclusió del porus nuclear, uns 48 kDa (27 de la GFP més uns 21 kDa de la seqüència de la HsMGS), per tant si bé es localitzà dins el nucli, no és estrictament necessari que contingui una NLS i podria tractar-se en canvi d'un fenomen de retenció dins del nucli. El mutant complementari, és a dir, el que conté tota la proteïna a excepció de la

seqüència del mutant Sal tail, anomenat -Sal tail, era incapaç de concentrar-se al nucli, tot i que aparegué senyal dins el nucli en alguna cèl·lula.

Quan se substituï aquest extrem per la zona corresponent de la LGS de rata, s'aconseguia recuperar la regulació per glucosa de la localització subcel·lular de la proteïna. L'extrem carboxil de les glicogen sintases de mamífer és la zona de la proteïna menys similar entre elles. Era sorprenent per tant que el bescanvi de la part menys homòloga de la proteïna conduís a un mateix comportament. Això suggereix que tot i que aquesta zona seria molt important per a la concentració de la HsMGS en el nucli, la translocació depèn de subtils diferències situades al llarg del conjunt de la seqüència de l'enzim. La zona compresa entre les dianes SalI i KpnI sembla contenir aquest factor de retenció nuclear, ja que els mutants t1 i t2 fusionats a GFP, que pesen 40 i 38 kDa respectivament, presenten una localització difosa per tota la cèl·lula sense concentració nuclear. Aquesta regió és precisament la que conté els residus d'arginina de regulació per Glc 6-P.

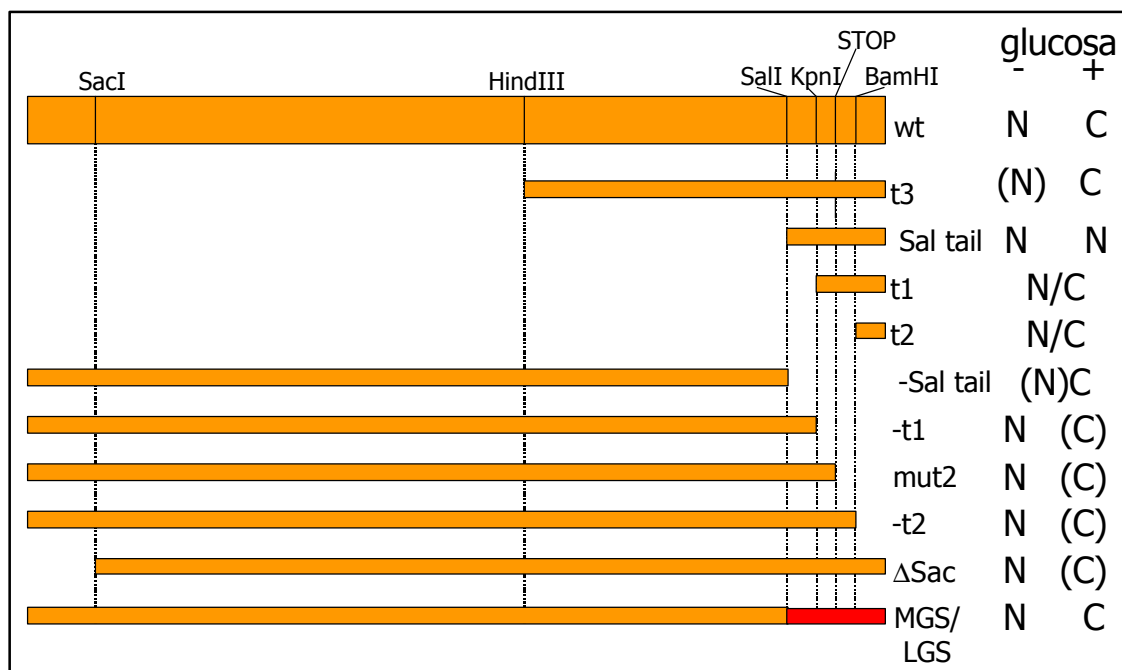


Fig. 5.2. Esquema dels mutants de delecció de la proteïna GFP-HsMGS. Tot i que no es mostra en el diagrama totes les proteïnes estan fusionades a la GFP pel seu extrem amino-terminal. En la part superior es mostren les dianes existents en el cDNA de la HsMGS i que s'emparen per a construir els diferents mutants. La diana SalI s'introdueix per mutagènesi dirigida en una zona completament equivalent pel que fa a seqüència aminoacídica a la LGS de rata per tal de construir la quimera MGS/LGS (en vermell es mostra la part carboxi-terminal de la LGS de rata). El codó d'atur (STOP) també s'introdueix per mutagènesi. A la dreta s'indica el comportament dels mutants en absència (-) o presència de glucosa (+) durant 6 h i en cèl·lules COS-1. N indica concentració nuclear i C citoplasmàtica, en el cas que es trobi entre parèntesi indica una localització parcial. N/C indica difusió per tota la cèl·lula sense concentració en cap dels dos compartiments.

Aquesta complexitat també s'evidencia al comparar el comportament dels mutants t3 i ΔSac. En el primer cas, en absència de glucosa, la proteïna truncada es concentra dins el nucli però d'una forma desorganitzada i en presència de glucosa, el mutant retorna al citoplasma. En canvi la situació és inversa pel mutant ΔSac, al qual li manca l'extrem amino. Es concentra al nucli i hi forma agregats, i amb glucosa la proteïna transloca al citoplasma però de forma parcial. Els mutants -Sal tail, -t1, mut2 i -t2 exhibeixen un comportament similar al ΔSac, tot i que, aquests enzims estan delecionats pel seu extrem carboxil. Sembla necessària doncs un enzim complet per tal d'aconseguir una localització apropiada i regulada de l'enzim.

5.2.2. Paper de la fosforilació en la distribució subcel·lular de la HsMGS

Tal i com s'esmentava en la introducció, la fosforilació de proteïnes intervé en molts casos en la regulació del transport nucleocitoplasmàtic. A més la HsMGS és una proteïna que es fosforila en diversos residus per tal de regular-ne l'activitat. Així doncs, era necessari comprovar que aquesta fosforilació no controlés endemés la localització subcel·lular de l'enzim.

En una primera aproximació, es realitzaren mutants en els quals se substituïren els residus de serina descrits com a llocs de fosforilació per residus d'alanina. En la figura 5.b s'esquematiszen els diferents mutants creats.

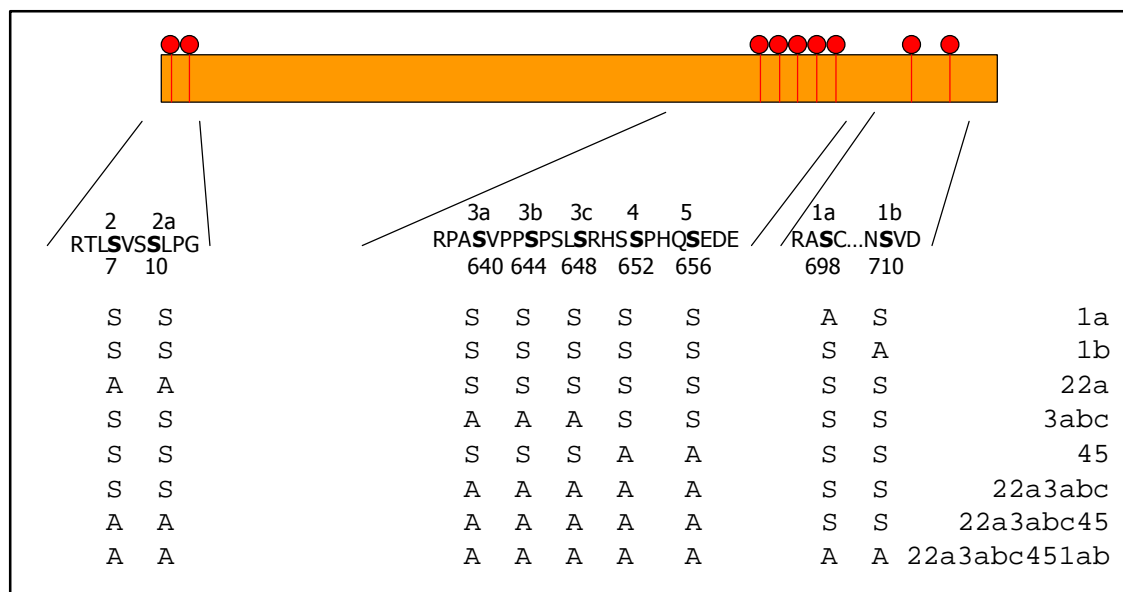


Fig. 5.3. Esquema del mutants dels residus fosforilats que controlen l'activitat de la Hs MGS. En tots els casos les proteïnes mutants estan fusionades pel seu extrem amino a la GFP. Es mostren el nom del lloc de fosforilació, la seqüència que els envolta i la numeració corresponent en la HsMGS. Els diferents canvis aminoacídics es detallen a la part inferior així com les denominacions dels mutants.

Es comprovà que tots eren catalíticament actius i que el seu estat d'activació augmentava degut a la falta de fosforilació. En canvi no s'apreciaren canvis en la localització subcel·lular d'aquestes proteïnes. En presència de glucosa es formaven estructures anulars en el citoplasma, que per a alguns mutants com el 22a3abc451ab excedien en molt la mida habitual per a l'enzim no mutat. Aquest augment correlacionava amb el quocient d'activació de l'enzim reforçant de nou la relació entre la formació d'aquestes estructures i la síntesi de glicogen. En absència de glucosa tots els mutants es concentraven en el nucli formant partícules discretes homòlogament a la proteïna salvatge.

Els resultats indicaven que aquests residus no controlen la translocació però no exclouen que d'altres residus es fosforilessin i estiguessin implicats en la regulació de la distribució subcel·lular de la proteïna. Aquesta hipòtesi estava recolzada per alguns treballs *in vitro* que mostraven més residus fosforilats que els demostrats *in vivo*, així com residus de treonina que es fosforilaven en teixit adipós i múscul esquelètic.

Per tal de determinar si existien d'altres residus fosforilats es transfectaren cèl·lules COS-1 amb els plasmidis pEGFP-HsMGS i pEGFP-HsMGS-22a3abc451ab. Primer de tot es determinà l'expressió per transferència Western de les proteïnes. Com s'observa en la figura 5.4. apareix una única banda per a cada carril que correspon a la proteïna exògena. Existeix però una clara diferència en la mobilitat electroforètica. En el cas de la proteïna GFP-HsMGS-22a3abc451ab, aquesta és major. El resultat es justificaria per l'absència de fosforilació en els llocs mutats a alanina.

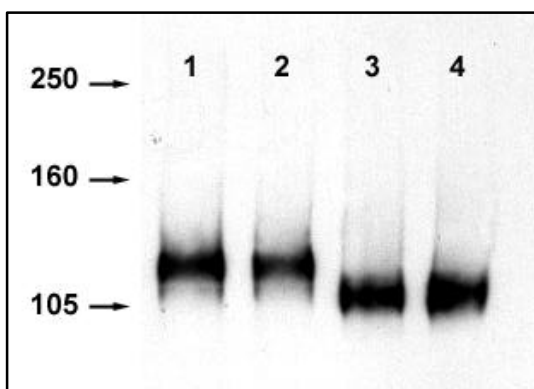


Fig 5.4. Immunoblotting de les proteïnes GFP-HsMGS i GFP-HsMGS-22a3abc451ab.

Els carrils corresponen a cèl·lules que expressaven GFP-HsMGS (1,2) o el mutant 22a3abc451ab (3,4), incubades en absència (1,3) o presència de glucosa 30 mM (2,4). Els extractes es realitzaren amb SDS a l'1% i tractats a 100 °C durant 5 min. S'homogenaren usant una xeringa 13G. Es realitzà una SDS-PAGE i un Western blot usant l'anticòs MGS3 a una dilució 1/1000. A l'esquerra s'indiquen els pesos moleculars en kDa.

Es repetí la transfecció en noves cèl·lules que s'incubaren 16 h sense glucosa i tot seguit amb 30 mM glucosa o sense glucosa durant 1 hora. Els extractes se sotmeteren a immunoprecipitació amb l'anticòs MGS3 unit covalentment a sepharosa i els immunoprecipitats s'analitzaren per transferència Western amb anticossos anti-fosfoserina, anti-fosfotreonina i

anti-fosfotirosina (Fig. 5.5.). Com mostra el Western aparegué una clara senyal en la membrana tractada amb anti-fosfoferina i anti-fosfotreonina mentre que no es detectà cap en el Western amb anti-fosfotirosina (no mostrat). Semblava doncs que tot i haver mutat els llocs de fosforilació coneguts apareixia senyal corresponent a fosfoferina i, encara que més feble, a fosfotreonina en la protèina GFP-HsMGS-22a3abc451ab.

Per comprovar la possible heterogenitat de la protèina mutada també es realitzà una transferència Western sobre una membrana d'una electroforesi en dues dimensions. Es realitzà un isoelectroenfocament en capil·lar seguit d'una SDS-PAGE d'un extracte de cèl·lules COS-1 transfectades amb el plasmidi pEGFP-HsMGS-22a3abc451ab. S'utilitzà l'anticòs MGS3 per a detectar la protèina. Com es mostra en la figura 5.6. apareixen diverses taques del pes molecular de la protèina HsMGS-22a3abc451ab (111 kDa) però amb diferent punt isoelectric. Aquest resultat confirma l'existència de modificacions postraduccionals del enzim mutant (Fig. 5.6.).

Fig. 5.5. Detecció d'aminoàcids fosforilats.

S'immunoprecipitaren extractes de cèl·lules COS-1 que expressaven GFP-HsMGS (1, 3) o el mutant 22a3abc451ab (2, 4), incubades en absència (1, 2) o presència de glucosa 30 mM (3, 4). Els immunoprecipitats se sotmeteren a SDS-PAGE i es realitzaren dos Western blot usant els anticòsos antifosfoferina (α PS) i antifosfortreonina (α PT) a una dilució 1/500 i un secundari anti-conill a 1/5000. Els pesos moleculars es mostren en kDa.

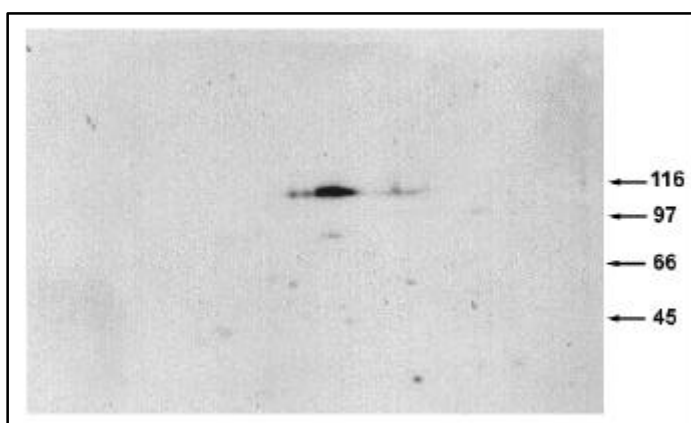
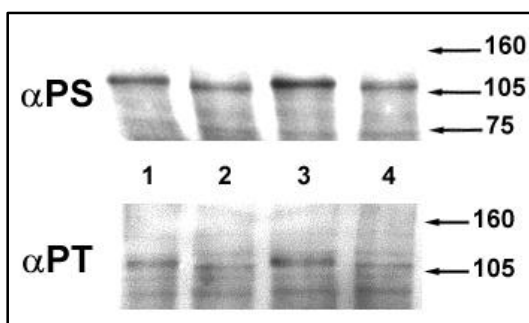


Fig. 5.6. Immunodetecció de la GFP-HsMGS-22a3abc451ab un cop sotmesa a electroforesi bidimensional. Extractes de cèl·lules que expressaven la GFP-HsMGS-22a3abc451ab se sotmeteren a una electroforesi bidimensional (electroenfocament i SDS-PAGE) i després es realitzà un Western blot utilitzant MGS 3 a 1/1000. A la dreta es mostren els pesos moleculars en kDa.

5.2.3. Paper de la glucosa 6-fosfat en la translocació HsMGS

Al haver-se descrit una zona implicada en la activació per Glc 6-P en la HsMGS es decidí investigar si també participava en la regulació de la localització subcel·lular d'aquesta proteïna. Mitjançant mutagènesi dirigida es mutaren els codons que codificaven per a les arginines 578, 579 i 581 en el cas del mutant anomenat R1 i els residus d'arginina 585, 587 i 590 per al mutant R2.

Ambdós mutants mostraren un quocient d'activitat molt elevat quan s'expressaren en cèl·lules COS-1: 0.7 i 1, per a R1 i R2 respectivament. Així doncs els resultats de Hanashiro i Roach. [Hanashiro i Roach, 2002] amb la MGS de conill es repetien per a l'ortòleg humà

Quan s'avaluà la translocació dels mutants s'observaren diferències respecte la proteïna salvatge. En absència de glucosa es produïa la concentració dins el nucli i també formava partícules esfèriques, de forma equivalent a la de la GFP-HsMGS. Ara bé, un cop s'estimulava les cèl·lules amb glucosa, la translocació era molt més ràpida i eficient per als mutants que per a l'enzim salvatge. És a dir, el nombre de cèl·lules que conservaven una localització nuclear al afegir glucosa al medi durant 6 hores era pràcticament nul·la per als mutants, mentre que per a la GFP-HsMGS apareix sempre un percentatge, d'aproximadament un 5%, que no transloca. Es realitzà un time-course i s'estimà que ja a les 2 hores d'incubació amb glucosa 30 mM pràcticament totes les cèl·lules que expressaven els mutants R1 o R2 no presentaven senyal fluorescent en l'interior del nucli quan per a la proteïna no mutada calen unes 4 hores.

Així doncs, semblaria que la senyalització per Glc 6-P participaria en la translocació. Aquesta observació reforça els resultats extrets de l'anàlisi mitjançant els mutants de deleció mostrats anteriorment. Es podria assumir que la mutació de la regió rica en arginines i que confereix a l'enzim una pèrdua de sensibilitat per Glc 6-P, és equivalent a l'efecte que produeix la unió de l'activador a la proteïna. Aleshores la Glc 6-P, probablement mitjançant l'inducció d'un canvi conformacional, afavoriria l'export de la proteïna.

5.2.4. Efecte de la leptomicina B i anàlisi de possibles NLS i NES en la HsMGS.

Es realitzaren experiments usant l'inhibidor de l'export nuclear leptomicina B. Aquest compost inactiva per alquilació la proteïna exportina 1 [Kudo et al., 1999]. Mitjançant l'ús d'aquest compost s'ha demostrat la participació d'aquesta via d'export en la translocació de moltes proteïnes.

Per comprovar l'efecte de la leptomicina B en la translocació de la GFP-HsMGS s'infectaren cèl·lules L6 amb l'adenovirus AdCMV-GFP-HsMGS. amb una moi de 10. 32h després de la infecció les cèl·lules s'incubaren en DMEM sense glucosa durant 16h i finalment, durant 6h amb DMEM que contenia 30 mM glucosa més leptomicina B 100 nm. A diferència de les cèl·lules incubades amb glucosa sense leptomicina B, apareix una acumulació nuclear de l'enzim, tot i que aquesta no està organitzada formant partícules (fig. 5.7.). És a dir, tot i que l'export cap al citoplasma es veu inhibit per l'acció de la droga, si que té lloc la pèrdua de l'agregació dins el nucli. Aquest efecte es podria deure a la presència de la Glc 6-P o una altra molècula i seria previ a l'export nuclear.

La desagregació, que també es produeix per incubació amb actinomicina D, suposaria una altra etapa en el complex control de la localització subcel·lular de la HsMGS.

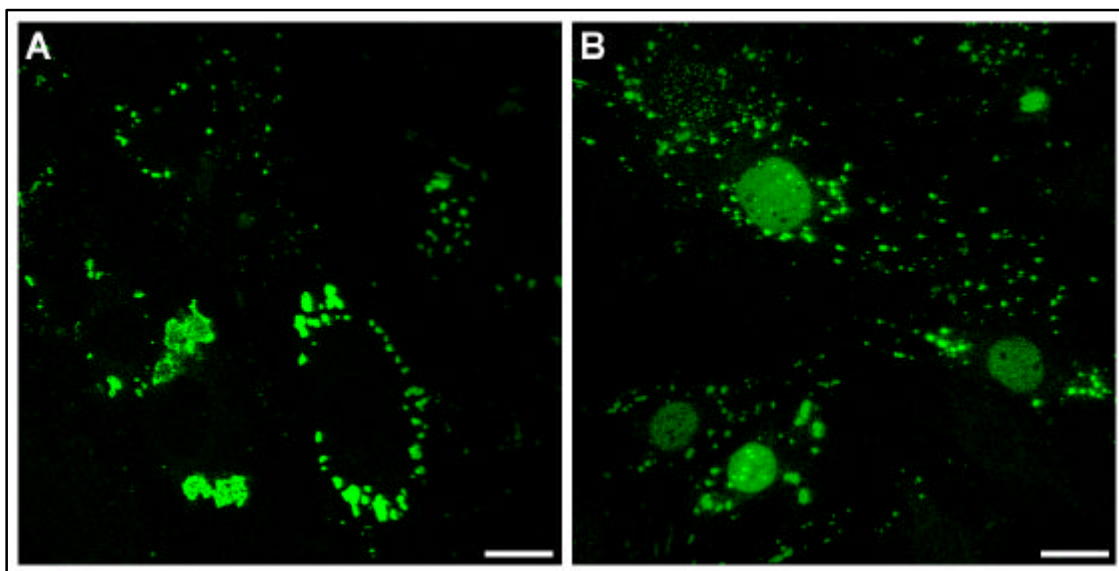


Fig. 5.7. Efecte de la leptomicina B en mioblasts L6 infectats amb l'AdCMV-GFP-HsMGS. La infecció es realitzà amb una moi de 10. 32h després de la infecció les cèl·lules s'incubaren en DMEM sense glucosa durant 16h i finalment, durant 6h amb DMEM amb glucosa 30mM (imatge A) o amb DMEM 30 mM glucosa i leptomicina B 100 μM (imatge B). La fixació es realitzà amb paraformaldehid al 4% durant 20 min a temperatura ambient. La immunocitoquímica i l'obtenció d'imatges es realitzaren tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes.

L'efecte inhibitor de l'export nuclear per part de la leptomicina B indicava la possibilitat que existís un NES en la HsMGS. Tot i que no existeixen uns consens clars per als NES i encara menys per als NLS, es tractà de cercar putatius senyals de localització en la estructura primària HsMGS. S'escolliren quatre fragments candidats i es mutaren els possibles aminoàcids crítics. En la figura 5.8. es detallen les seqüències escollides i els canvis introduïts.

Cap de les mutacions introduïdes produí un canvi en la localització subcel·lular de la proteïna. Probablement cap d'aquestes seqüències participa en el control d'aquesta distribució però no es pot descartar la presència d'algun d'aquests senyals en la HsMGS.

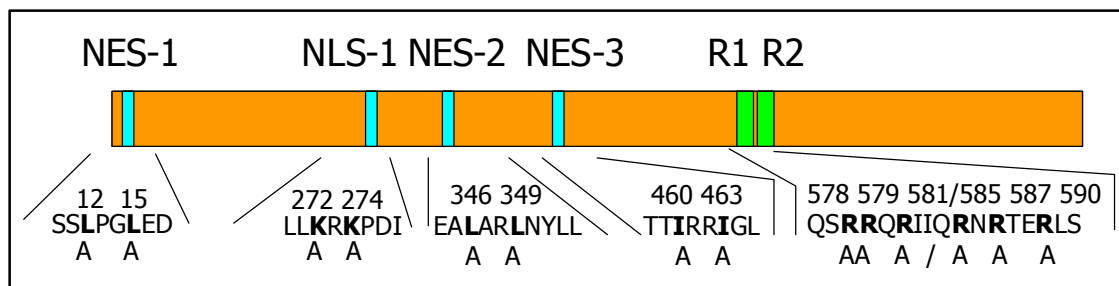


Fig. 5.8. Esquema de les mutacions introduïdes en els mutants NES-1, 2, 3, NLS-1 i R1, R2. Els nombres indiquen l'aminoàcid corresponent a la HsMGS no unida a la GFP.

5.3. Discussió

En aquest capítol s'ha estudiat el control de la localització subcel·lular de la HsMGS des del punt de vista mecanístic. Malgrat no haver delimitat una regió que reproduís fidelment el comportament de l'enzim sencer, l'anàlisi mitjançant deleció proporcionà dues informacions bàsiques. Els possibles determinants de la localització subcel·lular de l'enzim es trobarien al llarg de tota la proteïna i la zona compresa entre les dianes SalI i KpnI, que codifica per a la zona que conté les arginines implicades en la transducció del senyal de la Glc 6-P, seria necessària per a la retenció nuclear de l'enzim. Els resultats obtinguts quan aquests residus són mutats per alanina indiquen que la velocitat en l'export és major. Tot això indica una possible doble acció de la Glc 6-P, per una banda promoure la desagregació dels cúmuls nuclears així com un afavoriment de l'export de l'enzim fora del nucli. No queda establert però que sigui aquesta molècula la responsable d'induir directament la translocació.

Tot i que no ha estat possible trobar NLS o NES funcionals en la seqüència de la HsMGS, aquestes podrien trobar-se en la proteïna ja que els consens són molt laxos i caldria analitzar nous candidats. Ara bé, s'ha mostrat, especialment en el segon cas, que la HsMGS, bé directament o indirecta, s'exporta del nucli mitjançant la via anomenada clàssica i que és mediada per la proteïna exportina 1. El conjunt de resultats no permet definir si la HsMGS per si sola és suficient per a ésser importada i exportada del nucli, o si calen d'altres proteïnes que l'acoblin al sistema de transport. Tot i això, la translocació té lloc en presència tant d'inhibidors de la transcripció com de la traducció (experiments amb actinomicina D i cicloheximida en el capítol 4) i per tant les possibles proteïnes adaptadores ja han de estar presents i no s'indueix ni la seva expressió ni la seva traducció.

També s'ha analitzat el paper de la fosforilació en el control de la localització subcel·lular. Així doncs s'ha comprovat que els llocs descrits de fosforilació que controlen l'activitat de l'enzim no participen en el control del transport nucleocitoplasmàtic. Malgrat els resultats obtinguts amb els mutants de fosforilació, resultats preliminars sobre la fosforilació de la proteïna que té substituïts per alanina tots els llocs de fosforilació descrits indiquen que podria haver més llocs de fosforilació en serina i/o treonina. Si es té en compte que la fosforilació és un factor molt corrent en la regulació de la localització subcel·lular, podríem hipotetitzar que alguns residus, no descrits encara, són fosforilats i desfosforilats i que aquestes modificacions podrien regular l'entrada i la sortida de la HsMGS del nucli de la cèl·lula.

A favor d'aquesta hipòtesi hi ha el fet que s'hagin descrit fosfotreonines *in vivo* [Hiken i Lawrence, 1984] i que algunes línies tumorals, com els ascites Erlich presentin acumulacions de glicogen nuclear. Ha estat demostrat que moltes línies tumorals presenten una desregulació en la fosforilació de proteïnes, tot i que també podria tractar-se de mutacions en la MGS d'aquelles cèl·lules o de canvis en els mecanismes de transport a través de l'embolcall nuclear.

Calen nous experiments que detallin quins són els residus que estan fosforilats en la HsMGS quan es troba dins del nucli, mitjançant gels bidimensionals i espectrometria de masses, així com determinar si l'enzim s'uneix a d'altres proteïnes per tal de ésser transportada. Aquest últim punt podria resoldre's utilitzant aproximacions genètiques com el doble híbrid o coimmunoprecipitació combinada també amb espectrometria de masses. És clar que la localització subcel·lular de la HsMGS en resposta als canvis en les condicions metabòliques presenta encara molts reptes.