



# Caracterización del metabolismo del glucógeno en neuronas y su implicación en la tolerancia a la hipoxia

Isabel Sáez Martínez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Caracterización del metabolismo del glucógeno en neuronas y  
su implicación en la tolerancia a la hipoxia**

**ISABEL SÁEZ MARTÍNEZ**

**Barcelona, Octubre de 2012**





# **Caracterización del metabolismo del glucógeno en neuronas y su implicación en la tolerancia a la hipoxia**

Memoria presentada por

**ISABEL SÁEZ MARTÍNEZ**

Para optar al grado de

**Doctora por la Universidad de Barcelona**

Tesis realizada en el *Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona)*, bajo la dirección del Dr. Joan J. Guinovart Cirera, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular.

Tesis adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Biología

Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado en Biotecnología

Master Oficial 2007-2008

Barcelona, Octubre de 2012

El Director de la tesis

La autora

Joan J. Guinovart Cirera

Isabel Sáez Martínez



*A mis padres*



*Any intelligent fool can make things bigger and more complex... It takes a touch of genius - and a lot of courage to move in the opposite direction.*

Albert Einstein



A tres días de llevar a imprimir la tesis, estaba convencida de que la parte difícil ya estaba hecha. Sin embargo, después de 20 minutos sin escribir nada, veo que me he equivocado, como bien me dijeron muchos que han pasado por esto (y yo, como suelo hacer, pues no hice mucho caso y pensé que no sería para tanto). Creo que no es posible enumerar a todas aquellas personas que, con su consejo, ayuda o incluso con una sonrisa han contribuido a finalizar esta tesis. Por eso, y aunque inevitablemente implique caer en la frase más típica de los agradecimientos, pido perdón de antemano a aquellos que no aparecen en las próximas frases.

En primer lloc vull agrair al director de la tesi, en Joan Guinovart, per donar-me la oportunitat de fer la tesi en aquest laboratori. Amb tu he après que la ciència no és fàcil, però que s'ha de lluitar cada dia per aconseguir allò que vols. L'educació que he rebut aquests anys al teu laboratori i a l'IRB ha estat immillorable.

Quería agradecer especialmente a la persona que ha hecho posible que yo sea doctora. Felipe, no tengo palabras para expresar cuánto me has ayudado. En el lab, por tu incondicional apoyo, por tus innumerables consejos y todas tus sugerencias científicas (las cuales salvaron mi por entonces desastrosa tesis). Fuera, por no dejar que me rindiera, por enseñarme los valores importantes en la vida y por no dejar de intentar hacer de mí una persona mejor. Gracias.

Mar, gracias por ser nuestra madre en el laboratorio. Por preocuparte de cada uno de nosotros y defendernos con uñas y dientes (a veces casi literalmente...). Joaquim, gràcies pels teus suggeriments amb els experiments i la predisposició i ajuda amb totes les correccions (que segurament serien per ahir...).

Cuando entré en el laboratorio no era consciente de la suerte que iba a tener con la gente. En Sucres siempre hay alguien dispuesto a ayudar con los experimentos. Siempre hay alguien con quien discutir resultados que, seguramente, habrás obtenido a última hora de la tarde. Pero eso no quita que te pases las 2 horas siguientes discutiendo qué conclusiones se pueden extraer, qué nuevas preguntas se abren y cuáles son los experimentos que habría que hacer. Esos momentos son únicos y te hacen entender por qué los científicos están tan obsesionados con la ciencia. Por otro lado, pasar 12 horas diarias en el laboratorio no está tan mal cuando lo haces rodeado de amigos. Emma, ¿cuántas horas hemos pasado con “nuestros pequeños héroes”? Recuerdo con especial cariño todas esas horas en cultivos. Muchísimas gracias por toda tu ayuda. ¿Y Atenas? ¿Y Mykonos? ¿Y Egina? ¿E Ibiza? Gracias también por todos esos momentos. Jordi, a SF vaig

descobrir una persona que va acabar sent un dels meus millor amics. Gràcies per portar-me la contrària sempre que pots, per incitar-me a pensar i a millorar. I, sobretot, gràcies per tota la ajuda amb la tesi i el paper i “accordingly” (sé que això no va aquí), resoldre’m tots els problemes diaris de qualssevol índole. Giorgia, gracias por escucharme cuando lo necesito, y por tener siempre una sonrisa para animarnos (incluso después de politronar 100 muestras a las diez de la noche). Valerie, you brought happiness and joy with you and, in turn, to us. You never know when you can meet someone and connect so well. Thank you for your friendship. Thanks to you I’m proud to be a nerd and have no problems in demonstrating it...Anna, muchísimas gracias por ayudarme aunque no tuvieras el tiempo para ello y por preocuparte de que mis experimentos salieran impecables. Carol, gracias por facilitarnos la vida a tantos niveles, y por ayudarnos con todo lo que esté en tu mano (aunque fueran las 19...).Chris, thank you for introducing me into the *Drosophila* world and helping me so much with the experiments. Claire, ya verás qué bien lo pasamos estos meses ☺ Manu, gracias por ayudarme cuando te lo pido, aunque seguro que no te haya avisado antes... Iliana, gracias por aportar tranquilidad y calma a nuestro no siempre racional lab. Mireia, espero que tinguis sort en aquests darrers anys de tesi!

También me acuerdo de los ex-Sucres con los que compartí momentos especiales. Laura, gràcies per escoltar-me, per recolzar-me i indignar-te quan jo estava indignada! Delia, gracias por tu dulzura y tu cariño, siempre me acordaré de mi primer día de tesis (hace muuuchos años), cuando me ofreciste tu ayuda con una sonrisa. Susana, gràcies pels teus consells durant aquests anys. Has estat una referència per mi. A Jordi V, Carles, Carlos y Oscar, que siempre se tomaban el tiempo de contestar a mis innumerables preguntas. Jordi L, vam començar aquesta aventura el mateix dia i gairebé acabarem també junts. Jaques, thank you for showing me that one can be always passionate about science. Loranne, thank you for your kindness and your help with my project.

Tengo la suerte de tener muy buenos amigos con los que he ido creciendo en esta aventura de hacerse mayor. Chu, Antonio, Natalia, Rosana, Paco, Fran, Zhenya, Laura, Nuria, Pancho, Javi... Gracias por estar ahí.

Finalmente quería agradecerle a mi familia su apoyo. A mi hermana, porque nunca ha dejado de ayudarme. Somos quien somos por nuestros padres y en mi caso he tenido un referente único de amor, honestidad y humildad. Gracias por darnos la mejor educación, con los sacrificios que ello suponía, por inspirarnos y motivar nuestro afán por aprender. Sin duda, hemos llegado hasta aquí gracias a vosotros.

## **I. TABLA DE CONTENIDOS**



|             |                                                                             |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>I.</b>   | <b>TABLA DE CONTENIDOS</b>                                                  |    |
| <b>II.</b>  | <b>ABREVIACIONES</b>                                                        | 1  |
| <b>III.</b> | <b>INTRODUCCIÓN</b>                                                         | 5  |
|             | <b>1. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO</b>                                         | 7  |
|             | 1.1 Estructura del glucógeno                                                | 8  |
|             | 1.2 Síntesis y degradación de glucógeno                                     | 9  |
|             | 1.3 La Glucógeno Sintasa (GS)                                               | 13 |
|             | 1.3.1 Regulación por fosforilación                                          | 13 |
|             | 1.3.2 Regulación alostérica                                                 | 15 |
|             | 1.3.3 Regulación ligada a la localización subcelular                        | 16 |
|             | 1.4 La Glucógeno Fosforilasa (GP)                                           | 17 |
|             | <b>2. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO EN EL CEREBRO</b>                           | 18 |
|             | 2.1 Ubicación del glucógeno en el sistema nervioso central                  | 19 |
|             | 2.2 Localización de los enzimas del metabolismo del glucógeno en el cerebro | 20 |
|             | 2.3 Función del glucógeno cerebral                                          | 21 |
|             | 2.4 El glucógeno en situaciones patológicas                                 | 24 |
|             | <b>3. LA FALTA DE OXÍGENO: HIPOXIA</b>                                      | 25 |
|             | 3.1 Adaptaciones celulares a la hipoxia                                     | 27 |
|             | 3.1.1 Factores de transcripción estabilizados en hipoxia                    | 27 |
|             | 3.1.2 Cambios celulares a la hipoxia                                        | 29 |
|             | 3.1.3 Impacto de la hipoxia sobre el metabolismo del glucógeno              | 35 |
|             | 3.2 Importancia de la hipoxia en condiciones patológicas                    | 37 |
| <b>IV.</b>  | <b>OBJETIVOS</b>                                                            | 41 |

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>V. RESULTADOS</b>                                                                            | 45 |
| <b>1. EVIDENCIAS DE UN METABOLISMO ACTIVO DE GLUCÓGENO EN NEURONAS</b>                          | 47 |
| 1.1 Introducción                                                                                | 47 |
| 1.2 Cultivo primario de neuronas como modelo neuronal                                           | 48 |
| 1.3 Estudio de la síntesis de glucógeno                                                         | 49 |
| 1.4 Método fluorescente para la determinación de glucógeno                                      | 49 |
| 1.5 Localización de la GS en neuronas                                                           | 52 |
| 1.6 Discusión                                                                                   | 53 |
| <b>2. EFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO</b>                                | 55 |
| 2.1 Introducción                                                                                | 55 |
| 2.2 Niveles endógenos de glucógeno                                                              | 56 |
| 2.3 Redistribución de la GS en hipoxia                                                          | 57 |
| 2.4 Niveles de glucógeno y GS en neuronas que sobre-expresan una forma activa de la GS (MGS-9A) | 58 |
| 2.5 Localización de la MGS-9A y su redistribución en hipoxia                                    | 59 |
| 2.6 Capacidad de degradación de glucógeno en neuronas de <i>Drosophila melanogaster</i>         | 60 |
| 2.7 Capacidad de degradación de glucógeno en neuronas de ratón                                  | 61 |
| 2.8 Análisis del mecanismo de degradación de glucógeno                                          | 63 |
| 2.9 Caracterización de las isoformas de GP presentes en neuronas                                | 65 |
| 2.10 Actividad GP en hipoxia                                                                    | 67 |
| 2.11 Localización neuronal de GP en cortes de cerebro murino                                    | 67 |
| 2.12 Discusión                                                                                  | 69 |
| <b>3. EFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO</b>                                   | 73 |
| 3.1 Introducción                                                                                | 73 |
| 3.2 Caracterización del estado de activación de GS                                              | 73 |
| 3.3 Análisis de la síntesis de glucógeno                                                        | 74 |

|                                                                                                                                |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>3.4 Caracterización del mecanismo de activación de GS en hipoxia</b>                                                        | <b>77</b>     |
| 3.4.1 Niveles de factores de transcripción estabilizados en hipoxia 1 $\alpha$ y 2 $\alpha$ (HIF 1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ ). | 77            |
| 3.4.2 Activación de GS en condiciones de silenciamiento de HIF 1 $\alpha$                                                      | 77            |
| 3.4.3 Activación de GS en presencia de estreses metabólicos                                                                    | 78            |
| 3.4.4 Activación de GS en presencia de antioxidantes e inhibidores de la degradación de glucógeno                              | 79            |
| <b>3.5 Respuesta del metabolismo de glucógeno a condiciones de Reoxigenación</b>                                               | <b>81</b>     |
| 3.5.1 Niveles de glucógeno en neuronas que sobre-expresan el mutante activo de GS                                              | 82            |
| 3.5.2 Niveles endógenos de glucógeno                                                                                           | 83            |
| 3.5.3 Niveles de Glucosa 6 Fosfato (G-6-P) y UDP glucosa                                                                       | 84            |
| 3.5.4 Actividad GS                                                                                                             | 85            |
| <b>3.6 Discusión</b>                                                                                                           | <b>86</b>     |
| <br><b>4. RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE GLUCÓGENO EN NEURONAS</b>                                                    | <br><b>91</b> |
| <b>4.1 Introducción</b>                                                                                                        | <b>91</b>     |
| <b>4.2 Impacto del metabolismo de glucógeno sobre la viabilidad neuronal</b>                                                   | <b>92</b>     |
| 4.2.1 Efecto de la hipoxia sobre la muerte neuronal                                                                            | 92            |
| 4.2.2 Efecto de la hipoxia sobre la muerte neuronal en neuronas que carecen GS                                                 | 93            |
| 4.2.3 Niveles de G-6-P en hipoxia en neuronas que carecen GS                                                                   | 94            |
| <b>4.3 Impacto de la GS en neuronas de <i>Drosophila melanogaster</i></b>                                                      | <b>95</b>     |
| 4.3.1 Niveles de RNA mensajero (mRNA) de GS en moscas con niveles reducidos de GS                                              | 97            |
| 4.3.2 Tiempo de recuperación tras un episodio de hipoxia de moscas con niveles reducidos de GS en neuronas                     | 98            |
| <b>4.4 Discusión</b>                                                                                                           | <b>102</b>    |

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>VI. DISCUSIÓN</b>                                                          | 105 |
| <b>VII. CONCLUSIONES</b>                                                      | 113 |
| <b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                             | 117 |
| <b>1. CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS</b>                                   | 119 |
| 1.1 Cultivos primarios de neuronas WT                                         | 119 |
| 1.2 Cultivos primarios de neuronas GS KO                                      | 119 |
| 1.3 Exposición a hipoxia                                                      | 120 |
| <b>2. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y FLUJOS METABÓLICOS</b>                   | 121 |
| 2.1 Determinación de la tasa de síntesis de glucógeno                         | 121 |
| 2.2 Determinación de la cantidad de glucógeno por método espectrofotométrico  | 121 |
| 2.3 Determinación de la cantidad de glucógeno por método de fluorescencia     | 122 |
| 2.4 Determinación de los niveles de G-6-P                                     | 123 |
| 2.5 Determinación de los niveles de UDP glucosa                               | 123 |
| <b>3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS</b>                            | 124 |
| 3.1 Determinación de la actividad GS                                          | 124 |
| 3.2 Determinación de la actividad GP                                          | 125 |
| <b>4. DETERMINACIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS</b>                             | 126 |
| 4.1 Concentración proteica                                                    | 126 |
| 4.2 Electroforesis e immunoblot                                               | 126 |
| <b>5. TÉCNICAS DE IMMUNOFLUORESCENCIA</b>                                     | 128 |
| 5.1 Immunofluorescencia sobre cultivos de neuronas                            | 128 |
| 5.2 Immunofluorescencia con amplificación de señal sobre cultivos de neuronas | 129 |
| 5.3 Immunofluorescencia sobre cortes de cerebro de ratón                      | 131 |
| <b>6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>                                      | 132 |
| 6.1 Purificación y retrotranscripción de RNA                                  | 132 |
| 6.2 PCR cuantitativa en tiempo real                                           | 133 |

|                                                            |         |
|------------------------------------------------------------|---------|
| <b>7. GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES</b>                | 134     |
| 7.1 Amplificación de adenovirus                            | 134     |
| 7.2 Infección de células con adenovirus                    | 135     |
| 7.3 Generación de lentivirus                               | 135     |
| 7.4 Infección de células con lentivirus                    | 136     |
| <b>8. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR</b>                     | 136     |
| <b>9. PROCEDIMIENTO CON <i>Drosophila melanogaster</i></b> | 137     |
| 9.1 Obtención de las diferentes líneas                     | 137     |
| 9.2 Exposición a hipoxia                                   | 137     |
| 9.3 Obtención de muestra para análisis de glucógeno y mRNA | 138     |
| <b>10. PROCEDIMIENTO CON ANIMALES</b>                      | 138     |
| 10.1 Condiciones generales de estabulación                 | 138     |
| 10.2 Perfusión con paraformaldehído                        | 139     |
| 10.3 Perfusión con solución de salino                      | 139     |
| <b>11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>                            | 139     |
| <br><b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>                                | <br>141 |
| <b>X. ANEXOS</b>                                           | 163     |



## **II. ABREVIACIONES**



**ABREVIACIONES**

|                 |                                                                 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
| Ad              | Adenovirus                                                      |
| AMP             | Adenosina 5' -monofosfato                                       |
| AMPK            | Proteína quinasa estimulada por AMP                             |
| ATP             | Adenosina 5' -trifosfato                                        |
| BE              | Enzima ramificante de glucógeno                                 |
| BPG             | Glucógeno fosforilasa de cerebro                                |
| BSA             | Albúmina de suero bovino                                        |
| CA              | Cuerpos amiláceos                                               |
| CaM-PK          | Proteína quinasa 2 dependiente de Calmodulina /Ca <sup>2+</sup> |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                              |
| COX             | Citocromo c oxidasa, Complejo IV mitocondrial                   |
| DAB             | 1,4-dideoxi-1,4-imino-d-arabinitol                              |
| DBE             | Enzima desramificante de glucógeno                              |
| DIV             | Días <i>in vitro</i>                                            |
| FIH 1           | Factor inhibidor de HIF 1                                       |
| G-1-P           | Glucosa -1- fosfato                                             |
| G-6-P           | Glucosa -6- fosfato                                             |
| GFAP            | Proteína fibrilar ácida de la glía                              |
| GFP             | Proteína verde fluorescente                                     |
| GN              | Glucogenina                                                     |
| GP              | Glucógeno fosforilasa                                           |
| GS              | Glucógeno sintasa                                               |
| GSD             | Enfermedades de acumulación de glucógeno                        |
| GSK3            | Glucógeno sintasa quinasa 3                                     |
| HIF 1 $\alpha$  | Factor de transcripción estabilizado en hipoxia 1 $\alpha$      |
| HIF 2 $\alpha$  | Factor de transcripción estabilizado en hipoxia 2 $\alpha$      |
| HIF 1 $\beta$   | Factor de transcripción estabilizado en hipoxia 1 $\beta$       |
| HK              | Hexoquinasa                                                     |
| HRE             | Elemento de respuesta a hipoxia                                 |
| Hx              | Hipoxia                                                         |
| KO              | <i>Knock out</i> , nulo o deficiente                            |
| LDH             | Lactato deshidrogenasa                                          |

|                |                                                             |
|----------------|-------------------------------------------------------------|
| LGP            | Glucógeno fosforilasa hepática                              |
| LGS            | Glucógeno sintasa hepática                                  |
| MGP            | Glucógeno fosforilasa muscular                              |
| MGS            | Glucógeno sintasa muscular                                  |
| MGS-9A         | Forma mutante de la MGS con las 9 serinas mutadas a alanina |
| mRNA           | RNA mensajero                                               |
| Nx             | Normoxia                                                    |
| O <sub>2</sub> | Oxígeno                                                     |
| PCR            | Reacción en cadena de la polimerasa                         |
| PHD            | Prolil hidroxilasas                                         |
| PhK            | Fosforilasa quinasa                                         |
| Pi             | Fosfato inorgánico                                          |
| pMGS           | Glucógeno sintasa muscular fosforilada en 640               |
| PKA            | Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico                 |
| PP1            | Proteína fosfatasa-1                                        |
| PTG            | <i>Protein targeting to glycogen</i>                        |
| PV             | Parvalbúmina                                                |
| ROS            | Especies reactivas de oxígeno                               |
| shRNA          | Oligonucleótidos de RNA de interferencia                    |
| SNC            | Sistema nervioso central                                    |
| TUJ1           | β-III tubulina                                              |
| UAS            | <i>Upstream activation sequence</i>                         |
| UTP            | Uridina 5'-trifosfato                                       |
| UDP            | Uridina 5'-difosfato                                        |
| VHL            | Proteína <i>von Hippel Lindau</i>                           |
| WT             | <i>Wilde type</i> , salvaje (sin manipulación genética)     |

### **III. INTRODUCCIÓN**



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. METABOLISMO DE GLUCÓGENO**

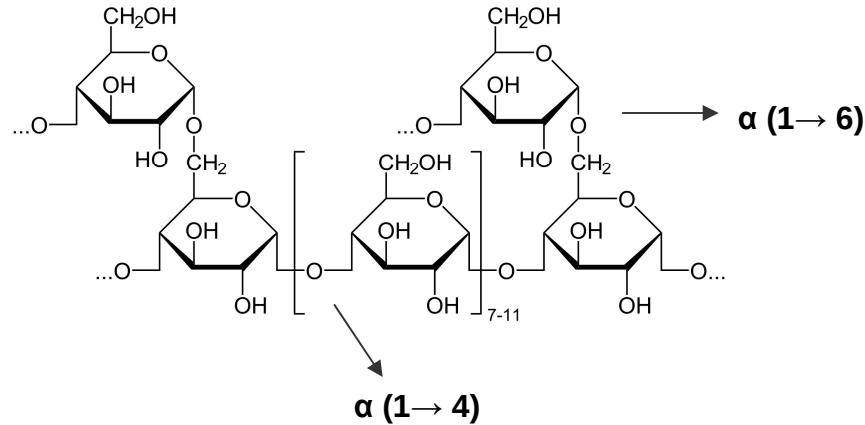
El glucógeno es la principal reserva de carbohidratos del cuerpo humano. Se trata de un polisacárido de D-glucosa altamente ramificado desde el cual pueden liberarse hexosas rápidamente en caso de demanda. El glucógeno como sistema de reserva presenta múltiples ventajas: se acumula intracelularmente sin incrementar la presión osmótica de la célula, puede ser metabolizado rápidamente sin necesidad de consumir ATP y, al contrario de los ácidos grasos, puede ser utilizado como fuente de energía en condiciones anaerobias.

Las mayores reservas de glucógeno se encuentran en el hígado y músculo esquelético. Hay alrededor de 100g de glucógeno en el hígado postprandial y unos 400g en el músculo esquelético en reposo (Champe 1994); es decir, el glucógeno supone el 6-8% del peso del hígado y el 1-2% del peso del músculo esquelético (Shulman, Bloch et al. 1995). El glucógeno juega un papel fisiológico muy diferente en ambos tejidos. El glucógeno hepático permite el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre, mientras que el del músculo esquelético es utilizado para consumo propio durante la contracción muscular.

El cerebro también acumula glucógeno y su contenido ha sido estimado entre 0.5 y 1.5g, lo que supone alrededor del 0.1% de su peso total. Su baja concentración ha causado que su función se haya infravalorado durante las décadas pasadas. El dogma generalizado es que el cerebro depende exclusivamente de la glucosa circulante y que no contiene reserva de energía (Brown 2004). La permeabilidad selectiva de la barrera hemato-encefálica limitaría la posibilidad de que otros metabolitos presentes en la sangre, como, por ejemplo, el lactato, actuaran como fuente de energía del cerebro. Sin embargo, en los últimos años, con las primeras medidas de glucógeno *in vivo* utilizando espectrometría RMN y tras estudios que sugieren que el glucógeno tendría un papel más allá que el de mera reserva energética, la comunidad científica ha mostrado un creciente interés por esclarecer el impacto del glucógeno sobre la función cerebral.

## 1.1 Estructura del glucógeno

El glucógeno es un polímero de unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicos con puntos de ramificación formador por uniones  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (**Fig.1**). La ramificación del polímero aumenta su solubilidad y permite su rápida degradación poniendo a disposición múltiples residuos de glucosa no reductores.



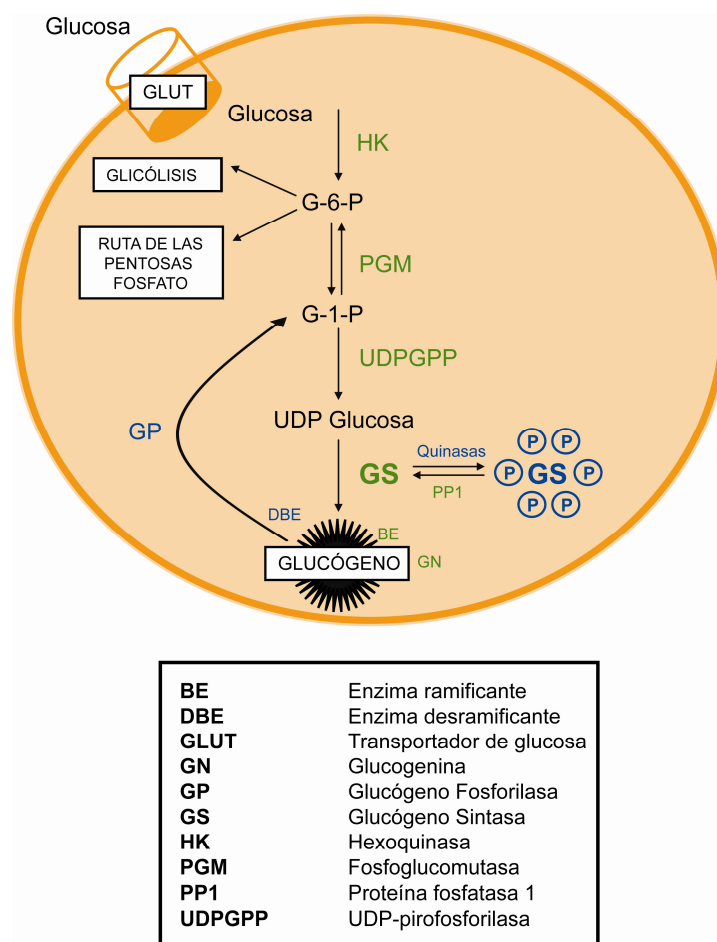
**Fig.1 Estructura detallada del glucógeno.** En la figura se muestran los enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) entre los residuos de glucosa y en los puntos de ramificación del glucógeno los enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6).

El tamaño y la masa exacta del glucógeno no están establecidos. La cadena de glucógeno crece hasta que no puede incorporar más residuos de glucosa a causa del impedimento estérico (Melendez, Melendez-Hevia et al. 1998) y forma así lo que se conoce como partícula  $\beta$ . La partícula  $\beta$  presenta un diámetro de unos 25 nm y un peso molecular alrededor de  $10^7$  Daltons. En el hígado se han observado la presencia de partículas con un diámetro cinco veces mayor que el de la partícula  $\beta$ , denominadas partículas  $\alpha$ , y que están formadas por la agregación en forma de roseta de partículas  $\beta$  (Drochmans 1962).

Además del núcleo de cadenas de poliglucosano, el gránulo de glucógeno contiene muchas otras proteínas, facilitando la interacción entre ellas. Algunas de estas enzimas son la glucógeno sintasa (GS), la glucógeno fosforilasa (GP), el enzima desramificante (DBE), algunas proteína quinasas (Cohen 1978) y las subunidades de las proteínas fosfatasas asociadas al glucógeno (Newgard, Brady et al. 2000).

## 1.2 Síntesis y degradación de glucógeno

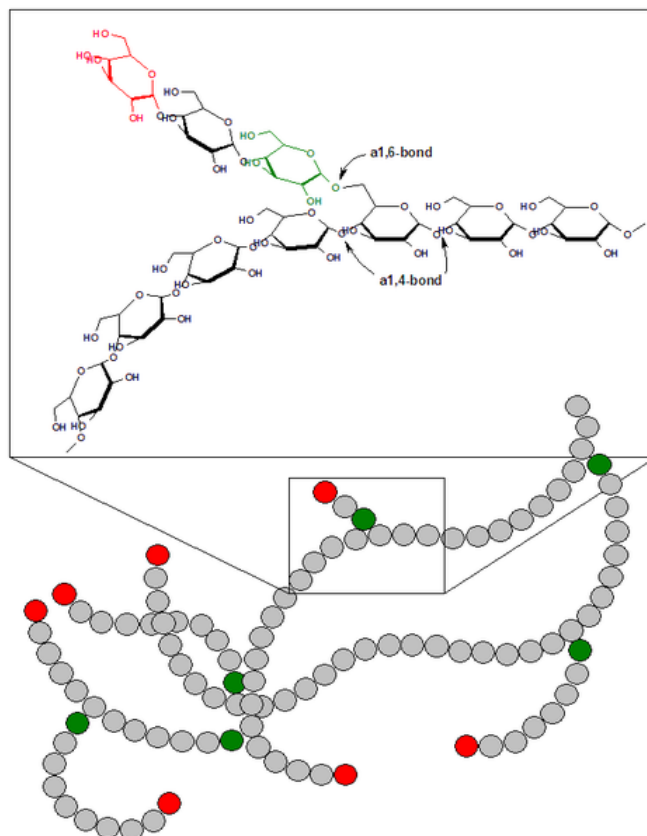
Las rutas generales de glucogenogénesis y glucogenólisis son idénticas en todos los tejidos, pero los enzimas que intervienen y su regulación están adaptados a los requerimientos específicos de cada uno. La glucosa entra a la célula a través de un transportador, que permite el paso de glucosa a través de la membrana celular (**Fig.2**). Estos transportadores varían en función del tejido y difieren en su afinidad por la glucosa así como en su capacidad de transporte (Bell, Brant et al. 1993; Gould and Holman 1993; Arbuckle, Brant et al. 1994). Una vez dentro, la glucosa es rápidamente fosforilada por una hexoquinasa, dando lugar a la glucosa-6-fosfato (G-6-P). La isoforma de la hexoquinasa también es dependiente del tejido (Katzen, Soderman et al. 1965; Cardenas, Cornish-Bowden et al. 1998).



**Fig.2 Esquema del metabolismo del glucógeno.** En la figura se muestran los principales enzimas que intervienen en la síntesis y degradación del glucógeno.

Si la G-6-P es utilizada para la síntesis de glucógeno, ésta es isomerizada a glucosa-1-fosfato (G-1-P) por la acción de la fosfoglucomutasa. La conversión directa de la G-1-P a glucógeno y fosfato es desfavorable termodinámicamente, con lo que se requiere un paso adicional. La G-1-P reacciona con UTP, una reacción catalizada por la UDP glucosa pirofosforilasa, para producir UDP glucosa y liberando dos moléculas de fosfato inorgánico (Pi). La UDP glucosa es el dador de todos los residuos glicosil que se añaden a la molécula de glucógeno. La iniciación de la síntesis de glucógeno tiene lugar gracias a la glucogenina, que transfiere la glucosa desde la UDP glucosa a un residuo de tirosina específico de su cadena lateral. Así, cataliza su propia glicosilación hasta formar un oligómero de 8 a 10 residuos de glucosa que servirá como cebador para la posterior elongación del polímero de glucosa. La elongación de la cadena tiene lugar mediante la formación de enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  4) entre el carbono 1 del grupo glicosil de la UDP glucosa que entra y el carbono 4 del residuo glicosil aceptor de la cadena de glucógeno creciente. La glucógeno sintasa (GS), que interacciona con la glucogenina, cataliza esta reacción, en donde es necesario que la cadena aceptora tenga, como mínimo, una longitud de cuatro unidades de glucosa. Como resultado de la reacción de síntesis de glucógeno se libera UDP, que es transformada de nuevo a UTP por la nucleósido bifosfato quinasa y podrá ser utilizada posteriormente para la síntesis de UDP glucosa.

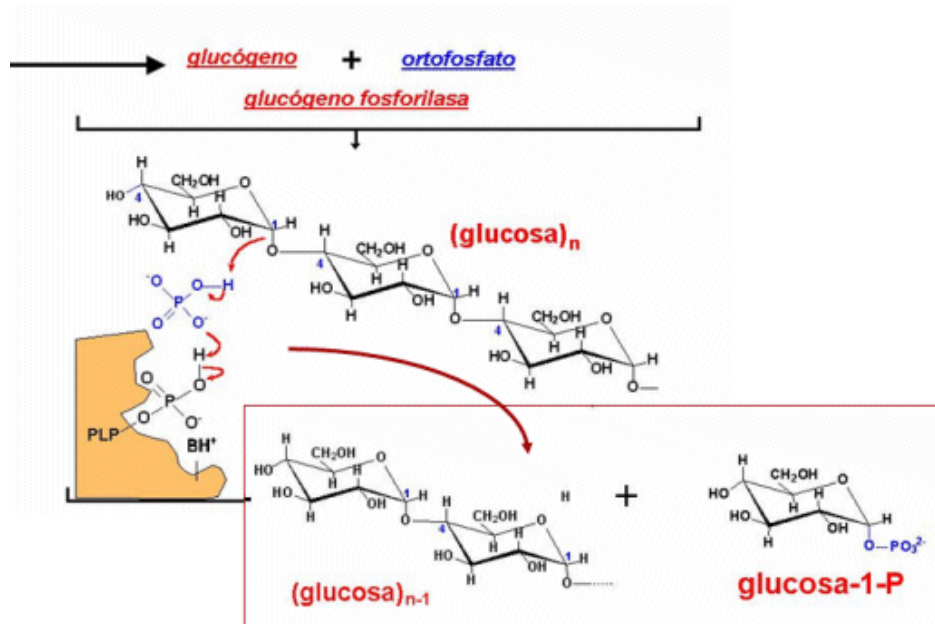
Si todas las glucosas fueran añadidas a la molécula creciente de glucógeno a través de enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  4), se formaría un polímero lineal, como ocurre en las plantas con la amilosa. Sin embargo, aproximadamente cada 8 residuos de glucosa nace una ramificación debida a un enlace glicosídico  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  6) formado entre el carbono 1 de la molécula de glucosa que entra y el carbono 6 del residuo glicosil aceptor (**Fig.3**). Las ramificaciones son introducidas por la acción del enzima ramificante amilo-( $\alpha$ -1,4-  $\alpha$ -1,6)-transglicosilasa, o enzima ramificante (BE), el cual transfiere entre 4 y 7 unidades glicosídicas desde el extremo no reductor de la cadena hacia un grupo hidroxilo situado en el carbono 6 de un residuo de glucosa del interior del polímero.



**Fig.3 Ramificación del glucógeno.** En la figura se muestran las ramificaciones del glucógeno, que se forman a partir de la transferencia de un fragmento de 4-7 unidades de glucosa desde un extremo no reductor de glucosa a un grupo hidroxilo situado en la posición 6 de un residuo de glucosa del interior del polímero.

Los enzimas implicados en la degradación del glucógeno difieren a los de su síntesis, hecho que proporciona un mayor control sobre los niveles totales del polisacárido. El producto de degradación del glucógeno es, principalmente, G-1-P, que es transformada posteriormente a G-6-P por la acción de la fosfoglucomutasa, y también glucosa (**Fig.4**). La proporción de G-1-P y glucosa depende del número de residuos glicosil que hay entre puntos de ramificación. El destino metabólico de la G-6-P es específico de tejido y depende de la presencia de la glucosa-6-fosfatasa. La glucógeno fosforilasa (GP) libera un residuo de G-1-P del extremo no reductor unido a través del enlace glicosídico  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). La actividad de la GP continúa hasta que quedan cuatro residuos glicosil para llegar al punto de ramificación. En este momento la reacción se para, dejando como resultado dextrina que no pueden ser degradada por la GP. Las ramificaciones

pueden ser eliminadas gracias al enzima desramificante (DBE). En primer lugar, la actividad 4- $\alpha$ -glucotransferasa del DBE elimina los tres residuos glicosil más externos del punto de ramificación, dejando un único residuo en el punto de ramificación, y los añade a un extremo no reductor de la molécula, donde ya pueden ser degradados por la GP. El residuo glicosil restante (unido al glucógeno por un enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  6)) es cortado gracias a la actividad amilo-1,6- $\alpha$ -glucosidasa liberando glucosa. Así, la cadena puede seguir siendo degradada por la GP liberando G-1-P hasta volver a encontrarse a 4 residuos glicosil de distancia del siguiente punto de ramificación.



**Fig. 4 Degradación de glucógeno por la glucógeno fosforilasa.** Los productos de la degradación de glucógeno son, principalmente, glucosa-1-fosfato y la cadena remanente de glucógeno.

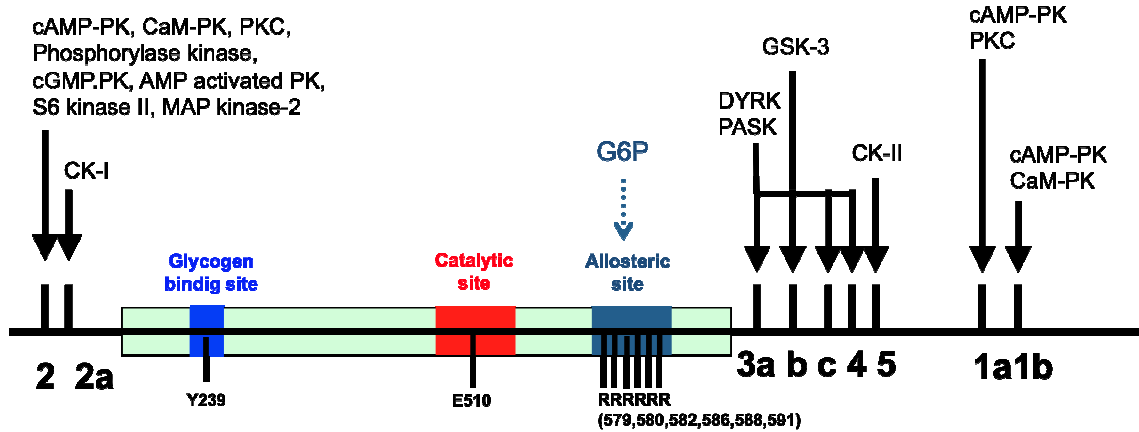
### 1.3 La Glucógeno Sintasa (GS)

La GS es el único enzima capaz de sintetizar polímeros de glucosa en mamíferos. Existen dos isoformas de este enzima correspondientes a dos genes independientes y que reciben el nombre de los principales tejidos glucogenogénicos donde se expresan. La isoforma muscular (MGS), codificada a partir del gen *GYS1*, se expresa en la mayoría de tejidos, incluido el cerebro, pero no en el hígado, el único tejido donde se expresa la isoforma hepática (LGS), codificada por el gen *GYS2* (Bai, Zhang et al. 1990).

Este apartado está centrado en la MGS, ya que es la isoforma que se expresa en el sistema nervioso central (SNC). La MGS cataliza el paso limitante en la síntesis de glucógeno y está altamente regulado a través de diversos mecanismos que incluyen, al menos, modificaciones covalentes, alostéricas y de localización subcelular.

#### 1.3.1 Regulación por fosforilación

Un mecanismo clave en la regulación de la actividad GS es la inactivación por fosforilación, es decir, la unión covalente de grupos fosfato. La fosforilación ocurre en nueve residuos de serina localizados en los extremos N y C-terminal de la MGS. En el extremo N-terminal se encuentran los sitios de fosforilación 2 y 2a, correspondientes a los aminoácidos 8 y 11 (**Fig.5**). En el extremo C-terminal encontramos los sitios 3a, 3b, 3c, 4, 5, 1a y 1b, que corresponden a los residuos 641, 645, 649, 653, 657, 698 y 710, respectivamente. La fosforilación de los diferentes sitios causa la inactivación del enzima, disminuyendo la afinidad por su sustrato, la UDP glucosa y su activador alostérico G-6-P (Roach, Takeda et al. 1976; Salavert, Roach et al. 1979; Skurat, Wang et al. 1994). Además, la fosforilación cursa con un aumento en la afinidad por ATP y Pi, que tienden a antagonizar los efectos de la G-6-P (Mathwes 1990).



**Fig. 5 Regulación de la MGS.** La MGS está regulada por nueve sitios de fosforilación, un sitio de unión a su activador alostérico G-6-P y un sitio de unión a glucógeno, que se encuentra alejado del centro activo.

Las quinasa que participan en la inactivación de la GS son numerosas (Roach 1990). Entre ellas se encuentran la proteína quinasa C y la proteína dependiente de calmodulina/ $\text{Ca}^{2+}$  (CaM-PK), que fosforilan los sitios 1a y 1b, respectivamente. La quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) fosforila los sitios 1a y 1b y el sitio 2 (Cohen and Hardie 1991), que también es fosforilado por la quinasa dependiente de AMP (AMPK) (Carling and Hardie 1989) y la fosforilasa quinasa (Roach, DePaoli-Roach et al. 1978). El sitio 2a es fosforilado por la caseína quinasa 1 (Flotow and Roach 1989), pero solo cuando el sitio 2 está fosforilado (Skurat, Wang et al. 1994). Los centros del extremo C-terminal 3a, 3b, 3c y 4 están regulados principalmente por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). La fosforilación de estos centros se ve potenciada por la fosforilación previa del sitio 5 por la caseína quinasa II (Iyer, Kotch et al. 1998). El sitio 3a también es fosforilado por la quinasa PASK (Wilson, Skurat et al. 2005).

La fosforilación en las diferentes serinas no tiene el mismo impacto sobre la actividad del enzima. Los sitios de fosforilación que han resultado ser más importantes en la regulación de la MGS son el 2, 2a (Ser 8 y 11), 3a y 3b (Ser 641 y 645) (Skurat, Wang et al. 1994). Por este motivo su grado de fosforilación se utiliza de forma generalizada para evaluar su estado de activación. Los otros sitios de fosforilación tienen un efecto menor sobre su activación.

La defosforilación de la MGS, que causa su activación, está catalizada principalmente por la proteína fosfatasa 1 (PP1), que, a su vez, está involucrada en la inactivación por defosforilación de la GP. La PP1 es un holoenzima implicado en la regulación de múltiples procesos celulares. Consta de una subunidad catalítica (PP1c), promiscua, y que se expresa de forma ubicua (Bollen 2001); y de múltiples subunidades reguladoras que, mediante su expresión diferencial y su localización celular, dirigen la actividad de la subunidad catalítica hacia sustratos específicos, como el glucógeno. Se han descrito seis subunidades reguladoras que dirigen la PP1 hacia el glucógeno y favorecen, por tanto, su acumulación: PPP1R3A (ó  $G_M$ , PP1G,  $R_{GL}$ ), PPP1R3B (ó  $G_L$ ), PPP1R3C (ó PTG, PPP1R5), PPP1R3D (ó PPP1R6), PPP1R3E (R3E) i PPP1R3F (R3F). La expresión de cada una de estas subunidades es específica de diferentes tejidos y varía, a su vez, entre los diferentes mamíferos (Montori-Grau, Guitart et al. 2011). A grandes rasgos,  $G_M$  se expresa principalmente en el músculo esquelético (Tang, Bondor et al. 1991),  $G_L$  en hígado (Doherty, Moorhead et al. 1995) y R3E en músculo esquelético, músculo cardíaco e hígado (Munro, Ceulemans et al. 2005). La PTG, que se ha detectado en el cerebro (Printen, Brady et al. 1997) y la R6 (Armstrong, Browne et al. 1997) son ubicuas. La R3F se ha identificado recientemente en astrocitomas de ratón y contiene, como la subunidad  $G_M$ , un sitio de unión a membrana (Kelsall, Voss et al. 2011). Las seis subunidades interaccionan con el glucógeno y la subunidad catalítica, facilitando la actividad fosfatasa de la misma sobre sus sustratos GS, GP y la fosforilasa quinasa que están unidas al polisacárido. Paralelamente, la PTG puede formar complejos entre la PP1 y las proteínas reguladoras del metabolismo del glucógeno porque puede unirse directamente a ellas. Por tanto, la PTG actúa como andamio molecular, facilitando la interacción de PP1 con sus sustratos sobre la partícula de glucógeno e incrementando así la acumulación del polisacárido (Berman, O'Doherty et al. 1998; Fong, Jensen et al. 2000; Lerin, Montell et al. 2000).

### **1.3.2 Regulación alostérica**

Como se ha comentado anteriormente, la modulación de la actividad por fosforilación está ligada a cambios de afinidad de la MGS no solamente por su sustrato UDP glucosa, sino también por diversos moduladores alostéricos. Entre estos moduladores se encuentran inhibidores, como los nucleótidos (ATP, ADP, AMP, y UDP) y el principal activador, la G-6-P, que se une a una zona rica en argininas correspondiente a los residuos 579, 580, 582, 586, 588, 581 de la MGS humana (Pederson, Cheng et al. 2000). Esta unión causa un cambio conformacional del enzima (Baskaran,

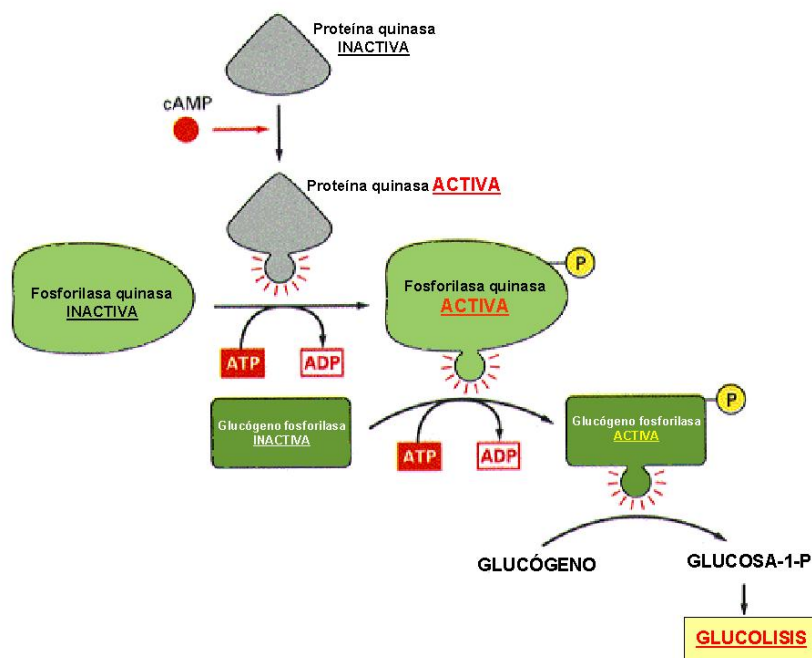
Roach et al. 2010) que hace más accesible el centro catalítico (localizado alrededor del residuo E510) y favorece así la catálisis (**Fig.4**). De hecho, recientemente se ha demostrado que el mecanismo principal a través del cual la insulina promueve la acumulación de glucógeno muscular *in vivo* es la activación alostérica y no la defosforilación de la MGS (Bouskila, Hunter et al. 2010). Cuando la concentración de G-6-P es suficientemente alta, su unión es capaz de revertir la inactivación de la MGS inducida por la fosforilación y conferirle su máxima actividad (Villar-Palasi and Guinovart 1997). Este efecto se utiliza de forma habitual *in vitro* para determinar la cantidad de MGS y su estado de activación en muestras biológicas.

### **1.3.3 Regulación ligada a la localización subcelular**

La MGS, como la PTG o la GP, tiene una alta afinidad por el glucógeno y resulta difícil encontrar una situación fisiológica donde ésta no se encuentre unida al polisacárido. Recientemente se ha identificado un sitio de unión al glucógeno (localizado alrededor del residuo Y239) diferente al centro catalítico y que juega un papel clave en esta alta afinidad (Diaz, Martinez-Pons et al. 2011) (**Fig.4**). Así, cambios en la distribución celular de la MGS promovidos por su interacción con el glucógeno y otras proteínas podrían ser importantes para su regulación. Un ejemplo de estas interacciones podría ser la asociación entre la MGS y la glucogenina. En el músculo esquelético, la MGS transloca hacia una fracción enriquecida en actina en respuesta a la depleción de glucógeno inducida por contracción muscular (Nielsen, Derave et al. 2001). Para volver a sintetizar glucógeno de manera eficiente, la MGS necesita interaccionar con la glucogenina. Se ha descrito que ambas proteínas pueden estar asociadas al citoesqueleto de actina (Baque, Guinovart et al. 1997; Nielsen, Derave et al. 2001). Asimismo, se ha propuesto que la translocación puede ser dependiente de la fosforilación en los sitios 1b, 2 y 2a durante el inicio de la resíntesis de glucógeno en músculo (Prats, Cadeau et al. 2005). En diversos tipos de líneas celulares, la MGS transloca del citoplasma al núcleo cuando se agotan las reservas de glucógeno en células cultivadas en ausencia de glucosa y del núcleo al citoplasma cuando se vuelven a incubar en presencia de glucosa (Ferrer, Baque et al. 1997).

## 1.4 La Glucógeno Fosforilasa (GP)

En mamíferos se conocen tres isoformas de la GP que están codificadas por genes independientes. Reciben el nombre del tejido donde se expresan preferentemente: la muscular (MGP), la hepática (LGP) y la de cerebro (BGP), aunque la isoforma muscular también se expresa en cerebro (Browner, Fauman et al. 1992). La GP también está regulada por fosforilación (Krebs and Fischer 1956) (**Fig.6**) y alostéricamente (Madsen 1986). Al contrario que la GS, la fosforilación de la GP tiene lugar sobre un único residuo, la serina 14, y comporta la activación del enzima. Así, la GP se presenta en dos formas interconvertibles entre ellas; la defosforilada e inactiva (GP-b) y la fosforilada y activa (GP-a) (Browner, Fauman et al. 1992). La fosforilación está catalizada por la fosforilasa quinasa (PhK). La PhK se activa cuando es fosforilada por la PKA en respuesta a incrementos en AMP cíclico. Además, contiene una subunidad calmodulina a través de la cual es activada, mediante un cambio conformacional, en respuesta a niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. La defosforilación de la GP y la PhK tiene lugar por la acción de la PP1 y comporta la conversión de la forma activa GP-a a la inactiva GP-b.



**Fig.6 Regulación de la GP por fosforilación.** En respuesta a incrementos en los niveles de AMP cíclico, la PKA se activa, con lo que fosforila y activa la PhK. A su vez, la PhK fosforila y activa la GP, iniciando la degradación de glucógeno.

La regulación alostérica de la GP depende de la isoforma y estado de fosforilación (Parodi, Mordoh et al. 1970). En el caso del sistema nervioso central, la GP de músculo y cerebro se activan alostéricamente por AMP y se inhiben por ATP. En situaciones de alta demanda energética, cuando la relación AMP/ATP aumenta, la GP-b se activa e inicia la degradación de glucógeno. La unión de AMP es cooperativa y aumenta después de la fosforilación de GP (Roach 2002). Además, la GP también es regulada por los niveles de G-6-P, que actúa como inhibidor alostérico estabilizando la forma inactiva. La propia unión entre la GP y su sustrato constituye un nivel adicional de regulación. La BGP, por ejemplo, presenta una menor afinidad por el glucógeno que la MGP. La afinidad puede incrementar en respuesta a AMP, de manera que la regulación del enzima por AMP/ATP adquiere mayor importancia en la isoforma de cerebro (Crerar, Karlsson et al. 1995). Así, la BGP es más sensible al estado energético de la propia célula y respondería para la obtención de energía para su uso propio. La isoforma de hígado presenta propiedades similares a las de cerebro y de músculo, pero una importante diferencia es su menor activación por AMP y mayor regulación por fosforilación, así como la falta de cooperatividad por AMP (Newgard, Hwang et al. 1989).

## **2. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO EN EL CEREBRO**

El glucógeno está presente en el cerebro de mamífero, aunque a unas concentraciones mucho menores que en hígado o músculo esquelético (en una proporción 100:10:1 para hígado/músculo esquelético/cerebro) (Nelson, Schulz et al. 1968). Su bajo contenido sugiere que su papel principal no es el mantenimiento de los niveles de glucemia en sangre, como ocurre con el glucógeno hepático durante el ayuno. En acorde, los niveles de glucógeno cerebrales varían muy poco durante el ayuno, a diferencia de lo que ocurre en el hígado (Nilsson and Hultman 1973). Es probable, por tanto, que el glucógeno cerebral sea utilizado para uso local (Brown 2004), similar a lo que ocurre con el glucógeno muscular.

No obstante, a diferencia del hígado o músculo, parece haber una gran heterogeneidad celular en la distribución del glucógeno en el cerebro. Esta heterogeneidad implicaría que la función del glucógeno es compleja y sutil, y está en acorde con la gran variedad de células e interacciones que tienen lugar en este tejido.

## **2.1 Ubicación del glucógeno en el sistema nervioso central**

El glucógeno cerebral varía con la edad, región y condición del tejido (Shimizu and Kumamoto 1952). En el embrión, se ha detectado glucógeno en astrocitos y neuronas (Bloom 1968) y se ha propuesto que el glucógeno sirve para suplir la alta demanda energética durante el desarrollo.

No obstante, la localización celular del glucógeno en el cerebro adulto ha sido motivo de controversia durante las pasadas décadas. Estudios antiguos describen la presencia de glucógeno algunas neuronas y astrocitos (Takeuchi 1958; Cammermeyer and Fenton 1981; Borke and Nau 1984). Sin embargo el grupo de *Cataldo y Broadwell* estudió de manera exhaustiva la localización intracelular del glucógeno en el SNC mediante microscopía electrónica (Cataldo and Broadwell 1986). Se concluyó que, excepto en unas neuronas determinadas, el polisacárido se encontraba exclusivamente en astrocitos. Tras este estudio la comunidad científica aceptó que únicamente los astrocitos acumulan glucógeno y lo que parece claro es que la concentración de glucógeno, de estar presente en neuronas, sería mucho menor que en astrocitos.

El glucógeno también se acumula en las células endoteliales, que forman el revestimiento de los ventrículos del encéfalo, y las células del plexo coroideo, la porción del encéfalo encargada de formar el líquido cefalorraquídeo (Brown 2004).

La distribución regional del glucógeno en el cerebro también es heterogénea. Estudios de microscopía electrónica muestran que la concentración de glucógeno es más elevada en aquellas zonas con mayor densidad sináptica (Koizumi and Shiraishi 1970; Phelps 1972), lo que sugiere una función del mismo en la actividad neuronal y la transmisión de señales, ambos procesos dependientes de energía.

## **2.2 Localización de los enzimas del metabolismo del glucógeno en el cerebro**

Los astrocitos expresan la maquinaria de metabolización del glucógeno, correlacionando con la presencia del mismo (Pellegrini, Rossier et al. 1996; Pfeiffer-Guglielmi, Fleckenstein et al. 2003). Estas células expresan tanto la isoforma muscular como la cerebral de la GP, pero no la de hígado (Pfeiffer-Guglielmi, Fleckenstein et al. 2003). Las diferentes propiedades cinéticas de ambas isoformas de la GP implican que este enzima se encuentra bajo control alostérico y por fosforilación. Esto sugiere que el glucógeno en astrocitos sería metabolizado en respuesta a señales extracelulares, pero también frente a cambios energéticos de la propia célula.

Las células endoteliales y las células del plexo coroideo también expresan GP, aunque en menor cantidad que los astrocitos, y exclusivamente la isoforma de cerebro (Pfeiffer-Guglielmi, Fleckenstein et al. 2003). La presencia de la GP en neuronas ha sido, como en el caso del propio glucógeno, motivo de controversia entre la comunidad científica. Aunque estudios que datan de los años 50-60 describen la expresión del enzima dentro de neuronas (Friede 1959; Takeuchi 1965; Ibrahim, Atlán et al. 1970), el estudio *in vivo* llevado por el grupo de Hamprecht, en donde la GP no era detectado en neuronas (Pfeiffer-Guglielmi, Fleckenstein et al. 2003), fue tomado como referencia por la comunidad científica y hoy en día es aceptado que las neuronas no pueden degradar glucógeno porque no expresan la GP.

Sorprendentemente, tanto los astrocitos como las neuronas expresan la isoforma muscular de la GS (Inoue, Matsukado et al. 1988; Pellegrini, Rossier et al. 1996; Vilchez, Ros et al. 2007). A diferencia de la GP, no hay ninguna duda respecto a su presencia en neuronas. Sin embargo, teniendo en cuenta la creencia de que estas células no acumulan glucógeno, la función de la GS en la neurona es un misterio y se ha propuesto que podría tener un papel alternativo no relacionado con el metabolismo de glucógeno.

### 2.3 Función del glucógeno cerebral

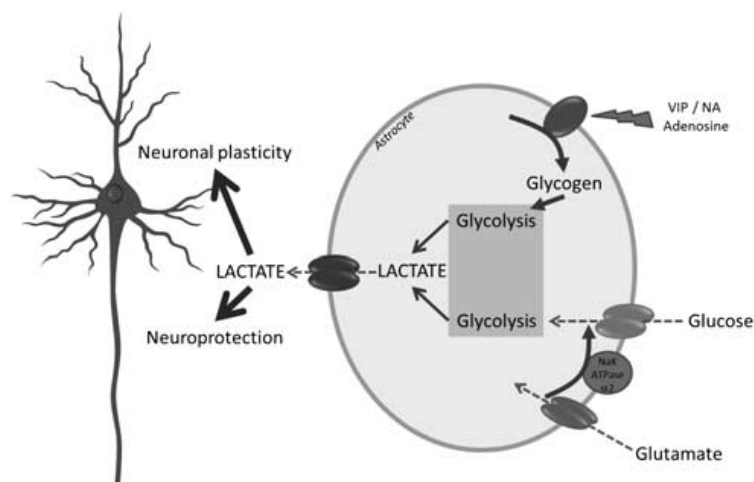
El glucógeno cerebral fue considerado, inicialmente, como una reserva energética para condiciones de bajo suministro de sustratos por sangre (Brown and Ransom 2007). Así, se demostró que *in vivo*, en condiciones de hipoglucemia se degradaban rápidamente las reservas de glucógeno cerebrales (Goncharova 1957; Choi, Seaquist et al. 2003). Experimentos llevados a cabo *in vitro* mostraron que las neuronas co-cultivadas con astrocitos tenían una supervivencia mayor en condiciones de baja glucosa (Whatley, Hall et al. 1981), y que este efecto estaba mediado por los niveles de glucógeno (Swanson and Choi 1993). Por otro lado, se vio que el glucógeno era rápidamente movilizado en condiciones de isquemia, en donde se produce un bloqueo de la irrigación del cerebro debido a una lesión vascular (Passonneau and Lowry 1971; Lipton 1989), y se le atribuyó una función protectora a la lesión inducida por la falta de suministros energéticos.

No obstante, el bajo contenido en glucógeno en el cerebro sugiere que en condiciones de ausencia de glucosa éste sería consumido rápidamente tras pocos minutos. Por ello, se ha propuesto una segunda función para el glucógeno. Éste constituiría un soporte energético durante períodos puntuales de alta actividad neuronal en condiciones de normoglicemia, cuando la glucosa que llega por la circulación sistémica es insuficiente para hacer frente al incremento de demanda energética (Brown and Ransom 2007). Hay una serie de observaciones que apoyan esta hipótesis. El glucógeno se almacena durante el sueño (Kong, Shepel et al. 2002) y la anestesia (Nelson, Schulz et al. 1968; Folbergrova, Lowry et al. 1970; Rosengarten 1970), con la consiguiente movilización cuando el cerebro despierta o se recupera. Paralelamente, el glucógeno es movilizado en períodos de estimulación sensorial y es necesario para mantener la actividad eléctrica de las neuronas (Swanson, Morton et al. 1992; Cruz and Dienel 2002; Brown, Tekkok et al. 2003; Brown, Evans et al. 2012). Otra situación fisiológica que cursa con una alta actividad neuronal es el establecimiento de memoria. Se ha demostrado que los niveles de glucógeno en el cerebro disminuyen durante el aprendizaje y juegan un papel clave en la correcta adquisición de la memoria (Gibbs, Anderson et al. 2006; Suzuki, Stern et al. 2011).

La regulación del metabolismo de glucógeno durante períodos de alta actividad neuronal es un ejemplo del acoplamiento metabólico que existe entre las neuronas y la glía. En períodos de alta actividad eléctrica, como es el caso de la estimulación sensorial o la adquisición de memoria, las neuronas liberan diversos neurotransmisores y neuromoduladores – como la noradrenalina o el

péptido intestinal vasoactivo- que, a través de receptores situados en la membrana de los astrocitos activan la degradación del glucógeno incrementando los niveles de AMP cíclico (Sorg and Magistretti 1992; Sorg, Pellerin et al. 1995). La movilización del polisacárido en astrocitos deriva en la formación de lactato que sería transferido a las neuronas para su posterior oxidación, en un proceso que se conoce como “lanzadera de lactato entre neuronas y astrocitos” (**Fig.7**). Este concepto fue introducido en primer lugar en el año 1994 por el grupo de Pierre Magistretti, con un estudio que demostró que el glutamato liberado por las neuronas en la transmisión sináptica activaba la captación de glucosa y su posterior oxidación a lactato en astrocitos (Pellerin and Magistretti 1994).

Varias observaciones apoyan la hipótesis de que el glucógeno astrocítico es degradado hasta lactato, exportado al espacio extracelular y captado por las neuronas, donde es utilizado como combustible aeróbico. Por un lado, las neuronas pueden funcionar cuando la glucosa es sustituida por lactato (Schurr, West et al. 1988) y se ha descrito que en períodos de alta actividad neuronal, éstas aumentan el consumo de lactato frente al de glucosa (Pellerin, Pellegrini et al. 1998). Por otro lado, la degradación de glucógeno inducida en la hipoglucemia aparece principalmente como lactato extracelular (Dringen, Gebhardt et al. 1993), y múltiples estudios evidencian que el lactato resultante de la degradación de glucógeno es transferido a los axones (Brown, Tekkok et al. 2003; Brown, Baltan Tekkok et al. 2004). Durante el proceso de aprendizaje, el bloqueo específico de la captación de lactato de las neuronas altera la correcta adquisición de la memoria (Suzuki, Stern et al. 2011), sugiriendo que la transferencia de lactato entre ambos tipos celulares es clave.



**Fig.7 Lanzadera de lactato entre neuronas y astrocitos.** En condiciones de alta actividad neuronal, la activación de los sistemas glutamatérgicos y adrenérgicos activa la formación de lactato a partir de la captación de glucosa y degradación de glucógeno, que es transferido a la neurona para su posterior oxidación. Figura adaptada de (Pellerin and Magistretti 2012).

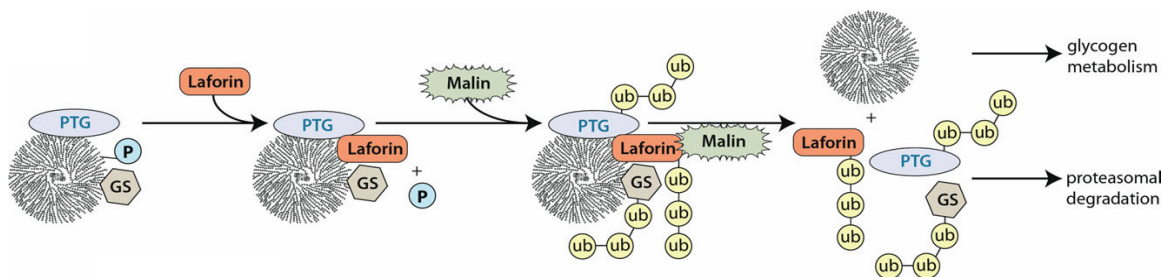
Los astrocitos no expresan la glucosa-6-fosfatasa, con lo que no pueden generar glucosa libre a partir del glucógeno (Dringen, Gebhardt et al. 1993; Magistretti, Sorg et al. 1993). Por el contrario, expresan el enzima lactato deshidrogenasa V, que transforma preferentemente el piruvato a lactato, y el transportador de monocarboxilos MCT1, que permite exportar lactato al espacio extracelular (Morgello, Uson et al. 1995; Koehler-Stec, Simpson et al. 1998; Pierre, Pellerin et al. 2000). Las neuronas expresan el transportador MCT2, que permite incorporar el lactato extracelular incluso a concentraciones muy bajas (Pierre, Pellerin et al. 2000; Bergersen, Waerhaug et al. 2001; Debernardi, Pierre et al. 2003), y el enzima lactato deshidrogenasa I, que convierte el lactato a piruvato (Bittar, Charnay et al. 1996) para ser utilizado en la oxidación aeróbica. Así pues, la maquinaria metabólica de los astrocitos y de las neuronas parece estar adaptada al acoplamiento energético que implica la transferencia de lactato de los astrocitos hacia las neuronas.

Paralelamente se ha hipotetizado que el glucógeno se encuentra en astrocitos ya que, en condiciones de baja glucosa, estas células degradarían el polisacárido y no consumirían, por tanto, glucosa extracelular. De esta manera, la glucosa disponible para las neuronas sería mayor y se evitaría que en ningún momento la neurona se quedara sin sustrato energético.

## 2.4 El glucógeno en situaciones patológicas

Las enfermedades denominadas enfermedades de acumulación de glucógeno (*Glycogen Storage Diseases o GSD*) tienen como causa mutaciones en los distintos genes del metabolismo del glucógeno. Todas las variantes cursan con una sobre-acumulación de glucógeno en diversos tejidos, y en algunos casos la sobre-acumulación se da también en el cerebro y, específicamente en neuronas. Es el caso de la enfermedad de Pompe (GSDIII), en donde las células carecen del enzima  $\alpha$ -glucosidasa lisosomal, y cuyos pacientes pueden presentar acúmulos cerebrales del polisacárido (Sidman, Taksir et al. 2008; Burrow, Bailey et al. 2010). No obstante, los casos más claros de acumulación aberrante de glucógeno en el cerebro son la enfermedad de Andersen (GSDIV) (Lamperti, Salani et al. 2009), causada por carencia en el enzima ramificante y la enfermedad de cuerpos de poliglucosano en adultos. Esta última está clasificada como una forma adulta de GSDIV, o como una enfermedad independiente en función de si se detecta o no una anomalía en el gen del enzima ramificante. A nivel celular, los acúmulos de glucógeno en estas tres enfermedades se han localizado dentro de las neuronas, lo que sugeriría que estas células podrían tener un metabolismo activo de glucógeno.

El caso más claro de acumulación anómala de glucógeno en neuronas es la enfermedad de Lafora. La enfermedad de Lafora es una patología neurodegenerativa y la causa más frecuente de epilepsia mioclónica progresiva al sur de Europa. En los pacientes, los acúmulos aberrantes de glucógeno pueden localizarse prácticamente en todos los tejidos, siendo más abundante en cerebro, corazón y músculo esquelético (Busard, Renier et al. 1987; Berkovic, Cochius et al. 1993; Acharya, Satishchandra et al. 1995). A nivel genético, la enfermedad se manifiesta indistintamente cuando existen mutaciones en la EPM2A, o laforina (Serratosa, Delgado-Escueta et al. 1995; Sainz, Minassian et al. 1997), o en el gen EPM2B, o malina (Chan, Young et al. 2003). La laforina es una proteína fosfatasa (Ganesh, Agarwala et al. 2000; Wang, Stuckey et al. 2002), con un dominio de unión a carbohidratos que promueve su unión a glucógeno. La malina es una E3 ubiquitin ligasa con dominios adicionales NHL de interacción proteína-proteína (Freemont 2000). Laforina y malina interaccionan entre ellas y, sobre el gránulo de glucógeno ubiquitinan y promueven la degradación proteasomal de diversas proteínas del metabolismo de glucógeno, como la MGS, la PTG (Vilchez, Ros et al. 2007), o la propia laforina (Gentry, Worby et al. 2005; Vilchez, Ros et al. 2007) (**Fig.8**). Esta degradación ha supuesto un mecanismo adicional de regulación del metabolismo de glucógeno que parece tener especial importancia en las células neuronales.



**Fig.8 Degradación de la MGS, PTG y laforina por la acción del complejo laforina-malina.** La MGS, PTG y laforina se encuentran localizadas sobre el gránulo de glucógeno. La interacción de malina con laforina casua la ubiquitinización de PTG, laforina y MGS y su posterior degradación a través del protasoma. Figura adaptada de (Roma-Mateo, Sanz et al. 2012).

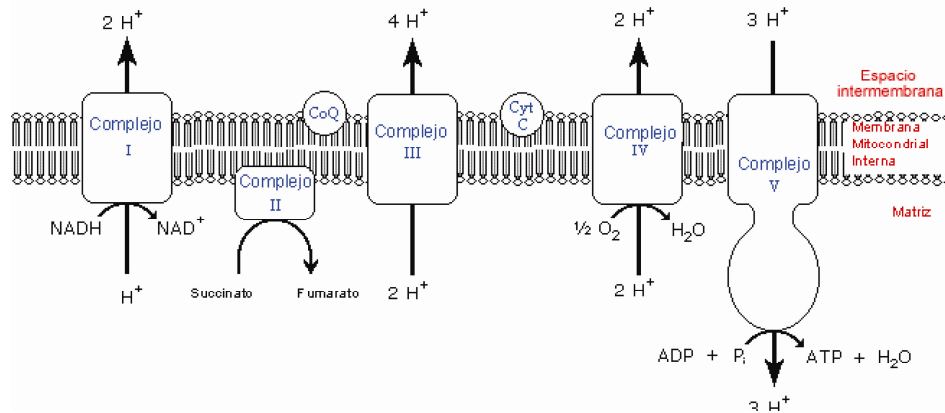
Otra situación que cursa con un aumento de glucógeno anormal en el cerebro es el propio proceso de envejecimiento. En humanos y otros mamíferos de edad avanzada se ha descrito la presencia de unos cuerpos amiláceos, o Corpora Amylacea (CA) (Cavanagh 1999). Los CA contienen principalmente un núcleo de cadenas de poliglucosano y podrían estar originadas, por tanto, por alteraciones en el metabolismo de glucógeno con la edad. Las propiedades físicas de los CA, el tipo celular donde se originan, así como la causa o la función de los CA no está establecida.

### 3. LA FALTA DE OXÍGENO: HIPOXIA

La evolución de los organismos multicelulares en la tierra ha dependido de dos eventos críticos. El primer evento, hace aproximadamente 2500 millones de años, fue la evolución de organismos que traducían la energía solar en energía química de enlaces carbonos (Falkowski 2006). Durante la fotosíntesis, CO<sub>2</sub>, agua y luz eran utilizados para generar glucosa y, como producto secundario, O<sub>2</sub>. El aumento progresivo en los niveles de O<sub>2</sub> atmosféricos conllevó al segundo evento crítico, hace aproximadamente 1500 millones de años, que fue el establecimiento de una relación simbiótica entre organismos unicelulares y células multicelulares. Éstas se especializaron en reacciones químicas en donde a partir de glucosa y O<sub>2</sub> se obtenía ATP, y CO<sub>2</sub> y agua como productos secundarios, proceso conocido como fosforilación oxidativa. Comparado con el

proceso de fermentación de glucosa a lactato, la fosforilación oxidativa aumentaba 18 veces la obtención neta de ATP por mol de glucosa consumido.

El objetivo de la fosforilación oxidativa es la transferencia de electrones a través de una serie de citocromos aceptores para generar un gradiente de protones en la membrana mitocondrial interna (**Fig.9**). La energía potencial de este gradiente se utiliza para generar ATP. El  $O_2$  es utilizado como aceptor terminal electrónico con la consecuente obtención de agua, un proceso que está catalizado por la Citocromo c oxidasa (Complejo IV, COX). Este proceso no es completamente eficiente, tal que la transferencia de electrones al  $O_2$  puede darse en el Complejo I o Complejo III, resultando en la generación de radicales superóxido, que son convertidos a  $H_2O_2$  por la acción de la superóxido dismutasa. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen el potencial de oxidar proteínas celulares, lípidos y ácidos nucleicos, causando disfunción o incluso la muerte celular. Contrariamente, niveles fisiológicos de ROS mitocondriales son utilizados por las células de mamífero como transductores de señal.



**Fig.9 Componentes de la cadena electrónica situados en la membrana mitocondrial interna.**

El complejo de la cadena respiratoria está compuesto por: Complejo I: NADH:ubiquinona oxidoreductasa; Complejo II: Succinato:ubiquinona oxidoreductasa; Complejo III: Citocromo bc1; Complejo IV: Citocromo c oxidasa, COX; Complejo V: ATP Sintasa; CoQ: Coenzima Q; Cyt C: Citocromo c.

No obstante, cuando no llega suficiente  $O_2$  a las células por el torrente sanguíneo para mantener la fosforilación oxidativa, las células se ven expuestas a una situación de hipoxia. La tensión crítica de oxígeno determina cuando un tejido se vuelve hipóxico, y es dependiente del tipo de

tejido, la demanda y suministro de oxígeno, así como de su capacidad aerobia. Además, existe una gran heterogeneidad en los niveles de oxígeno dentro de un organismo (21% de O<sub>2</sub> en la atmósfera frente a 14% en el aire alveolar, 12% en la sangre arterial y 5,3% en la sangre venosa).

La situación de hipoxia se da, entre otras, en un infarto cerebral, isquemia cardíaca o como consecuencia de una irrigación pobre de las extremidades.

### **3.1 Adaptaciones celulares a la hipoxia**

En circunstancias fisiológicas y patológicas, existe una respuesta a nivel celular, para sobrevivir y adaptar su maquinaria a las fluctuaciones en la disponibilidad de O<sub>2</sub>. Algunos de los mecanismos regulados son el consumo de oxígeno, el metabolismo de la glucosa, remodelización vascular (angiogénesis) y la proliferación y supervivencia celular.

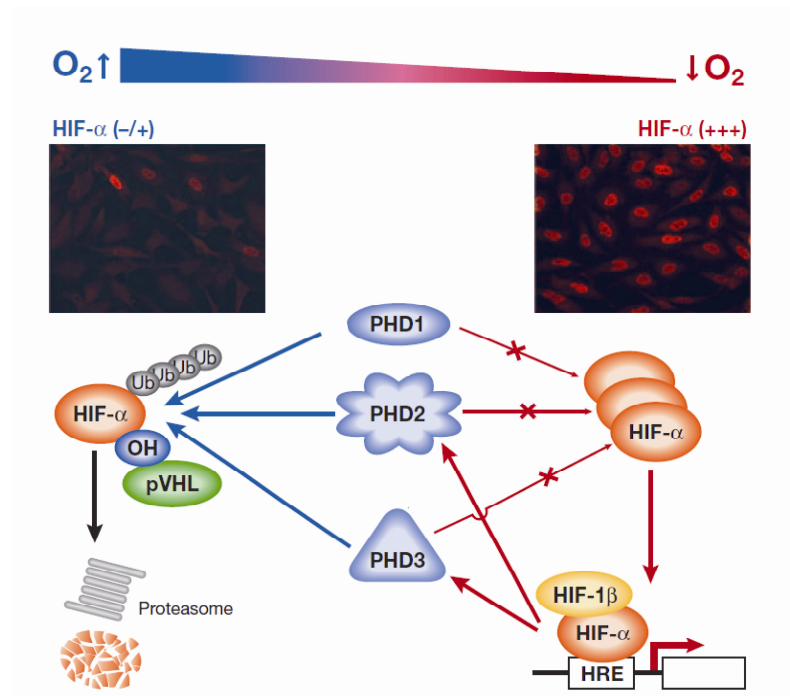
#### **3.1.1 Factores de transcripción estabilizados en hipoxia**

Los factores de transcripción estabilizados en hipoxia (o HIF) son factores de transcripción de tipo hélice-lazo-hélice básico (Basic-helix-loop-helix) constituidos por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\beta$  se expresa de manera constitutiva, mientras que la presencia de la subunidad  $\alpha$  es dependiente de los niveles de oxígeno. Bajo condiciones de oxígeno ambientales (normoxia), HIF  $\alpha$  es ubiquitinada y degradada a través del proteasoma. Sin embargo, conforme las concentraciones de O<sub>2</sub> disminuyen, este proceso está inhibido (Wang, Jiang et al. 1995). HIF reconoce y se une a los motivos de secuencia G/ACGTG presentes en regiones del DNA nuclear y que se conocen como elementos de respuesta a hipoxia (HRE) (Semenza, Neufelt et al. 1991). HIF1 fue descubierto en primer lugar como inductor del gen de la eritropoietina (Wang and Semenza 1993) y hoy en día se conocen cientos de genes que están regulados por este factor de transcripción.

Existen tres tipos distintos de genes para las subunidades  $\alpha$ : HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ . HIF1 $\alpha$  constituye el principal regulador de la expresión de genes con secuencias HRE en su región promotora. HIF1 $\alpha$  está presente en todos los tipos celulares de los organismos eucariotas, tanto en tejidos adultos como embrionarios (Jain, Maltepe et al. 1998). En el desarrollo regula la

expresión de genes necesarios para la correcta formación del sistema vascular y los embriones deficientes para el gen de HIF1 $\alpha$  mueren antes de su nacimiento (Iyer, Kotch et al. 1998). Debido a su importancia, es el gen más estudiado de todos los HIFs. HIF2 $\alpha$  comparte funciones con HIF1 $\alpha$ , aunque su expresión no es ubicua, detectándose principalmente en células epiteliales, riñón, células catecolaminérgicas y en el pulmón. (Jain, Maltepe et al. 1998). A diferencia de las subunidades 1 $\alpha$  y 2 $\alpha$ , HIF3 $\alpha$  apenas tiene capacidad para inducir la expresión de los genes regulados por HIF y se ha postulado como un regulador negativo impidiendo la acción de HIF1 $\alpha$  y 2 $\alpha$  (Maynard, Evans et al. 2005).

Las proteínas que participan en el proceso de degradación son las prolil-hidroxilasas (PHD), (**Fig.10**). Tres prolil hidroxilasas (PHD1-3), modifican la prolina 402 y 564 de HIF $\alpha$  (Bruick and McKnight 2001; Epstein, Gleadle et al. 2001). La hidroxilación es necesaria por la interacción de HIF $\alpha$  con la proteína von Hippel- Lindau (VHL) (Ivan, Kondo et al. 2001; Jaakkola, Mole et al. 2001; Masson, Willam et al. 2001). VHL es el componente de reconocimiento de una E3 ubiquitina ligasa que marca HIF1 $\alpha$  para su degradación vía proteasoma (Maxwell, Wiesener et al. 1999; Ohh, Park et al. 2000). Además, el dominio de transactivación de HIF $\alpha$  también está regulado por los niveles de O<sub>2</sub> (Jiang, Zheng et al. 1997; Pugh, O'Rourke et al. 1997) vía la acción del factor inhibidor de HIF1 (FIH 1) (Mahon, Hirota et al. 2001). FIH 1 media su efecto a través de la hidroxilación de la asparagina 803, que bloquea la interacción de HIF 1 $\alpha$  con sus co-activadores transcripcionales p300 y CBP (Hewitson, McNeill et al. 2002; Lando, Peet et al. 2002).



**Fig.10 Regulación de HIFα en función de la disponibilidad de oxígeno.** En condiciones aeróbicas (flechas azules), las PHD hidroxilan HIFα, lo que permite su unión a la proteína VHL y posterior degradación vía proteasoma. En hipoxia (flechas rojas), las PHD se inhiben: HIFα se acumula e induce la expresión de sus genes diana. HRE: elemento de respuesta a hipoxia. Figura adaptada de (Berra, Ginouves et al. 2006)

### 3.1.2 Cambios celulares a la hipoxia

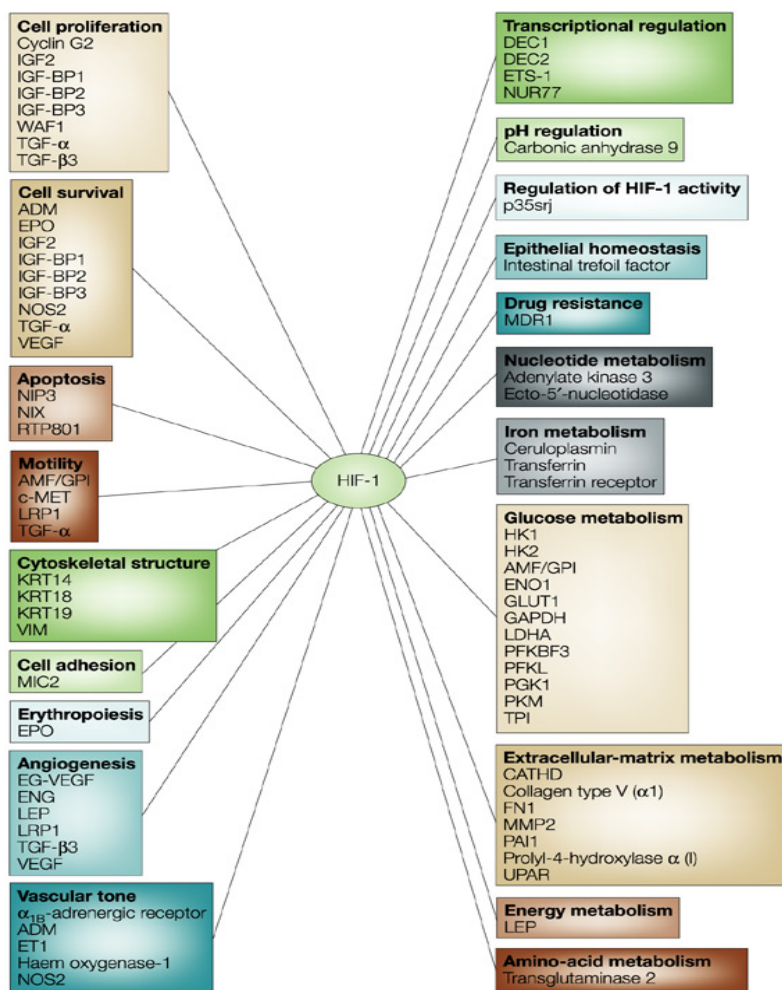
Dado que la célula y el organismo necesita adaptarse a las condiciones de bajo oxígeno, no parece sorprendente que más de un 2% de todos los genes humanos estén regulados por HIF1, ya sea de manera directa o indirecta (**Fig.11**), (Manalo, Rowan et al. 2005)).

#### I) Suministro de oxígeno

**Eritropoiesis/ Metabolismo del hierro.** En respuesta a la hipoxia, la capacidad de los eritrocitos para transportar oxígeno aumenta con la expresión de genes involucrados en la eritropoiesis y el metabolismo el hierro. Entre ellos se encuentra la eritropoyetina, necesaria para la formación de

los glóbulos rojos (Semenza, Nejfelt et al. 1991). El incremento en el número de eritrocitos mejora el suministro de oxígeno a los tejidos. A su vez, la inducción de la transferrina (Rolfs, Kvietikova et al. 1997), que transporta hierro a las células, el receptor de transferrina (Bianchi, Tacchini et al. 1999), y ceruloplasmina (Mukhopadhyay, Mazumder et al. 2000), responsable de oxidar hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) permite una transferencia más efectiva de hierro a los eritrocitos.

**Angiogénesis.** La angiogénesis es un proceso complejo en el que múltiples genes de diversos tipos celulares están involucrados (Conway, Collen et al. 2001). Gran parte de estos genes son dianas de HIF, entre ellos el factor de crecimiento vascular y endotelial (VEGF) (Levy, Levy et al. 1995), un mitógeno que activa la proliferación de células endoteliales en áreas pobremente vascularizadas (Neufeld, Cohen et al. 1999). Paralelamente, en hipoxia se inducen genes relacionados con el control de la matriz extracelular (como metaloproteasas de matriz (Ben-Yosef, Lahat et al. 2002)), y la maduración vascular (como receptores activados por plasminógeno (Kietzmann, Roth et al. 1999)).



**Fig.11 Genes inducidos por la acción de HIF1 que median la respuesta celular a la hipoxia.** ADM, adrenomedulina; ALDA, aldolasa A; ALDC, aldolasa C; AMF, factor autocrino de motilidad; CATHD, catepsina D; EG-VEGF, VEGF derivado de la glándula endocrina; ENG, endoglina; ET1, endotelina-1; ENO1, enolasa 1; EPO, eritropoietina; FN1, fibronectina 1; GLUT1, transportador de glucosa 1; GLUT3, transportador de glucosa 3; GAPDH, gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa; HK1, hexoquinasa 1; HK2, hexoquinasa 2; IGF2, factor de crecimiento insulin-like 2; IGF-BP1, proteína de unión al factor IGF 1; IGF-BP2, proteína de unión al factor IGF 2; IGF-BP3, proteína de unión al factor IGF 3; KRT14, queratina 14; KRT18, queratina 18; KRT19, queratina 19; LDHA, lactato deshidrogenasa A; LEP, leptina; LRP1, proteína relacionada con el receptor de LDL 1; MDR1, resistencia a drogas múltiples 1; MMP2, metaloproteinasas de matriz 2; NOS2, sintasa de óxido nítrico 2; PFKFB3, 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3; PFKL, fosfofructoquinasa L; PGK 1, fosfoglicerato quinasa 1; PAI1, inhibidor del activador de plasminógeno 1; PKM, piruvato quinasa M; TGF- $\alpha$ , transforming factor de crecimiento - $\alpha$ ; TGF- $\beta$ 3, transforming factor de crecimiento- $\beta$ 3; TPI, isomerasa triosafosfato; VEGF, factor de crecimiento vascular y endotelial; UPAR, receptor del activador de plasminógeno uroquinasa; VEGFR2, receptor de VEGF-2; VIM, vimentina. Adaptado de (Semenza 2003).

## II) Compensación energética

**Metabolismo de la glucosa.** La principal adaptación de las células a la hipoxia es el cambio de metabolismo aerobio al anaerobio, conocido como “Efecto Pasteur”. (**Fig.12**) (Dang and Semenza 1999; Seagroves, Ryan et al. 2001). Con solamente 2 moléculas de ATP producidas por molécula de glucosa en la glicólisis anaerobia, frente a los 38 ATP que se obtienen en la oxidación completa de la glucosa a través de la fosforilación oxidativa, las células aumentan la capacidad de generación de ATP incrementando el flujo glicolítico. En condiciones de bajo oxígeno, HIF1 $\alpha$  induce la expresión de genes clave para la glicólisis, como los transportadores de glucosa, la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la lactato deshidrogenasa (Iyer, Kotch et al. 1998). Asimismo, se produce un aumento en la expresión de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1 y PDK4) (Kim, Tchernyshyov et al. 2006; Papandreou, Cairns et al. 2006; Aragonés, Schneider et al. 2008). A través de un mecanismo de fosforilación, la PDK inhibe la actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa, enzima clave en la regulación de la entrada de piruvato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), paso previo a la cadena electrónica (Papandreou, Cairns et al. 2006).

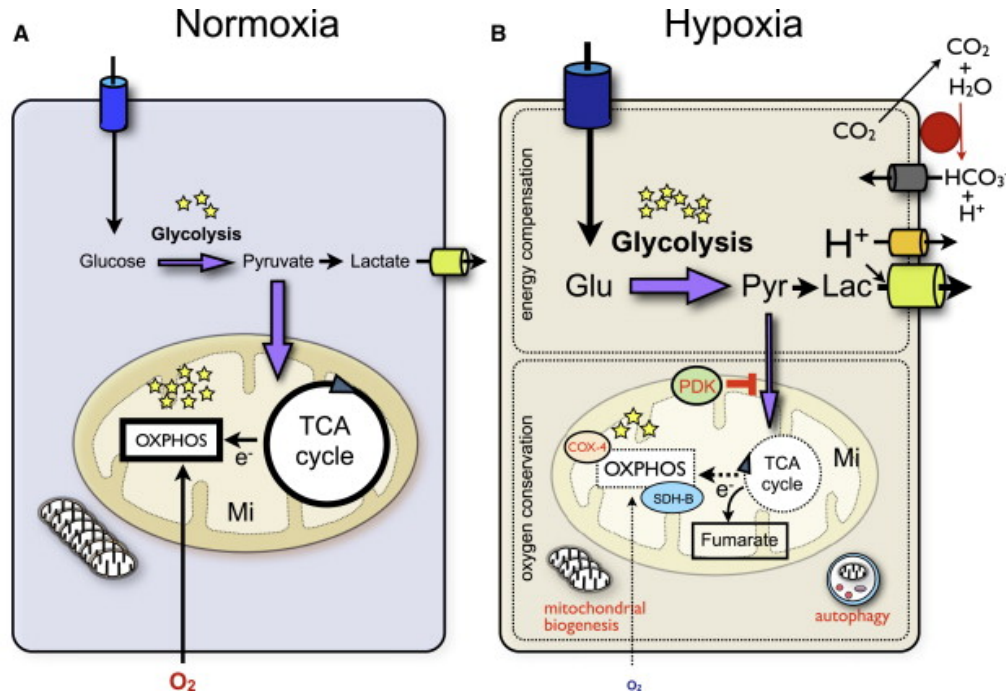
Para impedir una excesiva acidificación intracelular como consecuencia de la generación de lactato a través de la glicólisis, aumenta la expresión de los transportadores de monocarboxilos (MCT) y de los intercambiadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que median la salida de lactato y protones (Pouyssegur, Dayan et al. 2006; Shimoda, Fallon et al. 2006; Ullah, Davies et al. 2006).

**Consumo de oxígeno** La respiración mitocondrial depende de la disponibilidad de oxígeno. Así pues, en hipoxia se activan mecanismos para reducir la tasa de respiración, a través de un decremento en la oxidación de la glucosa. Como se ha comentado en el anterior apartado, la inducción de las PDKs restringe la entrada de piruvato en el TCA (**Fig.12**), y lo dirige hacia su conversión a lactato.

Los factores de transcripción HIF también regulan la expresión de los enzimas respiratorios Citocromo c oxidasas (COX). Concretamente, se produce un cambio en la isoforma expresada, de la COX-1 a la COX-2, que presenta una actividad enzimática específica mayor aumentando la eficiencia de transferencia de electrones hacia la molécula de O<sub>2</sub> cuando sus niveles son bajos

(Fukuda, Zhang et al. 2007). De este modo disminuye la generación de ROS a nivel del complejo mitocondrial I y III como consecuencia del escape de electrones. Paralelamente, también hay una disminución en la biogénesis de mitocondrias, a través de la represión de la actividad de c-Myc, que promueve la generación de nuevas mitocondrias (Zhang, Gao et al. 2007). Cuando las células no son capaces de generar suficiente ATP para su supervivencia, se activa la autofagia, que a su vez reduce el contenido mitocondrial, disminuyendo la tasa de respiración (Zhang, Bosch-Marce et al. 2008).

Recientemente se ha establecido otro mecanismo adaptativo a condiciones de bajo oxígeno. A la altura del complejo mitocondrial II, algunas células pueden utilizar alternativamente fumarato como aceptor final de electrones, manteniendo de esta manera la polarización de la membrana mitocondrial, aun cuando la respiración oxidativa está completamente paralizada (Sridharan, Guichard et al. 2008).



**Fig.12 Regulación de la compensación energética en condiciones de hipoxia.** (A) En normoxia, la glucosa es captada por los transportadores de glucosa y metabolizada a piruvato a través de la glicólisis, obteniendo cantidades modestas de ATP (representado como estrellas). El piruvato es, en menor grado, convertido a lactato y liberado al espacio extracelular o, en su mayor parte, entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA cycle) en la mitocondria, generando electrones que se utilizarán para la obtención de ATP en la fosforilación oxidativa (OXPHOS). La biogénesis de mitocondrias (indicado con pequeñas mitocondrias en la parte inferior izquierda) contribuye al metabolismo oxidativo. (B) En hipoxia, se producen cambios a nivel de compensación y conservación energética. El consumo de oxígeno (panel inferior) disminuye como consecuencia de (a) el bloqueo de la entrada de piruvato al TCA vía inducción de la PDK, (b) la reducción en el contenido mitocondrial disminuyendo su biogénesis paralelamente a un aumento en la autofagia y (c) el cambio en las subunidades de la Citocromo c oxidasa (COX) para optimizar la eficiencia de respiración. El uso de fumarato como aceptor final de electrones alternativo puede eludir la falta de oxígeno. La compensación energética (panel superior) se basa en el aumento de la tasa glicolítica para compensar la disminución de la producción de ATP mitocondrial. Este aumento comienza con un incremento en la captación y fosforilación de glucosa. Los productos finales de la glicólisis, lactato y protones, son exportados al espacio extracelular a través de transportadores específicos. Figura adaptada de (Aragones, Fraisl et al. 2009).

### III) Supervivencia celular

**Proliferación celular.** La hipoxia cursa con una inducción en factores de crecimiento, como el factor de crecimiento “insulin-like” (IGF2) o factor de crecimiento “transforming” (TGF  $\alpha$ ) (Feldser, Agani et al. 1999; Krishnamachary, Berg-Dixon et al. 2003). La unión de estos factores de crecimiento a sus receptores activa cascadas de señalización que estimulan la proliferación y la supervivencia. Es el caso de la inducción de la vía de las MAPK y PI3K, que activa la expresión de HIF1  $\alpha$ , en un mecanismo de retroalimentación positiva (Semenza 2003).

**Apoptosis.** Paradójicamente, la adaptación de las células a la hipoxia puede llevar a la estimulación no sólo de la proliferación, sino también de la apoptosis en determinadas circunstancias (Carmeliet, Dor et al. 1998). En condiciones de hipoxia se han descrito tres mecanismos de activación de la apoptosis: la liberación del citocromo c de la membrana mitocondrial (Saikumar, Dong et al. 1998), la generación de ROS (Kim and Park 2003) y la activación de la quinasa c-jun terminal (JNK) (Kunz, Ibrahim et al. 2001). El destino de las células dependerá en parte, del tipo celular, y por otro lado, de la severidad de la hipoxia a la que se ven expuestas las células. Si la célula activa su programa de apoptosis o de supervivencia es el resultado de una fina regulación entre múltiples señales positivas y negativas.

#### 3.1.3 Impacto de la hipoxia sobre el metabolismo del glucógeno

El estudio de la regulación del glucógeno bajo un episodio de hipoxia se ha llevado a cabo a distintos niveles.

En primer lugar se ha analizado el efecto de la falta de oxígeno sobre los niveles de glucógeno cerebrales en animales. Para ello se ha determinado la cantidad de glucógeno en el momento exacto tras finalizar el insulto hipóxico. Además, la exposición a la hipoxia se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas: la exposición de animales a una cámara con niveles reducidos de oxígeno (Vannucci and Vannucci 1980; Harik, Lust et al. 1995; Brucklacher, Vannucci et al. 2002), la decapitación del animal (Lowry, Passonneau et al. 1964; Swanson, Sagar et al. 1989), o la ligación de las carótidas (Sikorska and Smialek 1974; Wagner and Lanier 1994). En todos los casos se ha observado una clara disminución en los niveles del glucógeno cerebrales, cuya

reducción dependía, en algunos casos, de la región cerebral analizada (Sikorska and Smialek 1974).

En segundo lugar se ha estudiado la evolución de los niveles de glucógeno cerebrales durante el período de recuperación tras la exposición de hipoxia. En este caso, se ha observado un aumento en los niveles de glucógeno por encima de los valores iniciales previos al insulto y que, generalmente, llegaban a su máximo tras 24 horas de recuperación (Ibrahim 1972; Folbergrova, Katsura et al. 1996; Brucklacher, Vannucci et al. 2002). A nivel celular, este aumento de glucógeno ha sido detectado tanto en astrocitos (Mossakowski, Long et al. 1968) como en neuronas (Long, Mossakowski et al. 1972). La sobre-acumulación de glucógeno tras un episodio de hipoxia parece no ser una respuesta específica de cerebro, ya que también se ha descrito en otros tipos celulares, como en el caso de células musculares cardíacas (Mamedova, Shneyvays et al. 2003).

En la última década, con la introducción de las técnicas de biología molecular, se han identificado múltiples genes del metabolismo de glucógeno como dianas del factor de transcripción HIF1 $\alpha$ . Trabajando con líneas celulares de origen tumoral, se ha caracterizado el metabolismo de glucógeno bajo condiciones de hipoxia. Se obtuvieron unos resultados diferentes a los observados hasta el momento. En líneas celulares de origen muscular y hepático (Pescador, Villar et al. 2010), renal (Pelletier, Bellot et al. 2012) o de mama (Shen, Zhang et al. 2010), así como en células no cancerosas (como hepatocitos o fibroblastos) el glucógeno aumenta en la hipoxia. Esta acumulación de glucógeno está mediada por HIF1 $\alpha$ , que induce la expresión de la isoforma muscular de la GS, la proteína ramificante y la UDP-glucosa pirofosforilasa (Pescador, Villar et al. 2010), la fosfoglucomutasa (Pelletier, Bellot et al. 2012) y la PTG (Ortiz-Barahona, Villar et al. 2010; Shen, Zhang et al. 2010).

La divergencia de los datos publicados evidencia la complejidad de la regulación del metabolismo de glucógeno bajo condiciones de hipoxia y pone además, de manifiesto la importancia a la hora de elegir el modelo de estudio así como el tipo de hipoxia en la obtención de resultados.

### 3.2 Importancia de la hipoxia en condiciones patológicas

La hipoxia y los factores de transcripción HIF están relacionados con múltiples procesos patológicos, principalmente en la progresión tumoral, la isquemia cardíaca y el infarto cerebral.

**Progresión tumoral.** La situación de hipoxia que más ha centrado la atención de la investigación es la asociada al microambiente tumoral (Brown and Giaccia 1998). Como consecuencia de un crecimiento descontrolado del tumor, la vascularización del mismo es insuficiente, con lo que la tensión de oxígeno dentro del propio tumor varía en función de la localización celular. Las regiones más centrales se vuelven hipóxicas y activan, consecuentemente, un programa celular para su supervivencia (Semenza 2003). La hipoxia supone un factor crítico de estrés que condiciona su crecimiento (Graeber, Osmanian et al. 1996; Hockel and Vaupel 2001) y se han propuesto terapias que inhiban la actividad de HIF (Kung, Wang et al. 2000). Además la hipoxia constituye una variable importante a la hora de establecer el pronóstico del paciente (Brizel, Scully et al. 1996; Cairns and Hill 2004).

Mutaciones en el gen que codifica para la proteína VHL causa la enfermedad *von Hippel Lindau* (Maher and Kaelin 1997), un síndrome genético que predispone al desarrollo de tumores altamente vascularizados en diversos tejidos, en especial el riñón, cerebro, páncreas y células neuroendocrinas. La patogénesis de los tumores VHL parece estar relacionada con la pérdida de la función de VHL, y la consecuente sobre acumulación de HIF1 durante el desarrollo (Ratcliffe 2003). , con lo que se están desarrollando terapias basadas en inhibidores de HIF para el tratamiento de tumores VHL +/- en riñón.

**Isquemia cardíaca.** Durante la insuficiencia cardíaca, la hipoxia y, específicamente, los factores de transcripción HIF tienen un papel protector para la célula. Este papel protector está basado, en parte, en el aumento en los niveles de VEGF y en la reprogramación metabólica, disminuyendo la demanda energética (Aragones, Schneider et al. 2008). En este sentido, se están desarrollando fármacos que tratan de estabilizar el factor de transcripción HIF1, ya sea impidiendo su degradación o estimulando su expresión (Li, Post et al. 2000). Un segundo aspecto de interés es el del papel de HIF1 en el pre-condicionamiento cardíaco ante la isquemia, descrito en el corazón, pero también en el riñón o cerebro. Cuando un órgano es sometido a un tiempo corto de hipoxia, previo a un periodo isquémico, se pone de manifiesto una protección celular, que no se observa en el caso del tejido no pre-tratado (Marber and Yellon 1992; Perez-Pinzon, Mumford et al.

1996). Esta protección está relacionada con la síntesis de RNA y nuevas proteínas (Gidday, Fitzgibbons et al. 1994), en gran parte dianas de HIF1 $\alpha$ . Es el caso del incremento de la sintasa de óxido nítrico (NOS2) en miocardiocitos y células endoteliales (Palmer, Semenza et al. 1998) o la inducción de la eritropoietina en el cerebro (Sakanaka, Wen et al. 1998). Así, ensayos de isquemia-reperfusión llevados a cabo con ratones salvajes y HIF1 $\alpha$ +/- han evidenciado la importancia de HIF1 $\alpha$  en la protección cardíaca durante estos procesos (Cai, Zhong et al. 2008).

**Infarto cerebral.** El infarto cerebral ocurre cuando el flujo sanguíneo cerebral es interrumpido. Considerando la alta demanda energética del cerebro y la total dependencia al suministro continuo de oxígeno, éste órgano es especialmente sensible a la falta de irrigación. El infarto cursa con la muerte neuronal y de glía y, en algunos casos, la de vasos sanguíneos. La isquemia cerebral induce la estabilización de HIF1 $\alpha$  y la consecuente inducción de múltiples genes. Entre estos genes se encuentran factores vasodilatadores, como la sintasa de óxido nítrico (Iadecola, Zhang et al. 1995), angiogénicos, como la VEGF (Marti, Bernaudin et al. 2000), o factores que promueven la supervivencia neuronal, como es el caso de la neuroglobina (Sun, Jin et al. 2001; Sun, Jin et al. 2003).

**Otras.** La retinopatía diabética es una de las causas principales de ceguera en el mundo occidental (Kocur and Resnikoff 2002) y se caracteriza por un proceso de angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. El desencadenante es una pérdida parcial de capilares en la retina, que origina una situación de hipoxia en donde se inducen factores pro-angiogénicos (Bursell, Clermont et al. 1996; Ozaki, Yu et al. 1999). Por razones desconocidas, la retina no es capaz de soportar esta re-vascularización y se producen procesos de edema, hemorragia y fibrosis (Morello 2007).

Múltiples enfermedades neurodegenerativas se han asociado con situaciones de hipoxia. Es el caso de la enfermedad de Parkinson, en donde se produce una muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. El enzima limitante en la síntesis de dopamina, la tirosina hidroxilasa, es un gen diana de HIF con múltiples HRE en su promotor (Millhorn, Raymond et al. 1997). En consecuencia, la hipoxia podría constituir un factor regulador en la patogénesis de la enfermedad.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una condición que afecta a neuronas motoras causando una distrofia muscular. Solo un pequeño porcentaje de los pacientes presentan alteraciones

genéticas en el gen de la superóxido dismutasa, mientras que en la mayoría la enfermedad se instala de manera aleatoria. Fue una sorpresa, por tanto, descubrir que ratones que contenían una única mutación en uno de los múltiples sitios HRE que posee el gen de la VEGF presentaban una degeneración motora equivalente a la de los pacientes con ELA (Oosthuyse, Moons et al. 2001). Estos resultados sugieren que la hipoxia podría tener un papel en el establecimiento de ELA.

Períodos de hipoxia crónica, que pueden originarse a raíz de problemas respiratorios, predisponen a los individuos al desarrollo de demencias y, en particular, al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Peers, Dallas et al. 2009). La enfermedad de Alzheimer se caracteriza principalmente por la acumulación del péptido  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ), que acaba formando unas placas de amiloide que se acumulan en el espacio extracelular (Hardy and Higgins 1992). Numerosos estudios muestran que la hipoxia induce la formación de las placas, aumentando la expresión de su precursor (la proteína precursora de amiloide) (Jendroska, Hoffmann et al. 1997; Shi, Yang et al. 2000), así como de las secretasas (Webster, Green et al. 2002), enzimas responsables de la producción del  $A\beta$  a partir de su precursor. Por tanto, la exposición a períodos de hipoxia durante la vida de un individuo podría influir en la predisposición para desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

Debido a la alta dependencia de las neuronas al suministro de oxígeno, las neuronas son altamente sensibles a un ambiente de bajo oxígeno. Desafortunadamente, conforme envejecemos, disminuye el suministro de oxígeno a las neuronas, aumentando su susceptibilidad a posibles insultos. Asimismo, la adaptación celular a la hipoxia disminuye con la edad, con lo que las consecuencias de un infarto cerebral son notablemente mayores en individuos viejos que en jóvenes (Yager, Wright et al. 2006). El papel clave de la hipoxia en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas justifica la importancia de la caracterización de la respuesta neuronal a condiciones de bajo oxígeno.



#### **IV. OBJETIVOS**



## **OBJETIVOS**

La presencia de glucógeno en las neuronas ha sido motivo de controversia durante las pasadas décadas. Está aceptado que las neuronas expresan la maquinaria necesaria para sintetizar glucógeno, pero no para degradarlo. La presencia de la GS en las neuronas es un misterio y no existe ningún estudio que analice cuál es su función fisiológica en este tipo celular. Diversos estudios han demostrado que una hiper-activación de la GS y la consecuente acumulación de glucógeno desencadenan la entrada de la neurona en apoptosis, siendo así la GS un caballo de Troya para ella. Sin embargo, el hecho de que la neurona gaste energía para su transcripción y traducción hace pensar que su presencia en la neurona es importante para su correcto funcionamiento.

Los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Caracterización de la presencia de glucógeno en neuronas.
2. Estudio de la maquinaria de degradación de glucógeno en neuronas y su regulación en hipoxia
3. Análisis de la síntesis de glucógeno en neuronas expuestas a hipoxia.
4. Evaluación de la función biológica de la GS en neuronas bajo condiciones de hipoxia.



## **V. RESULTADOS**



## **RESULTADOS: CAPÍTULO 1**

### **EVIDENCIAS DE UN METABOLISMO ACTIVO DE GLUCÓGENO EN NEURONAS**

#### **1.1 Introducción**

La función y distribución celular del glucógeno en el cerebro no está completamente establecida. Aunque su presencia se ha restringido principalmente a astrocitos, las neuronas expresan toda la maquinaria necesaria para su síntesis.

Las neuronas tienen una elevada demanda energética. Desde un punto de vista teórico, la presencia de glucógeno las haría menos sensibles a fluctuaciones extracelulares de glucosa, y menos dependientes a su vez del suministro de sustratos energéticos que llega a través del torrente sanguíneo. Por tanto, cabría preguntarse por qué las neuronas no acumularían glucógeno si, a simple vista, podría tener grandes beneficios para ellas.

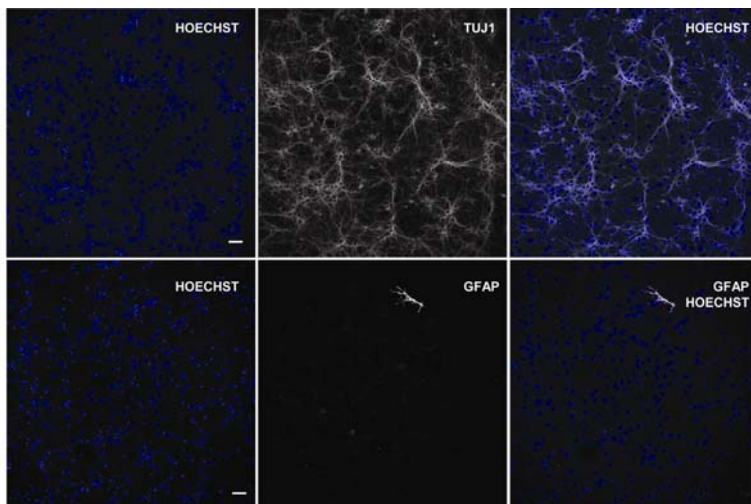
En determinadas patologías neurológicas se observa en las neuronas unas inclusiones formadas principalmente por polímeros de glucosa poco ramificados que podrían ser consideradas glucógeno aberrante. El caso más evidente es la enfermedad de Lafora, una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por la presencia de estos cuerpos en neuronas. Dado que la GS es el único enzima capaz de sintetizar polímeros de glucosa en mamíferos, cadenas de glucosa deben tener su origen en una alteración del metabolismo del glucógeno. Esto sugiere que las neuronas tendrían un metabolismo de glucógeno basal y que su desregulación y sobreacumulación pondría a la célula en peligro.

Para esclarecer el enigma del metabolismo de glucógeno en neuronas, era necesaria su caracterización en condiciones basales, que se convirtió en el objetivo del primer capítulo de esta tesis.

## 1.2 Cultivo primario de neuronas como modelo neuronal

Uno de los tipos celulares más abundantes en el cerebro son los astrocitos, cuya capacidad para acumular glucógeno ha sido ampliamente descrita (Brown 2004). Por tanto, para evitar que este glucógeno astrocítico enmascarara la presencia de glucógeno en las neuronas, se decidió utilizar como modelo de estudio los cultivos primarios de neuronas obtenidas a partir de embriones de ratón. Este modelo es ampliamente utilizado para estudiar procesos específicamente en neuronas y fue en el que primero se consiguió detectar la expresión neuronal de GS.

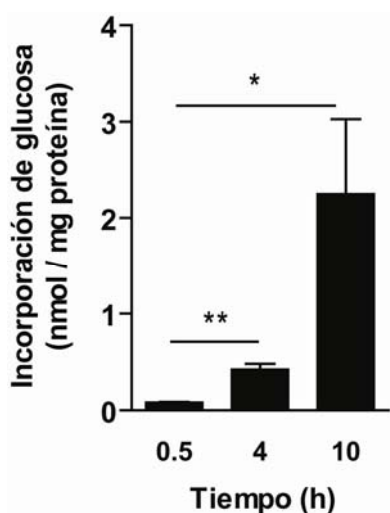
Los cultivos de neuronas fueron tratados con una combinación de antimitóticos (uridina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y 5-fluoro-2'-desoxiuridina (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) durante 96 horas, que elimina específicamente células que están proliferando, en este caso la neuroglía. Tras este período se analizó su pureza en neuronas y contaminación por neuroglia por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos que reconocen la isoforma  $\beta$ -III de tubulina (TUJ1) y la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), marcadores específicos de neuronas y astrocitos, respectivamente (**Fig.1**). Bajo estas condiciones, estos cultivos mostraban una ausencia casi total de astrocitos, con lo que podíamos afirmar que los efectos observados en nuestro estudio tenían un origen exclusivamente neuronal. Todos los experimentos con cultivos primarios de neuronas detallados en esta tesis se realizaron tras 96h de tratamiento con antimitóticos.



**Fig.1 Generación de cultivos primarios de neuronas.** Los cultivos de neuronas fueron tratados durante 96 horas con antimitóticos y la contaminación de la glía fue analizada por inmunofluorescencia con anticuerpos contra TUJ1 (marcador de neuronas), GFAP (marcador de astrocitos) y Hoechst 3342 (marcador de núcleos). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con objetivo 40x. La escala representa 40 $\mu\text{m}$ .

### 1.3 Estudio de la síntesis de glucógeno

El primer paso en nuestro estudio fue analizar si la maquinaria de síntesis de glucógeno estaba activa en condiciones basales. Para ello, las neuronas fueron incubadas en un medio con 25 mM de glucosa que contenía 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  glucosa durante distintas horas. A continuación, se aisló selectivamente el glucógeno y se determinó la cantidad de radioactividad incorporada al polisacárido (**Fig.2**). Los resultados muestran que se estaba incorporando activamente glucosa a glucógeno, proceso dependiente del tiempo de incubación. Por tanto, podíamos concluir que, efectivamente, las neuronas sintetizaban glucógeno en condiciones basales.



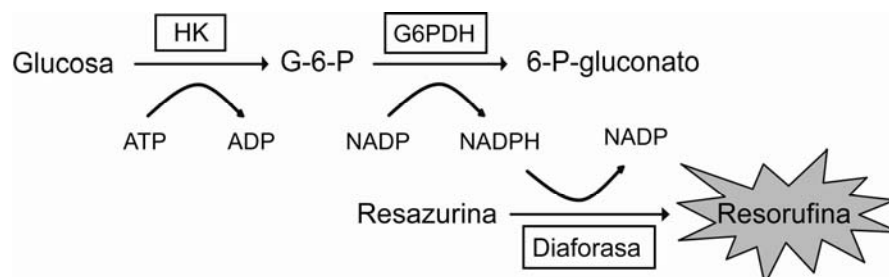
**Fig.2 Análisis de la síntesis de glucógeno en neuronas.** Determinación de la tasa de incorporación de glucosa a glucógeno en condiciones basales. Los valores están expresados en nmol de glucosa incorporada por mg de proteína y constituyen la media  $\pm$  s.e.m. de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con \*  $P < 0.05$  o \*\*  $P < 0.01$ .

### 1.4 Método fluorescente para la determinación de glucógeno

Para determinar la concentración de glucógeno en neuronas fue necesario desarrollar un método analítico con una mayor sensibilidad a los métodos tradicionales, adecuados sólo para tejidos con grandes cantidades de glucógeno, como hígado o músculo.

Se desarrolló un método basado en la determinación por fluorescencia de G-6-P, descrita en (Zhu, Romero et al. 2009). En nuestro método medíamos la concentración de glucosa resultante de la hidrólisis del glucógeno por acción de la amiloglucosidasa (**Fig.3**). La glucosa era convertida en G-6-P por la acción de la hexoquinasa y la G-6-P reaccionaba, a su vez, con NADP dando lugar a 6-fosfogluconato y NADPH. La concentración de NADPH era determinada mediante la reacción

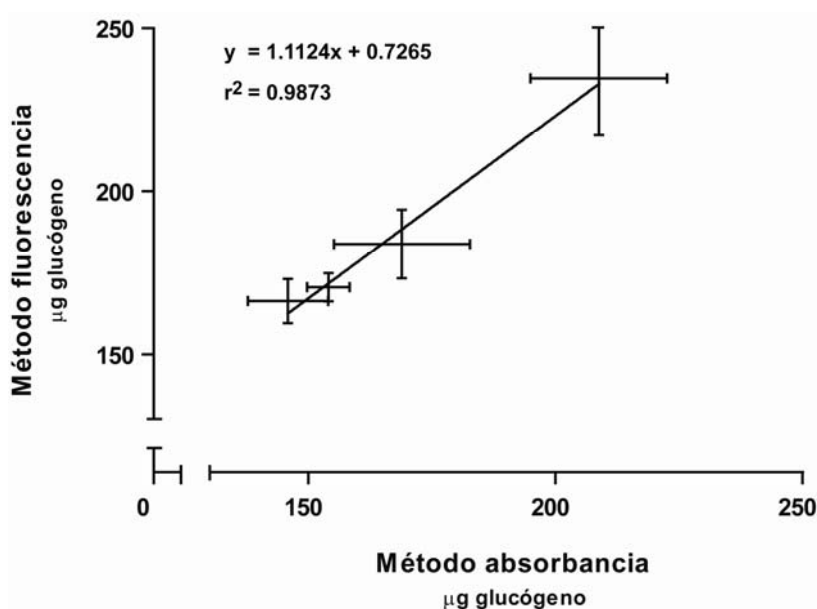
de la diaforasa, que cataliza la conversión de la resazurina a resorufina, un fluoróforo con absorción a 530 nm y emisión a 590 nm. En el ensayo se realizaba una curva patrón de glucosa que cubría el rango 0- 300 µg/ dl (correspondiente a 0- 0.811 µg de glucógeno de partida).



**Fig.3 Reacciones acopladas en el método fluorescente de determinación de la cantidad de glucógeno.**

HK: Hexoquinasa, G6PDH: G-6-P deshidrogenasa, G-6-P: glucosa-6-fosfato, 6-P-gluconato: 6-fosfogluconato.

Para validar el ensayo se midió la concentración de glucógeno en células que acumulaban cantidades crecientes de polisacárido tanto por el método tradicional como por el nuevo método fluorescente. La representación de los resultados obtenidos con ambos métodos muestra una buena correlación, validando así el nuevo método (**Fig.4**).



**Fig.4 Correlación entre el método de absorbancia y el de fluorescencia.** Determinación de cantidades crecientes de glucógeno por ambos métodos. Los datos están representados como la media  $\pm$  s.e.m. de 3 muestras independientes.

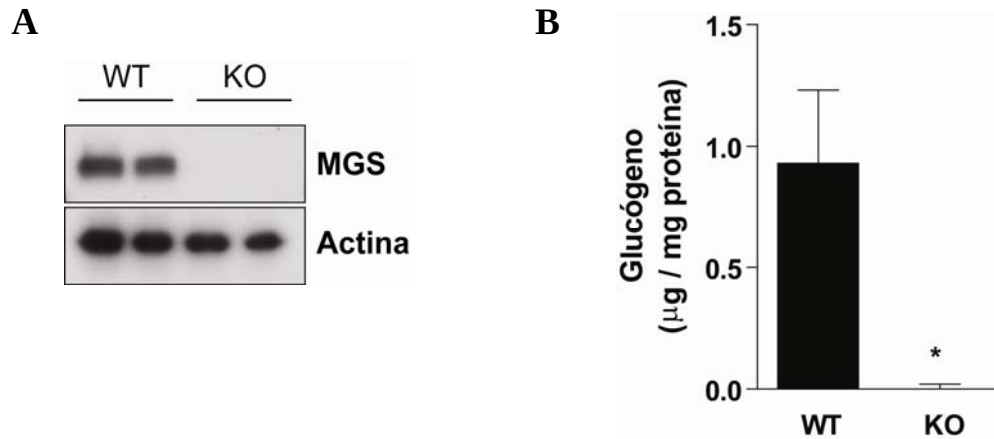
No obstante, la comparación entre ambos métodos se determinó en un rango de cantidades de glucógeno mucho mayor al utilizado con el nuevo método. Por tanto, esta medida podía comparar ambos métodos, pero no daba una estimación de la eficiencia del protocolo nuevo de determinación de glucógeno. Para ello se precipitaron cantidades conocidas de glucógeno (en el rango de 0-0.8  $\mu\text{g}$ , correspondiente al rango utilizado en la curva patrón) y se midió su concentración (**Fig.5**). En los resultados observamos que al trabajar con cantidades bajas de polisacárido, el error cometido en la determinación era notablemente mayor que partiendo de grandes cantidades iniciales. Esto se debe, probablemente, a que la insolubilidad del glucógeno en etanol frío no es del 100%, por lo que el porcentaje soluble deja de ser menospreciable al trabajar con cantidades tan bajas de glucógeno. Cabe destacar que este error se debería por tanto no a la técnica de medición en sí, sino al paso previo de precipitación de glucógeno, que es común en las técnicas clásicas.

| Valor teórico<br>( $\mu\text{g}$ glucógeno) | Valor medido<br>( $\mu\text{g}$ glucógeno $\pm$ s.e.m) | Error cometido |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------|
| 16.1                                        | 15.7 $\pm$ 0.8                                         | 2.4 %          |
| 0.538                                       | 0.430 $\pm$ 0.027                                      | 20.1 %         |
| 0.366                                       | 0.303 $\pm$ 0.020                                      | 17.4 %         |
| 0.215                                       | 0.166 $\pm$ 0.010                                      | 22.8 %         |

**Fig. 5 Estimación del error en la determinación de glucógeno.** Se representan las medidas de glucógeno obtenidas precipitando cantidades iniciales conocidas. Los valores medidos representan la media de 8-20 medidas independientes.

Finalmente, para valorar la especificidad del nuevo método, esto es, para determinar si los valores obtenidos correspondían verdaderamente a glucógeno, se establecieron cultivos primarios de neuronas obtenidos a partir de embriones de ratón que carecen de la expresión de la GS específicamente en cerebro (KO). Al analizar los niveles de GS por *western blot* en extractos de los cultivos, se confirmó que la GS estaba completamente ausente en estas neuronas (**Fig.6A**). La medición detectó un nivel de glucógeno en las neuronas salvajes (WT) que estaba ausente en las

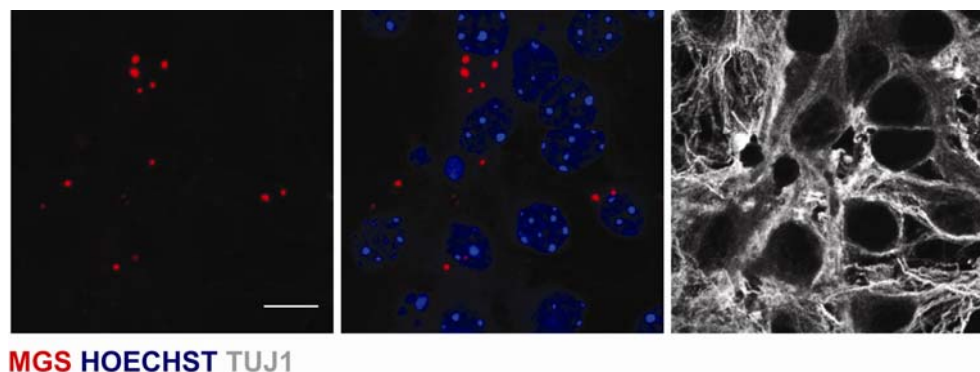
KO (**Fig.6B**). Esto validaba la especificidad de nuestro método y constituía una evidencia irrefutable de que las neuronas acumulaban glucógeno.



**Fig.6 Detección de glucógeno en neuronas WT y KO de GS. (A)** Análisis por western blot de la isoforma muscular de GS (MGS) en extractos totales de neuronas WT o KO (40 μg de proteína por carril). La detección de actina se utilizó como control de carga. **(B)** Contenido de glucógeno en neuronas WT o KO para la GS. Los valores están expresados como μg de glucógeno por mg de proteína y representan la media ± s.e.m. de las neuronas generadas a partir de 6-9 embriones diferentes. \* $P < 0.05$ .

### 1.5 Localización de la GS en neuronas

Hasta el presente no se ha conseguido localizar la GS endógena en neuronas, probablemente debido a sus bajos niveles. Para sobrepasar el problema de la sensibilidad en la detección del enzima, se desarrolló un protocolo de inmunofluorescencia con un paso adicional de amplificación, basado en la tiramida (“Tyramide Signal Amplification”, PerkinElmer). Esta tecnología permite la detección de antígenos cuya expresión es muy baja, como es el caso de la GS en neuronas. En condiciones basales la GS se encontraba en el soma y dendritas de las neuronas, agrupada en puntos discretos (**Fig.7**). Esta distribución es característica de la GS bajo condiciones de síntesis activa de glucógeno, ya que la GS se localiza sobre los gránulos de glucógeno (Shimizu and Okada 1957; Garcia-Rocha, Roca et al. 2001), lo que reforzaba los datos obtenidos en los anteriores apartados y confirmaba que las neuronas sintetizan glucógeno en condiciones basales.



**Fig.7 Análisis por inmunofluorescencia de la localización intracelular de GS en neuronas.** Las neuronas fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, y se analizó la presencia de GS con un anticuerpo que reconoce la forma muscular (MGS), y utilizando TUJ1 como marcador neuronal. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal con objetivo 63x, con una magnificación adicional de 3x. La escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

## 1.6 Discusión

El glucógeno cerebral se ha relacionado tradicionalmente con los astrocitos. Existe cierta controversia en los datos publicados acerca de la presencia de este polisacárido en neuronas, a pesar de que está aceptado que éstas expresan GS (Inoue, Matsukado et al. 1988; Pellegrí, Rossier et al. 1996). La disparidad en los datos publicados puede ser debida a múltiples causas. En primer lugar, en estudios que se han llevado a cabo con muestras de cerebros, la anoxia que sigue al sacrificio del animal activa la maquinaria de degradación de glucógeno (Lowry, Passonneau et al. 1964; Guth and Dempsey 1970), con lo que los valores e informaciones que se obtienen a partir de dichos estudios deben de ser analizados con cautela, ya que no siempre representan la situación *in vivo*. El procedimiento elegido para el sacrificio, así como la manipulación de la muestra son claves para la preservación de las reservas de glucógeno, cosa que podría explicar las diferencias en las conclusiones de los distintos trabajos publicados (Cammermeyer and Fenton 1981). En nuestro caso, para tener un mayor control sobre las influencias ambientales que condicionan nuestro estudio, se decidió trabajar con cultivos primarios de neuronas. Además, este modelo permitió el estudio del metabolismo de glucógeno específicamente en neuronas, ya que los cultivos carecían de astrocitos. La complejidad de la arquitectura de las células que componen el sistema nervioso central hace difícil poder localizar indiscutiblemente el glucógeno en un tipo

celular en concreto cuando se trabaja en cortes. Por ello, trabajar con cultivos puros neuronales supone una ventaja a la hora de sacar conclusiones respecto a la precedencia celular de los efectos observados. Esto es especialmente importante en el caso de astrocitos, que poseen un metabolismo activo de glucógeno que enmascararía los resultados obtenidos en neuronas.

Otro motivo que podría condicionar los resultados obtenidos es la sensibilidad de las técnicas empleadas. Para analizar la síntesis de glucógeno en condiciones basales utilizamos un procedimiento basado en radioactividad, que constituye una técnica con alta sensibilidad. Una vez confirmado que las neuronas sintetizaban glucógeno, fue necesario desarrollar un nuevo método de cuantificación de glucógeno para poder obtener valores fiables. Este método estaba basado en la detección de la formación del producto final por métodos de fluorescencia en vez de por absorbancia, permitiendo la detección de cantidades 50 veces menores de glucógeno que el método estándar. Además, disponer de cultivos primarios de neuronas KO para la GS fue fundamental a la hora de validar los resultados. La comparación entre los valores de glucógeno de ambos tipos celulares, permitió demostrar inequívocamente que las neuronas efectivamente tenían una reserva de glucógeno.

A pesar de haberse descrito su presencia, el estudio de la localización intracelular de la GS en la neurona no había sido abarcado. Hasta la fecha los estudios se habían centrado en examinar la localización de GS en condiciones de sobre-expresión, probablemente debido a la dificultad de detectar los niveles endógenos de proteína por inmunofluorescencia. Para evitar este problema, se utilizó un método de inmunofluorescencia que contenía un paso de amplificación de señal, ideado para la detección de antígenos de baja concentración. De esta manera se pudo detectar la GS endógena en neuronas. La distribución que mostraba el enzima era citoplasmática y, además, en una forma punteada, distribución característica de GS que sintetiza glucógeno y que está unida al mismo (Shimizu and Okada 1957; Garcia-Rocha, Roca et al. 2001). Esto reforzaba los resultados previos de la presencia de una reserva de glucógeno.

En conclusión, los resultados de este capítulo muestran que las neuronas tienen una reserva de glucógeno en condiciones basales, y presentan una distribución de la GS acorde con ello. El siguiente paso era estudiar si este glucógeno constituía una reserva funcional y podía, por consiguiente, ser degradado en situaciones glucogenolíticas.

## **RESULTADOS: CAPÍTULO 2**

### **EFFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO**

#### **2.1 Introducción**

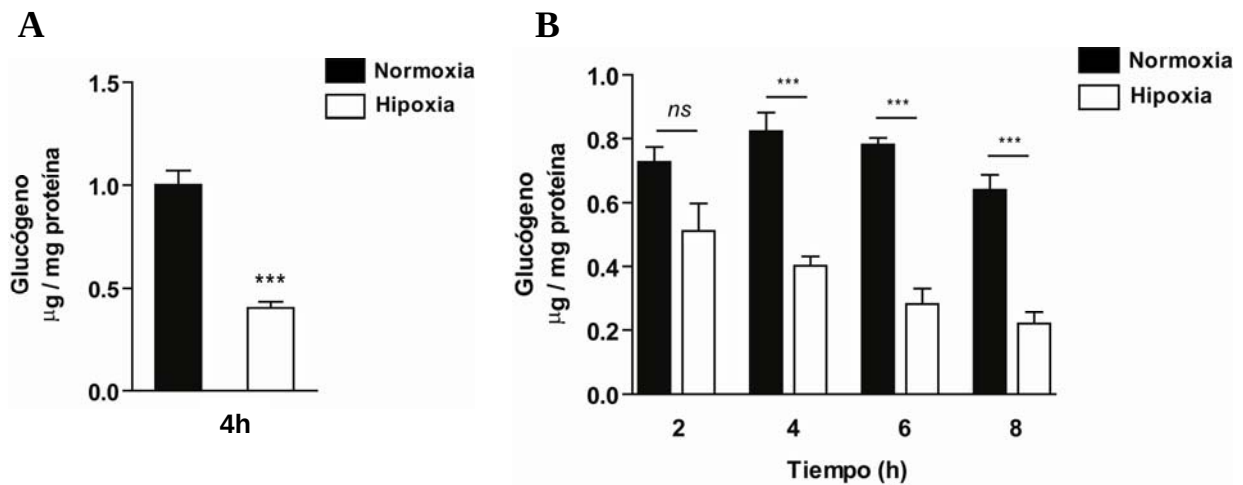
Los resultados descritos en el capítulo anterior muestran que las neuronas acumulan glucógeno en condiciones basales. El siguiente paso consistió en analizar la capacidad de las neuronas de degradación de glucógeno. Para ello se estudió el efecto de una situación glucogenolítica sobre las reservas de glucógeno neuronales. Concretamente, se trabajó en condiciones de bajo oxígeno (también denominada situación de hipoxia), en donde las reservas de glucógeno cerebrales son movilizadas (Swanson, Sagar et al. 1989; Harik, Lust et al. 1995).

La principal vía de degradación de glucógeno es por medio de la Glucógeno Fosforilasa (GP). La presencia de este enzima en neuronas también ha sido motivo de controversia y se acepta que las neuronas no lo expresan. El glucógeno también puede ser degradado en el lisosoma, a través de la acción del enzima  $\alpha$ - glucosidasa ácida. Este enzima se encuentra ausente en los pacientes de la enfermedad de Pompe (OMIM232300), y cuyas neuronas muestran acumulaciones de glucógeno en los lisosomas. Esto sugiere de nuevo que las neuronas tendrían una reserva de glucógeno en condiciones normales. Además, esta vía de degradación se llevaría a cabo normalmente (Sidman, Taksir et al. 2008). Finalmente, estudios llevados a cabo principalmente en hígado describen que el glucógeno es degradado durante períodos prolongados de ayuno o en condiciones de hipoxia vía autofagia (Kotoulas, Kalamidas et al. 2004). Una posibilidad sería, por tanto, que la autofagia de moléculas de glucógeno tuviera lugar también en la neurona.

Nuestro siguiente objetivo era caracterizar la capacidad de degradación de glucógeno en la neurona, así como las vías implicadas y su regulación en condiciones de hipoxia.

## 2.2 Niveles endógenos de glucógeno

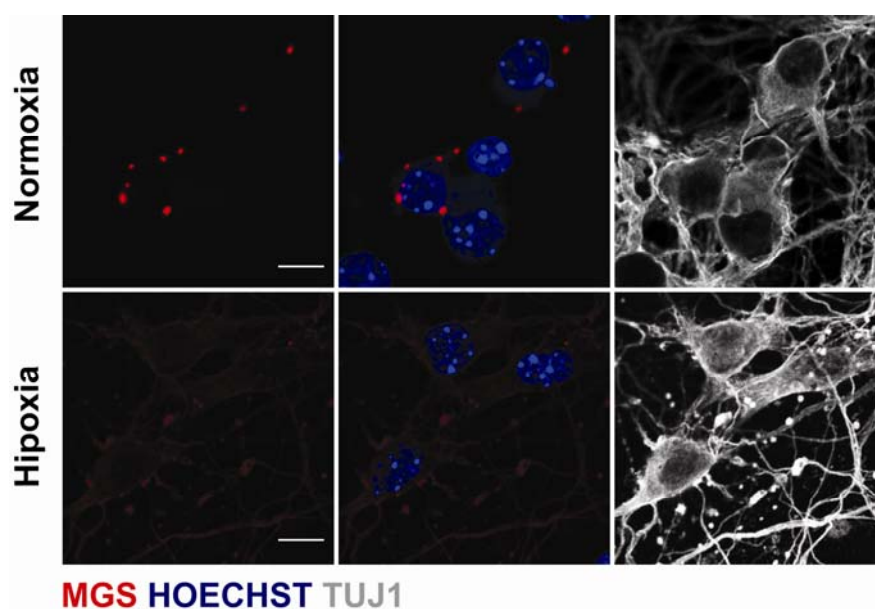
Las neuronas fueron expuestas a cuatro horas a hipoxia, (1% O<sub>2</sub>), fueron congeladas rápidamente y se determinó la cantidad de glucógeno (**Fig.1A**). Pudimos comprobar que el glucógeno era movilizado en condiciones de hipoxia. Esta era la primera vez que se observaba una capacidad de degradación del glucógeno de la neurona. Los resultados mostraban que la degradación no era completa, por lo que se realizó un seguimiento de los niveles de glucógeno frente a diferentes exposiciones de hipoxia (**Fig.1B**). A pesar de observarse una degradación mayor cuanto mayor era el tiempo de exposición a la hipoxia, no se conseguía llegar a deplecionar por completo la reserva de glucógeno.



**Fig 1. Contenido de glucógeno de neuronas expuestas a condiciones de 1% O<sub>2</sub>.** Contenido de glucógeno en neuronas expuestas a (A) 4h o (B) tiempos crecientes de hipoxia. Los valores están representados como µg de glucógeno por mg de proteína y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4-7 experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.001$ .

### 2.3 Redistribución de la GS en hipoxia

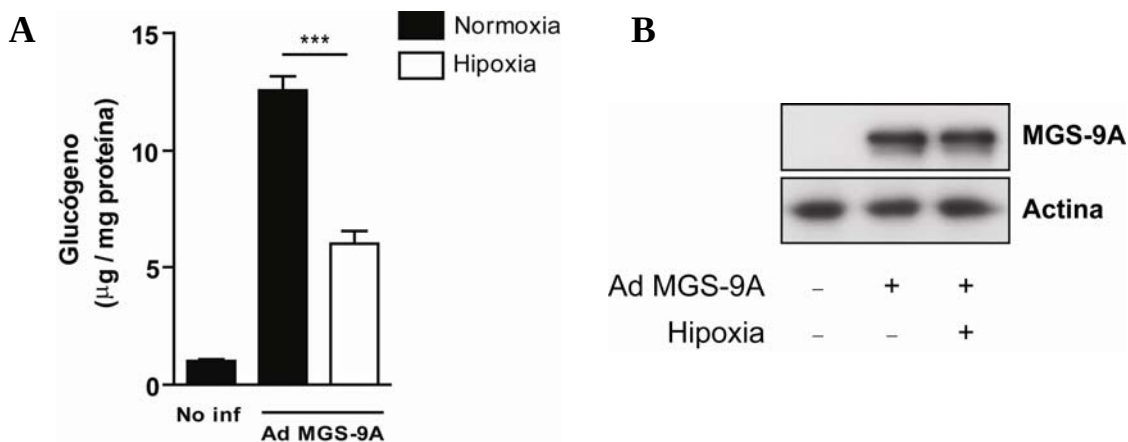
A continuación se estudió la localización intracelular de la GS bajo condiciones de hipoxia. Para ello, se cultivaron las neuronas en cubreobjetos, se expusieron a hipoxia durante 4 horas y se analizó la presencia de GS (**Fig 2**). Como se había visto en el anterior capítulo, en normoxia la GS mostraba un patrón punteado. En cambio, en hipoxia el enzima ya no era claramente localizable, y la señal que se detectaba era difusa. Este cambio en la distribución de la GS era consecuencia de la degradación de glucógeno observada, como se había descrito para otros tipos celulares, en donde la GS cambiaba su distribución en función de las cantidades de glucógeno presentes en la célula (Garcia-Rocha, Roca et al. 2001; Cid, Cifuentes et al. 2005).



**Fig.2** Análisis por inmunofluorescencia de la localización intracelular de GS en neuronas control (normoxia) y en hipoxia. Las neuronas fueron expuestas 4h a hipoxia, fijadas con paraformaldehído al 4%, y se analizó la presencia de la GS con un anticuerpo que reconoce la forma muscular (MGS), y utilizando TUJ1 como marcador neuronal. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal con objetivo 63x, con una magnificación adicional de 3x. La escala representa 10  $\mu$ m.

## 2.4 Niveles de glucógeno y GS en neuronas que sobre-expresan una forma activa de la GS (MGS-9A)

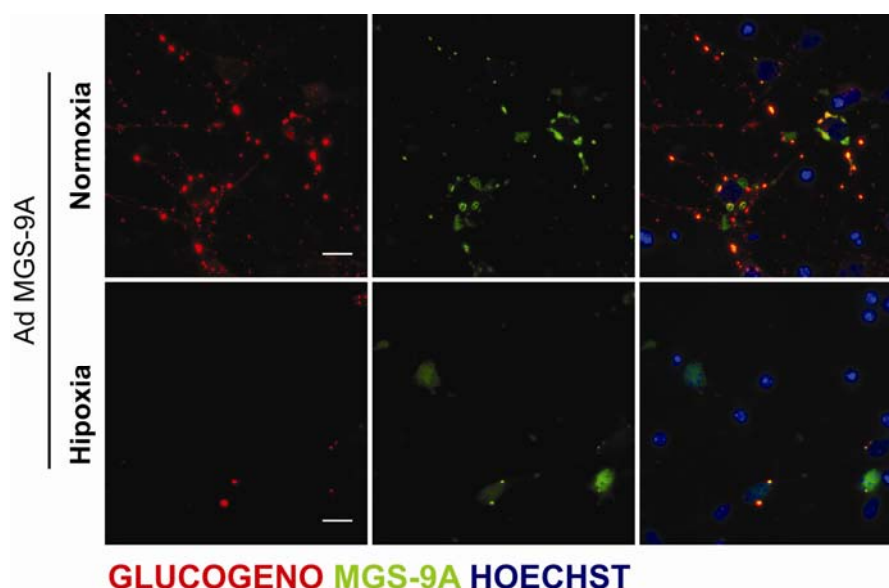
Para analizar la magnitud de la capacidad de degradación, decidimos trabajar con neuronas forzadas a acumular glucógeno. El aumento de glucógeno se obtuvo mediante la sobre-expresión de una forma activa de la isoforma muscular humana de la GS (MGS-9A). Este mutante de la GS tiene los nueve residuos de serina fosforilables mutados a alanina, de forma que escapa la regulación por fosforilación (Cid, Cifuentes et al. 2005). Las neuronas fueron infectadas con adenovirus recombinantes que codificaban para la MGS-9A fusionada a GFP por 36 horas. Durante este tiempo las neuronas acumulaban niveles de glucógeno muy superiores a los de las neuronas no infectadas (**Fig.3A**). Tras este período las células fueron expuestas a hipoxia y se determinó el contenido de glucógeno. Se observó una disminución en los niveles del polisacárido (**Fig.3A**), demostrando una fuerte capacidad de degradación por parte de la neurona. Para descartar que la bajada de glucógeno fuera debida a una degradación de MGS-9A, se analizaron los niveles de la MGS-9A por *western blot*. No se vio ningún cambio en la cantidad de enzima sobre-expresada (**Fig.3B**).



**Fig.3 Contenido de glucógeno y GS en neuronas que sobre-expresan el mutante constitutivamente activo de la GS MGS-9A. (A)** Niveles de glucógeno en neuronas que sobre-expresan MGS-9A por infección con adenovirus tras una exposición de 4h de hipoxia. No inf = control de células no infectadas con el adenovirus. Los valores están expresados en µg de glucógeno por mg de proteína y constituyen la media  $\pm$  s.e.m de 5 experimentos independientes. \*\*\*  $P < 0.001$ . **(B)** Niveles de MGS-9A en neuronas que sobre-expresan esta proteína y expuestas 4h a hipoxia. La GS en el extracto neuronal control sin infección no aparece debido al mayor peso molecular de la MGS-9A por su fusión con la GFP.

## 2.5 Localización de la MGS-9A y su redistribución en hipoxia

Como ya hemos comentado, la localización intracelular de los enzimas del metabolismo de glucógeno es dependiente de la presencia de glucógeno en la célula. Ya que habíamos visto una degradación del glucógeno acumulado por la sobre-expresión en neuronas de la MGS-9A, se analizó la distribución del enzima en condiciones control y en hipoxia, paralelamente a la detección de glucógeno utilizando un anticuerpo específico para el polisacárido (**Fig.4**). Para la visualización de la MGS-9A no fue necesario el uso de un anticuerpo, ya que el enzima está fusionado a la proteína fluorescente GFP. En condiciones control, el enzima mostraba el patrón punteado característico de la GS sintetizando glucógeno. En cambio, en hipoxia la mayor parte del enzima cambiaba su distribución y se detectaba en el núcleo. Únicamente en las células que aún conservaban algún gránulo de glucógeno el enzima se encontraba en forma punteada en el citoplasma, colocalizando con el gránulo.



**Fig 4. Distribución de MGS-9A en normoxia e hipoxia.** Inmunofluorescencia de neuronas infectadas con adenovirus que codifican para MGS-9A y expuestas a 4h hipoxia. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, y detectadas contra glucógeno con un anticuerpo que reconoce específicamente el polímero. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 40x. La escala representa 20  $\mu$ m.

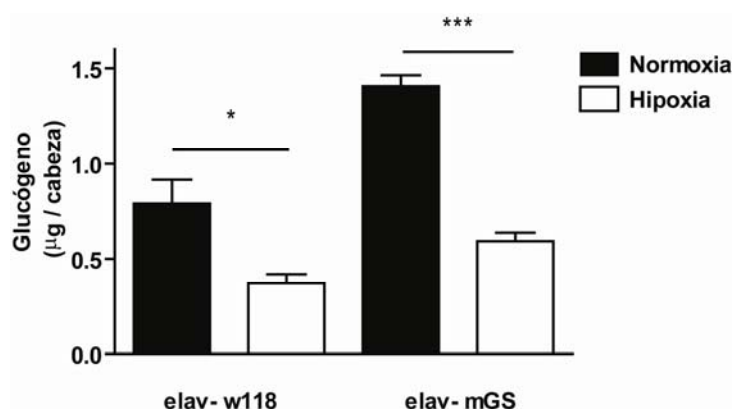
## 2.6 Capacidad de degradación de glucógeno en neuronas de *Drosophila melanogaster*

Una vez analizada la capacidad de degradación de glucógeno en cultivos primarios de neuronas, se quiso corroborar el efecto validando los datos en un modelo *in vivo*, es decir, en un animal. Para ello se empleó el modelo *Drosophila melanogaster*, la mosca del vinagre, un modelo ampliamente utilizado por las posibilidades que ofrece a nivel genético.

Utilizamos unas moscas que sobre-expresan la isoforma muscular humana de la GS (mGS) específicamente en neuronas (elav-mGS), basado en el sistema GAL4/UAS (Duran, Tevy et al. 2012). Esta línea acumulaba cantidades notables de glucógeno en neuronas y permitía, por consiguiente, el estudio de su degradación exclusivamente en estas células.

Las moscas elav-mGS fueron introducidas en un tubo con una malla que permitía el intercambio de gases y expuestas a 1 hora de hipoxia a 0.6% de O<sub>2</sub>. Tras la incubación fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y se midieron los niveles de glucógeno a partir de cabezas aisladas. Como control del experimento se utilizó una línea del mismo fondo genético que expresaba el factor de transcripción GAL4 en neuronas, pero que no contenía ninguna secuencia UAS y no sobre-expresaba, por tanto, ningún gen (elav-w118).

La determinación de glucógeno en las cabezas mostraba que la línea elav-mGS tenía, en efecto, cantidades mayores de glucógeno que las moscas control. Debido a la especificidad en la sobre-expresión de la mGS, este incremento se podía atribuir exclusivamente a neuronas (**Fig.5**). La disminución en los niveles de glucógeno en las moscas control en hipoxia indicaba que en este modelo las reservas de glucógeno cerebrales también eran movilizadas en respuesta a la hipoxia, como se ha descrito en *Drosophila* bajo condiciones de bajo oxígeno (Wegener 1988). No obstante, al trabajar con cabezas enteras no podíamos saber con certeza en qué tipo celular se estaba llevando a cabo esta degradación. Parte de la bajada en los niveles de glucógeno en línea elav-mGS tras la hipoxia, sin embargo, sí que podía ser atribuida a neuronas, ya que la sobre-acumulación de glucógeno en esta línea ocurre solamente en este tipo de células. Esta constituía, por tanto, la primera evidencia *in vivo* de la capacidad de degradación de glucógeno en las neuronas.



**Fig.5 Degradación de glucógeno en hipoxia en *Drosophila melanogaster*.** Niveles de glucógeno tras 1h de hipoxia en una línea control (elav- w118) y una línea que sobre-expresa mGS y acumula, por tanto, glucógeno únicamente en neuronas. Los valores están representados como µg de glucógeno por cabeza y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 6 experimentos independientes de 3 cruces independientes. \* $P < 0.05$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

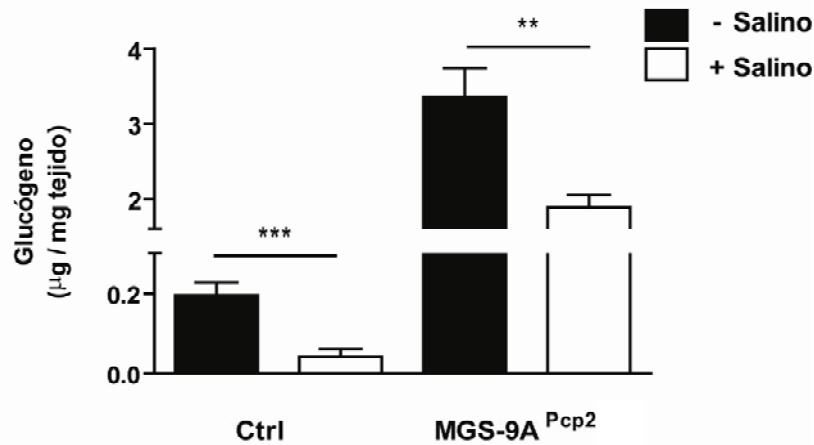
## 2.7 Capacidad de degradación de glucógeno en neuronas de ratón

Los experimentos realizados en la mosca del vinagre constituían una prueba de que *in vivo* las neuronas también poseían la capacidad de degradar glucógeno. Sin embargo, se quiso corroborar esta capacidad en un modelo de mamífero y se utilizó para ello ratones modificados genéticamente, que sobre-expresaban la MGS-9A específicamente en neuronas de Purkinje (MGS- 9A<sup>Pcp2</sup>) (Duran, Tevy et al. 2012).

Estos animales están basados en la tecnología Cre/loxP, análoga a la tecnología basada en la recombinasa Cre permite la manipulación génica en un tejido determinado, de forma equivalente al sistema Gal4-UAS en la *Drosophila*. Esta tecnología requiere de dos componentes: la recombinasa Cre, un enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios loxP, y la secuencia loxP, donde se da la recombinación. A su vez, la expresión de la recombinasa Cre puede ser regulada y estar bajo un promotor específico de tejido. El *cassette* de sobre-expresión contiene un

“stop” transcripcional flanqueado por loxP, con lo que se obtienen ratones que sobre-expresan un gen en un determinado tejido.

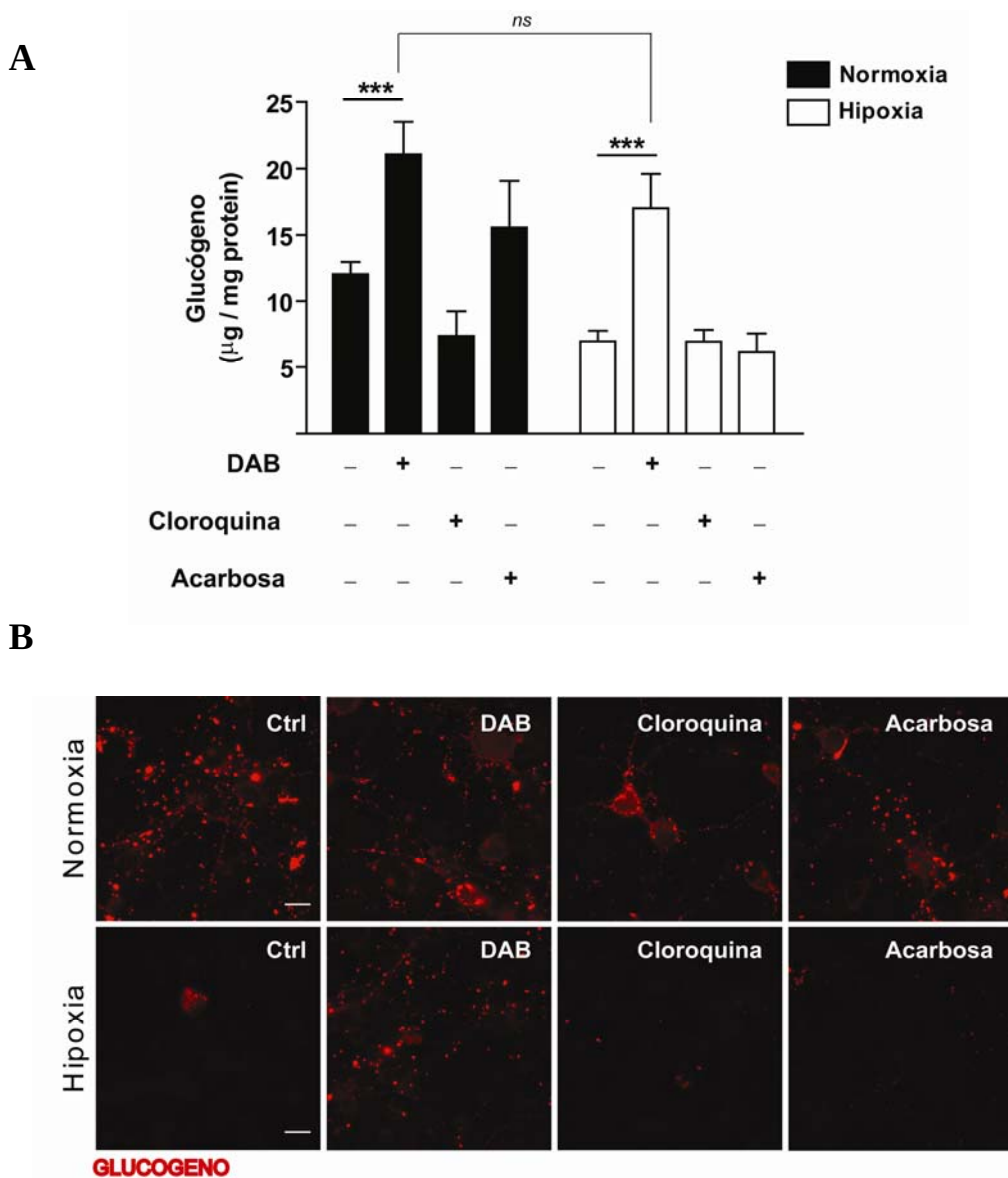
Los animales MGS- 9A<sup>Pcp2</sup> fueron utilizados para el análisis de la capacidad de las neuronas de degradación del glucógeno. Para ello se midieron los niveles de glucógeno en el cerebelo tras una situación glucogenolítica. Como es sabido que la anoxia que acompaña el estado post-mortem causa la movilización de las reservas de glucógeno cerebrales, se trabajó en una situación de anoxia post-mortem alargada. Para ello, después de anestesiarse, se perfundió intracardiamente los animales con una solución de salino, se esperó cinco minutos y se determinaron los niveles de glucógeno en cerebelo diseccionado (**Fig.6**). Como control se utilizaron animales hermanos que no contenían la recombinasa Cre y no expresaban, por tanto, el transgen. La movilización casi completa de las reservas de glucógeno en los animales control confirmó que se trataba de una situación altamente glucogenolítica. De nuevo, no podía establecerse la procedencia celular de la degradación, ya que se trabajó con cerebelo completo. Sin embargo, en los MGS-9A<sup>Pcp2</sup>, cuyas neuronas de Purkinje acumulaban 15 veces más glucógeno que los controles, se degradaba un 40% del glucógeno. Por tanto, parte de este glucógeno estaba siendo degradado en neuronas. Ambos modelos de animales confirmaban la capacidad de degradación y validaba el cultivo primario de neuronas como modelo de estudio.



**Fig.6 Degradación de glucógeno en el ratón.** Niveles de glucógeno tras la administración de una solución salina en animales control (Ctrl) y animales que sobre-expresan MGS-9A únicamente en neuronas de Purkinje (MGS- 9A<sup>Pcp2</sup>). Los valores están representados como µg de glucógeno por mg de tejido y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 8-10 animales \*\* $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

## 2.8 Análisis del mecanismo de degradación de glucógeno

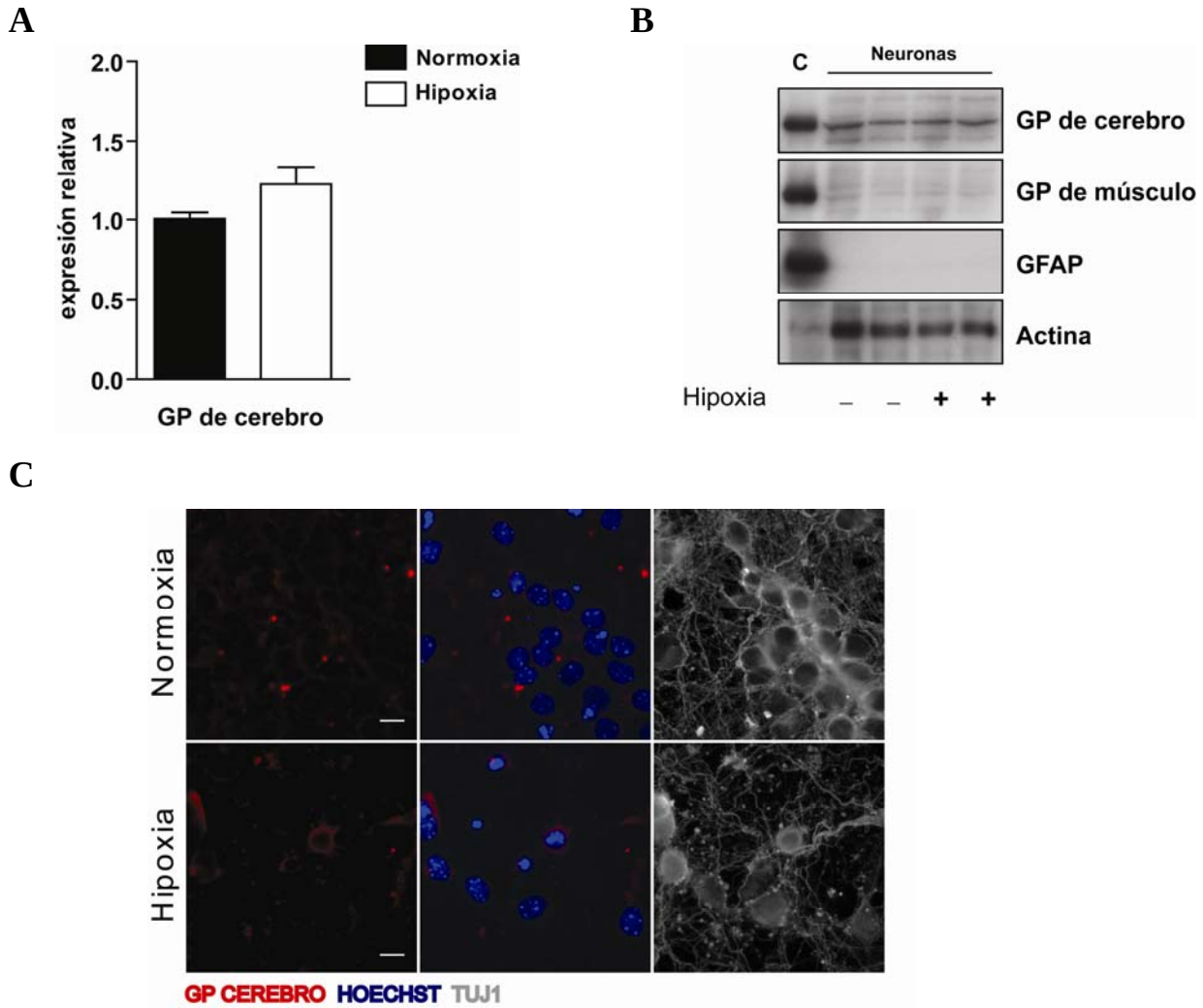
Tras observar la capacidad de degradación de glucógeno que poseían las neuronas, procedimos a caracterizar el mecanismo de degradación. Para ello utilizamos neuronas que sobre-expresaban la MGS-9A (bajo las mismas condiciones que se especifican en el **Apartado 2.4** y se incubaron bajo condiciones de hipoxia en presencia de inhibidores de las vías de degradación del glucógeno: DAB, inhibidor específico de la GP (Andersen, Rassov et al. 1999), cloroquina, que bloquea la autofagia inhibiendo la fusión entre lisosomas y autofagosomas (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005) y acarbosa, que inhibe la  $\alpha$ - glucosidasa ácida (Schmidt, Frommer et al. 1977) (**Fig.7A**). Se determinó la cantidad de glucógeno en normoxia e hipoxia. Únicamente con la incubación con DAB se conseguía revertir la degradación de glucógeno en hipoxia, indicando que la GP era la responsable de la degradación de glucógeno en condiciones de bajo oxígeno. Sorprendentemente, en condiciones control, la cantidad de glucógeno aumentaba significativamente cuando la GP era inhibida, indicando que la célula intenta regular la cantidad de glucógeno que acumula. Otro dato inesperado constituía la degradación parcial del glucógeno cuando se bloqueaba la autofagia. Se obtuvieron resultados equivalentes cuando se detectaron los niveles de glucógeno por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para la molécula (**Fig 7B**). La degradación de glucógeno en hipoxia solo podía ser evitada inhibiendo selectivamente la GP. En conclusión, estos experimentos demostraban la presencia de GP en la neurona.



**Fig.7 Análisis de la vía de degradación de glucógeno en hipoxia.** Cantidad de glucógeno determinado (A) por métodos bioquímicos o (B) por inmunofluorescencia en neuronas que sobre-expresan MGS-9A y expuestas a hipoxia en presencia de inhibidores de GP (DAB, 0.1 mM), autofagia (Cloroquina, 10 µM) o  $\alpha$ -glucosidasa ácida (Acarbosa, 0.5mM). Los valores en A están expresados como µg de glucógeno por mg de proteína y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4 experimentos independientes. \*\*\*  $P < 0.001$ . La barra en B representa 20 µm.

## 2.9 Caracterización de las isoformas de GP presentes en neuronas

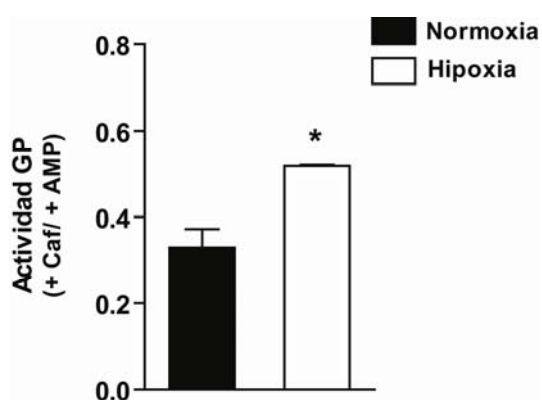
Los datos que están publicados respecto a la presencia de GP en neuronas están basados en la actividad del enzima y analizan la presencia del enzima indirectamente mediante la detección del glucógeno resultante de la incubación de los cortes de cerebro en una solución que favorece la síntesis del polisacárido. Por tanto, nada se ha descrito respecto a las isoformas de la GP que expresarían las neuronas. Por ello, el siguiente paso fue analizar qué isoenzima estaba presente en los cultivos mediante análisis del RNA mensajero por PCR cuantitativa y por *western blot* con anticuerpos específicos de la isoforma cerebral y muscular de la GP, ambas presentes en extractos cerebrales. Como ya se había detectado previamente en nuestro laboratorio únicamente la isoforma de cerebro era detectable por PCR cuantitativa (**Fig.8A**). En hipoxia no había cambios significativos en los niveles de RNA mensajero. Se corroboraron estos resultados por análisis de los niveles proteicos de cada isoforma de GP (**Fig.8B**). Se utilizó extracto de cerebro de ratón como control positivo para los anticuerpos y GFAP para descartar una posible contaminación astrocítica de los extractos de los que pudiera proceder la señal detectada de GP. Únicamente la isoforma de cerebro daba una señal específica, y los valores totales no cambiaban en hipoxia, acorde con lo obtenido con el RNA. A continuación se procedió a la detección de la localización intracelular de la GP en la neurona. Como en el caso de la GS, se utilizó un método de amplificación de señal basado en la tiramida para su detección. La señal obtenida en normoxia mostraba un patrón punteado, equivalente al obtenido con la GS, que estaba presente principalmente en el soma de las neuronas, aunque también en algunas dendritas (**Fig.8C**). Nuevamente la señal se volvía difusa y difícil de detectar en hipoxia, probablemente como consecuencia de la degradación de glucógeno.



**Fig.8 Detección de la isoforma de la GP en neuronas.** (A) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de RNA mensajero de la isoforma de cerebro de la GP en normoxia e hipoxia. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m de 4 experimentos independientes. (B) Análisis por western blot de los niveles de proteína de la isoforma de cerebro y de músculo de GP en neuronas expuestas a normoxia e hipoxia. GFAP se utilizó para descartar presencia astrocítica. C= Extracto de cerebro de ratón. Actina se utilizó como control de carga. (C) Immunofluorescencia de GP en cultivo primario de neuronas. Las neuronas fueron expuestas a 4h de hipoxia, fijadas con paraformaldehído al 4%, detectadas contra GP con un anticuerpo que reconoce la isoforma de cerebro y utilizando TUJ1 como marcador neuronal. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 3342. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con objetivo 40x. La barra representa 20  $\mu$ m.

## 2.10 Actividad GP en hipoxia

Para corroborar los resultados obtenidos que apuntaban a la GP como enzima responsable de la degradación del glucógeno en hipoxia, y ya que no fueron observados cambios en los niveles totales de proteína, se procedió a medir su actividad enzimática. La isoforma de cerebro es altamente sensible a la activación por AMP (Crerar, Karlsson et al. 1995) y la activación del enzima puede representarse, en el caso de dicho isoenzima, como una relación entre la actividad GP<sub>a</sub> (en presencia de cafeína) y la actividad GP<sub>c</sub> (en presencia de AMP). Al comparar la relación entre controles e hipoxia se vio, en efecto, un aumento en la actividad del enzima que explicaba la degradación del glucógeno en hipoxia (**Fig.9**).

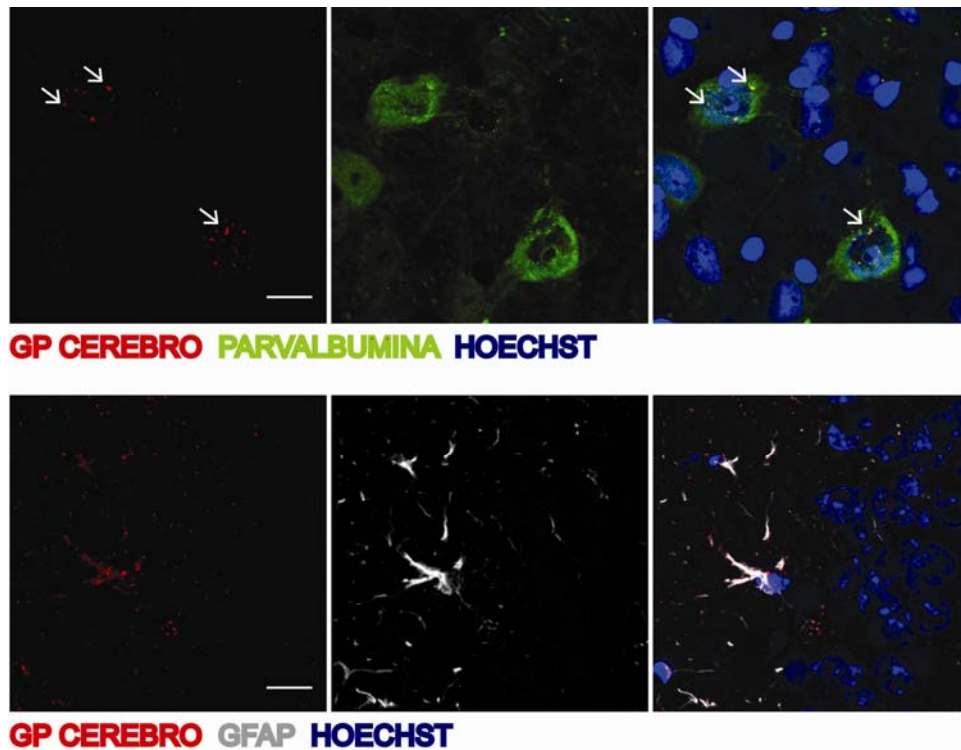


**Fig.9 Cuantificación de la actividad GP en hipoxia.** Relación de actividades GP<sub>a</sub>/GP<sub>c</sub> (+ Cafeína / + AMP) en hipoxia. Los valores representan la media  $\pm$  s.e.m. de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$ .

## 2.11 Localización neuronal de GP en cortes de cerebro de ratón

Una de las limitaciones de los cultivos primarios de neuronas es que se trata de un sistema *in vitro*, en donde las células son aisladas de su entorno nativo y cultivadas en ausencia del resto de células que componen el sistema nervioso central. Este hecho puede alterar la expresión génica de las células, y no se puede afirmar con total seguridad que las proteínas expresadas en este modelo son totalmente equivalentes a las expresadas en las neuronas del animal. Asimismo, las neuronas se obtienen a partir de tejido embrionario, por lo que el patrón de expresión génica también puede variar respecto al del adulto. Estas razones nos llevaron a analizar la presencia de la GP en neuronas de tejido adulto de ratón, mediante inmunofluorescencia en cortes de cerebro. Los cortes se obtuvieron a partir de ratones de 40 semanas, y se estudió la colocalización de la isoforma de cerebro de GP con un marcador neuronal. Debido a la amplitud de marcadores

neuronales disponibles, se centró el estudio en un tipo de interneuronas, caracterizadas por su expresión de la proteína parvalbúmina (PV+) y que constituyen uno de los tipos neuronales con mayor expresión de MGS (Valles-Ortega, Duran et al. 2011). Por tanto, cabe la posibilidad de que fueran las neuronas que presentarían un metabolismo activo de glucógeno, siendo buenas candidatas para la detección de GP. La localización de la GP en astrocitos fue utilizado como control positivo. Aunque en menor cantidad que en astrocitos, se pudo detectar GP en neuronas PV+, en un patrón punteado equivalente al detectado en cultivos de neuronas y que se encontraba principalmente en la región perinuclear de la neurona (**Fig.10**).



**Fig.10** *Detección por inmunofluorescencia de la GP en cerebro de ratón. Las muestras de tejido fueron obtenidas y procesadas según se detalla en el apartado de materiales y métodos, para hacer una inmunofluorescencia contra la isoforma de cerebro de la GP y marcadores específicos de interneuronas (Parvalbúmina) o astrocitos (GFAP). Las imágenes son representativas de cortes de hipocampo y córtex. La intensidad del láser fue ajustada para la detección de GP en astrocitos. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal con objetivo 63x con una magnificación adicional de 3.*

## **2.12 Discusión**

Tras determinar en el anterior capítulo la presencia de glucógeno en neuronas, este capítulo se centró en el estudio y caracterización de la maquinaria de degradación del polisacárido.

En primer lugar se analizó si el glucógeno constituía una reserva que podía ser degradada. Para ello se decidió exponer las neuronas a una condición de hipoxia. La hipoxia es una situación de alta demanda energética ya que la cadena electrónica se ve inhibida por la falta de oxígeno. El metabolismo de glucógeno también se ve regulado por la hipoxia y en el cerebro, las reservas de glucógeno son movilizadas (Swanson, Sagar et al. 1989; Harik, Lust et al. 1995). Efectivamente, el glucógeno en las neuronas era degradado parcialmente cuando las neuronas eran expuestas a 1% de oxígeno durante cuatro horas. Asimismo estos resultados mostraban, por primera vez, la capacidad de las neuronas para degradar el glucógeno. Esta característica no había sido demostrada hasta el momento y la hipótesis aceptada era que las neuronas carecían de la capacidad para movilizar el glucógeno, lo que las hacía especialmente vulnerables a su acumulación.

Una peculiaridad en los resultados obtenidos era la imposibilidad de degradar por completo las reservas de glucógeno, aún aumentando considerablemente el tiempo de exposición a hipoxia. Esta observación también se ha hecho en otras situaciones en astrocitos, como en la ausencia de glucosa (Subbarao and Hertz 1990; Brown, Tekkok et al. 2003) y podría ser consecuencia de una regulación dual de la degradación y síntesis de glucógeno. Bajo esta premisa, podría haber una síntesis paralela a la degradación de glucógeno, para asegurar que las reservas de glucógeno nunca lleguen a agotarse. Por otro lado, el proceso de degradación de glucógeno podría regularse de manera diferente según el tipo neuronal. Los cultivos se obtienen a partir del telencéfalo, que contiene muchos subtipos neuronales diferentes. Sin embargo, al determinar bioquímicamente el contenido de glucógeno trabajamos con homogenados totales, con lo que no es posible diferenciar entre distintos tipos de neuronas. Cada célula podría mostrar distinta sensibilidad a los estímulos de degradación de glucógeno y, por tanto, la movilización de la molécula de glucógeno entre distintas neuronas podría estar espacio-temporalmente separada.

Seguidamente se procedió a analizar la capacidad de degradación de glucógeno en neuronas que acumulaban grandes cantidades de glucógeno, mediante la sobre-expresión de MGS-9A, un mutante de la GS constitutivamente activo. Como quedaba patente en la detección de glucógeno

por inmunofluorescencia (**Fig.4**), 4 horas de hipoxia eran suficientes para degradar parte de la cantidad de glucógeno que se había acumulado durante 36 horas, demostrando una alta capacidad de degradación del glucógeno por parte de la neurona. Como consecuencia de la falta de glucógeno al cual unirse, en gran parte de las células la MGS-9A translocaba al núcleo, de manera equivalente a como lo hace en las células musculares en ausencia de glucosa (Cid, Cifuentes et al. 2005).

Para corroborar los resultados *in vivo*, se trabajó con dos modelos animales que acumulaban grandes cantidades de glucógeno específicamente en neuronas. El primer modelo que se utilizó fue la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. La línea transgénica utilizada fue establecida en nuestro laboratorio (Duran, Tevy et al. 2012), y acumulaba glucógeno específicamente en neuronas. La especificidad neuronal del transgén permitía resolver el problema de establecer en qué tipo celular se estaba llevando a cabo la degradación de glucógeno, al realizar las mediciones de glucógeno en cabezas enteras. Se observó que la hipoxia cursaba con una degradación de glucógeno, que en la línea mGS inequívocamente estaba sucediendo en parte en neuronas. En segundo lugar se trabajó con un ratón que acumulaba glucógeno específicamente en las neuronas de Purkinje (Duran, Tevy et al. 2012). Como la situación post-mortem activa la maquinaria glucogenolítica, se decidió analizar la cantidad de glucógeno cerebelar tras el sacrificio del animal. En esta situación también el glucógeno del animal MGS-9A<sup>Pcp2</sup> era parcialmente degradado, demostrando, por primera vez en mamíferos, la capacidad de degradación de glucógeno de la neurona. El hecho de que una parte importante de glucógeno permanezca sin degradar podría explicarse por la aparente estructura aberrante que adoptaría el glucógeno sintetizado por la MGS-9A con el tiempo. Datos de nuestro laboratorio indican que el glucógeno presente a la edad en la que se realizaron los experimentos, cursa con una muerte neuronal en los animales y una hipótesis adoptada es que la estructura está alterada y el polisacárido no puede ser, por tanto, degradado.

Estos resultados muestran, por primera vez, una alta capacidad de degradación de glucógeno en la neurona que se activa en hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo*. La activación de la maquinaria de degradación en el estado post-mortem podría haber impedido la correcta detección de glucógeno en neuronas en animales hasta el momento.

Una vez evidenciada la capacidad de degradación de glucógeno, se caracterizó la vía implicada y se demostró que la GP era el enzima responsable de la degradación. Cabe destacar que la

maquinaria de degradación ya estaba activa cuando las neuronas sobre-expresaban la MGS-9A, como ilustra la acumulación de glucógeno en normoxia cuando la GP está inhibida (**Fig.7A**). Estos resultados podrían ilustrar un intento de la neurona por mantener unos niveles limitados de glucógeno, ya que un exceso de glucógeno es pro- apoptótico para la neurona.

La presencia de GP en neuronas se mostró en cultivos neuronales y en neuronas en cortes de cerebro de ratón adulto, descartando así una posible inducción del enzima por el establecimiento del cultivo primario o restringiendo su expresión neuronal a células embrionarias. A pesar de que en las últimas décadas se ha descrito que las neuronas carecen de GP (Richter, Bohme et al. 1983; Pfeiffer-Guglielmi, Fleckenstein et al. 2003), estudios anteriores documentan la presencia del enzima en neuronas (Takeuchi 1965; Ibrahim, Atlan et al. 1970). Estas discrepancias podrían ser explicada por los siguientes motivos: los enzimas unidos al glucógeno muestran una translocación celular muy dinámica en respuesta al estado energético de la célula. Tanto la GS como la GP son detectadas con claridad por inmunofluorescencia en normoxia, donde las neuronas tienen acumulaciones de glucógeno y los enzimas muestran un patrón agregado y punteado. Sin embargo, en hipoxia, a pesar de que los niveles totales de proteína no cambian, la señal de inmunofluorescencia que se obtiene es difusa y muy baja. El cambio en el patrón de los enzimas probablemente es una consecuencia de la degradación de glucógeno y la falta de un soporte donde unirse hace que los enzimas no se agreguen y den una señal más baja en su detección. Una situación glucogenolítica, como es el caso de la anoxia post-mortem, dificultaría la detección. Otra razón que podría explicar la ausencia de GP descrita en neuronas es la sensibilidad del método utilizado para su detección. Dado que los niveles de GP en las neuronas son menores que en astrocitos (Pellegrini, Rossier et al. 1996), los métodos utilizados (basados principalmente en inmunodetecciones) podrían no haber sido suficientemente sensibles. En nuestro caso, tanto GS como GP solo pudieron ser detectados por inmunofluorescencia cuando se empleó un protocolo de amplificación de señal. La detección del RNA mensajero y de la proteína por *western blot* confirma la expresión de GP en neuronas.

La expresión exclusiva de la isoforma de cerebro y no de la de músculo, a diferencia del astrocito, que expresa ambas (Pfeiffer-Guglielmi, Fleckenstein et al. 2003) puede justificarse por las propiedades cinéticas de las dos isoformas (Carrer, Karlsson et al. 1995). La isoforma muscular se activa principalmente por fosforilación y está diseñada, por tanto, para responder a estímulos extracelulares que inducen cascadas de fosforilación. Es el caso de los astrocitos, cuyas reservas de glucógeno se encuentran bajo el control de neurotransmisores y hormonas liberadas por la

neurona (nordadrenalina, péptido intestinal vasoactivo, adenosina, ATP) (Magistretti, Sorg et al. 1993; Magistretti 2006). En cambio, la isoforma de cerebro es extremadamente sensible a aumentos en los niveles de AMP, por lo que está diseñada para responder a demandas energéticas intracelulares, proporcionando energía para la propia célula.

En conclusión, en este capítulo se ha ilustrado la capacidad de degradación de glucógeno en la neurona, añadiendo una pieza más en el metabolismo de glucógeno neuronal. Esta degradación viene mediada por la expresión de la isoforma cerebral de la GP, que serviría para la obtención de energía para la propia célula en condiciones de alta demanda energética, en donde los niveles de AMP podrían constituir la señal de activación de la maquinaria.

## **RESULTADOS: CAPÍTULO 3**

### **EFFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO**

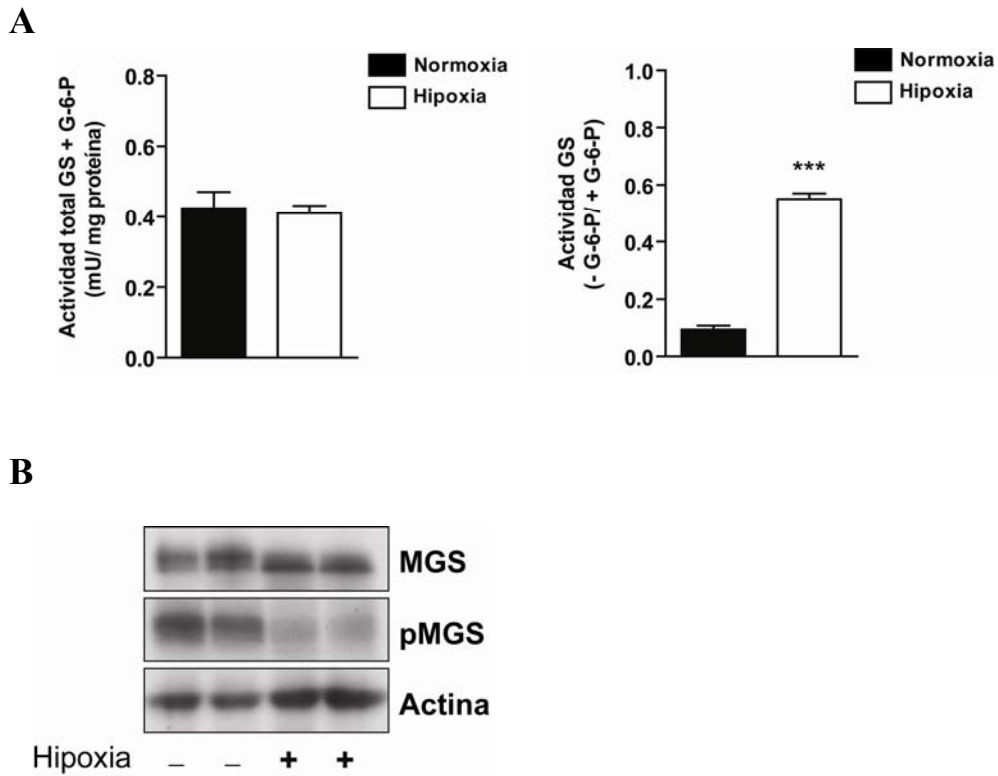
#### **3.1 Introducción**

Estudios recientes han descrito un aumento de glucógeno en hipoxia en modelos de diversas líneas celulares. Este incremento en el contenido de glucógeno está mediado por la inducción en la expresión de la isoforma muscular de la GS (Pescador, Villar et al. 2010) y de la PTG (Shen, Zhang et al. 2010). Estos estudios muestran la presencia en el promotor de ambos genes de una secuencia de respuesta a HIF1 $\alpha$ . Sin embargo, los resultados del capítulo anterior muestran que las neuronas tienen la capacidad de degradar glucógeno, y que esta maquinaria se activa bajo hipoxia, causando una disminución neta en los niveles totales.

La MGS en neuronas está altamente regulada y no se conoce, hasta el momento, ninguna situación no patológica en donde se induzca su activación. El objetivo de este apartado fue, por un lado, analizar si la maquinaria de síntesis de glucógeno en las neuronas estaba regulada bajo condiciones de hipoxia, y por otro, determinar si HIF1 $\alpha$  jugaba un papel en esta regulación.

#### **3.2 Caracterización del estado de activación de GS en hipoxia**

Para estudiar si la GS en la neurona estaba sujeta a alguna regulación en condiciones de hipoxia, medimos la actividad enzimática y los niveles de proteína total y fosforilada mediante *western blot*. Tras 4h de exposición a hipoxia, la actividad enzimática total de la GS, no variaban, lo que implicaba que no habían cambios en la cantidad total de proteína (**Fig 1A**). Sin embargo, el enzima se activaba considerablemente, como mostraban la relación entre actividades (- G-6-P/ + G-6-P). La activación del enzima fue corroborada por *western blot*, pues se observaba un cambio de movilidad electroforética en hipoxia, característico de la GS activa (**Fig 1B**). Además, al detectar la fosforilación de la serina 641 con un anticuerpo específico, ésta desaparecía por completo tras la exposición a la hipoxia. Por tanto, se pudo concluir que, a pesar de la disminución observada en los niveles totales de glucógeno, la GS se veía fuertemente activada bajo condiciones de hipoxia.



**Fig.1 Activación de la GS en hipoxia.** (A) Actividad total GS medida en presencia de G-6-P (panel superior) y relación de actividades (panel inferior) de neuronas expuestas a hipoxia. Los valores representan la media  $\pm$  s.e.m. de 5 experimentos independientes. \*\*\*  $P < 0.001$ . (B) Análisis mediante western blot de los niveles de GS totales (MGS) y de serina 641 fosforilada (pMGS). Se utilizó actina como control de carga. En todos los casos se analizaron 50  $\mu$ g de proteína por carril.

### 3.3 Análisis de la síntesis de glucógeno en hipoxia

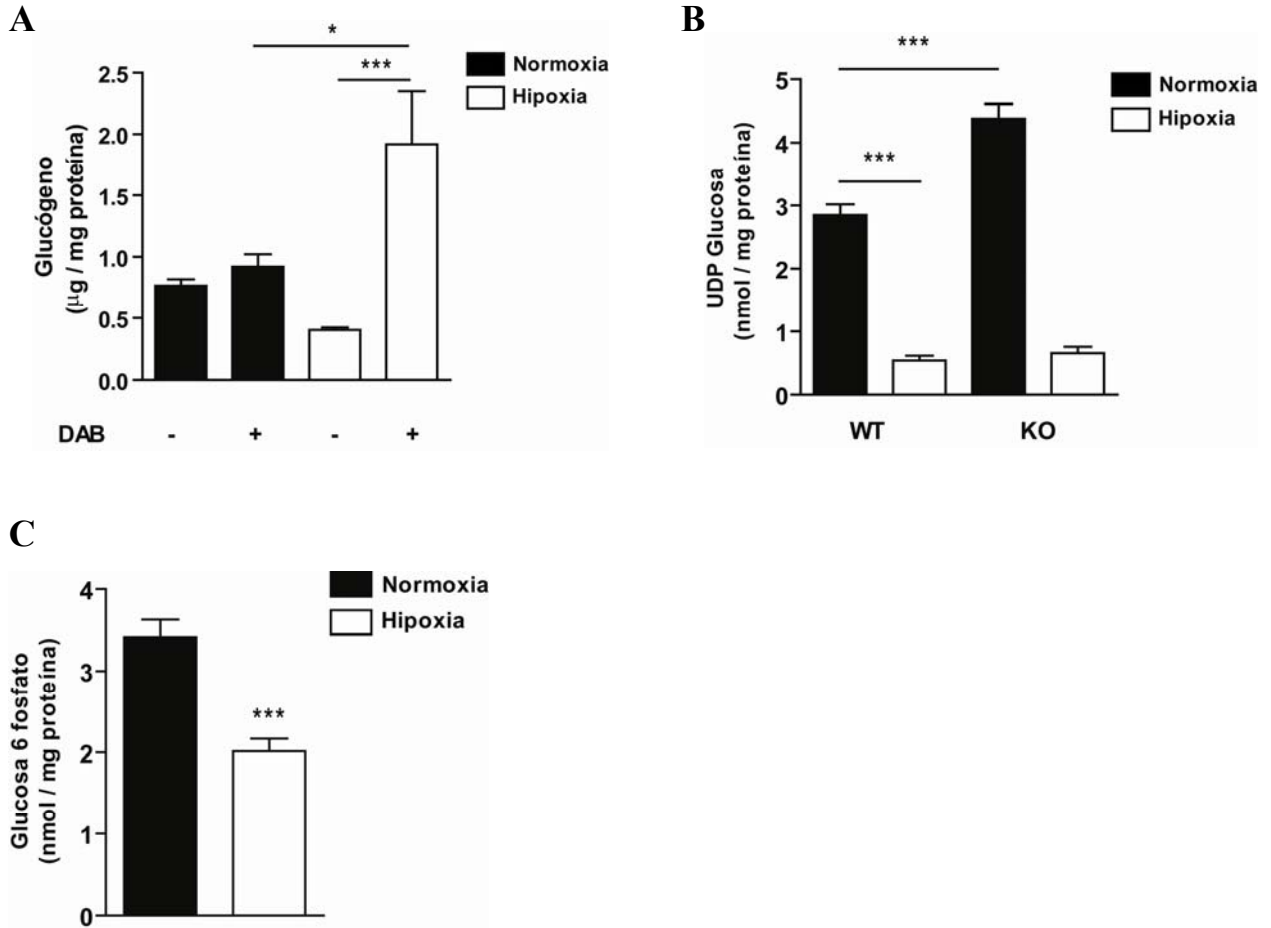
La activación de la GS inducida en hipoxia parecía estar en contradicción con la disminución neta de glucógeno observada. Por ello, se determinó si se estaba llevando a cabo la síntesis de glucógeno paralelamente a la degradación previamente establecida. Se midieron los niveles de glucógeno en hipoxia bloqueando la GP mediante el inhibidor DAB (**Fig.2A**). Ciertamente se observó un incremento en los niveles totales de glucógeno en hipoxia en presencia de DAB, demostrando que la GS no solamente era activada en hipoxia, sino que también sintetizaba

glucógeno. Esto sugería que en hipoxia ocurría un ciclo fútil entre síntesis y degradación de glucógeno.

Para analizar la tasa de síntesis y degradación, se midieron los niveles de UDP glucosa, el sustrato de la GS (**Fig.2B**). En hipoxia, había una disminución, que podía deberse a distintos factores. Por un lado, la hiper-activación de la GS podría llevar a agotar los niveles de su sustrato y, por otro, la alteración en los niveles podría ser una consecuencia de la propia condición de hipoxia. Para discriminar entre estas dos posibilidades, se midieron también los niveles en hipoxia en neuronas que carecían GS (KO). Tal y como ocurría con la neuronas GS WT, las GS KO tenían una disminución de UDP glucosa equivalente, demostrando que era la hipoxia la responsable de la bajada del metabolito. Además, los niveles de UDP glucosa en neuronas KO eran mayores en condiciones control que en las neuronas WT, sugiriendo que en neuronas la GS normalmente utiliza UDP glucosa.

Finalmente se midieron los niveles de glucosa 6 fosfato (G-6-P), activador alostérico de la GS e inhibidor de la GP. En hipoxia, había una disminución en los niveles de G-6-P (**Fig.2C**), indicando que la neurona se encontraba bajo una situación de alta demanda energética donde la entrada de glucosa extracelular no consigue suplir los niveles de G-6-P.

De estos resultados se podía concluir que el recambio de glucógeno en hipoxia era mayor que en normoxia, con un aumento tanto en la tasa de síntesis como a la de la degradación de glucógeno, resultando en una disminución neta en los niveles totales del polisacárido.

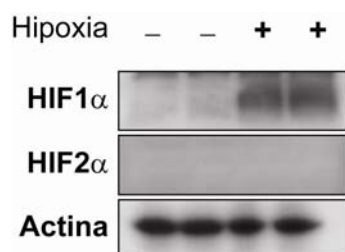


**Fig.2 Cuantificación de glucógeno y UDP glucosa en hipoxia.** (A) Niveles de glucógeno en hipoxia en presencia del inhibidor de la GP DAB. Las neuronas fueron preincubadas con DAB (0.1mM) durante una hora y seguidamente expuestas a hipoxia durante 4 horas. Se determinaron los niveles de glucógeno. Los valores están representados como  $\mu\text{g}$  de glucógeno por  $\text{mg}$  de proteína y son la media  $\pm$  s.e.m. de 5-8 experimentos independientes.  $*P < 0.05$  y  $*** P < 0.001$ . (B) Niveles de UDP glucosa en hipoxia en neuronas aisladas a partir de ratones que expresan la GS (WT) o que carecen de GS (KO). Los valores están representados como  $\text{nmol}$  de UDP glucosa por  $\text{mg}$  de proteína y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 6-10 experimentos independientes.  $*** P < 0.001$ . (C) Niveles de glucosa 6 fosfato en hipoxia. Los valores están expresados como  $\text{nmol}$  de G-6-P por  $\text{mg}$  de proteína y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 10 experimentos independientes.  $*** P < 0.001$

### 3.4. Caracterización del mecanismo de activación de GS en hipoxia

#### 3.4.1 Niveles de factores de transcripción estabilizados en hipoxia 1 $\alpha$ y 2 $\alpha$ (HIF 1 $\alpha$ y HIF 2 $\alpha$ ).

En condiciones de bajo oxígeno, la célula activa programas de adaptación que incluyen cambios a nivel de ciclo celular, consumo energético o supervivencia, entre otros. A nivel génico, estos eventos están coordinados por los factores de transcripción estabilizados en hipoxia (HIF), heterodímeros formados por una subunidad sensible a oxígeno (HIF 1 $\alpha$  y HIF 2 $\alpha$ ), y una subunidad  $\beta$  estable. El primer paso en la caracterización del mecanismo de activación de la GS en hipoxia fue analizar la respuesta de la neurona y establecer qué subunidad  $\alpha$  de HIF estaba siendo estabilizada. Para ello se midieron los niveles por *western blot* de ambas subunidades y se determinó que era la subunidad 1 $\alpha$  la que se acumulaba cuando había una reducción de oxígeno (*Fig.3*).

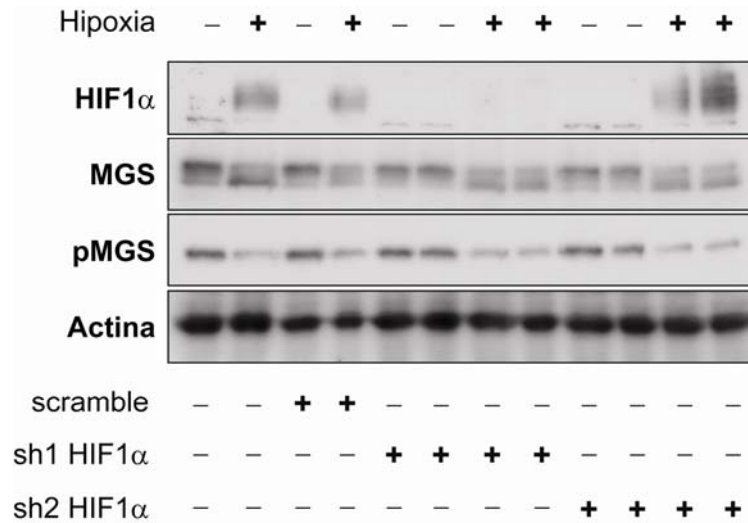


**Fig.3 Estabilización de HIF 1 $\alpha$  y HIF 2 $\alpha$  en hipoxia.** Análisis por *western blot* de los niveles proteicos de ambas subunidades en extractos de neuronas expuestas a hipoxia durante 4h. Se utilizó actina como control de carga y se analizaron 50  $\mu$ g de proteína por carril.

#### 3.4.2 Activación de GS en condiciones de silenciamiento de HIF 1 $\alpha$

Para determinar si HIF 1 $\alpha$  estaba implicado en la activación de la GS, silenciamos su expresión mediante lentivirus recombinantes que codificaban para una secuencia de interferencia de RNA (shRNA) contra HIF 1 $\alpha$  y medimos la activación de GS en hipoxia. Tras tres días de sobre-expresión del constructo, ñas neuronas fueron incubadas 4h a hipoxia. La activación de GS fue analizada por *western blot* (*Fig.4*). Lentivirus con shRNA sin diana (scramble) y lentivirus que no conseguían disminuir la expresión de HIF 1 $\alpha$  (sh2 HIF 1 $\alpha$ ) fueron utilizados como control. Tras comprobar que los niveles de HIF 1 $\alpha$  eran indetectables en hipoxia con sh1 HIF 1 $\alpha$ , se observó que no se inhibía la activación de la GS en hipoxia, tanto por el cambio de movilidad utilizando

un anticuerpo contra niveles totales de GS como con la fosforilación de la serina 641. Por tanto, pudimos concluir que la activación de la GS era independiente de la acción de HIF 1 $\alpha$ .

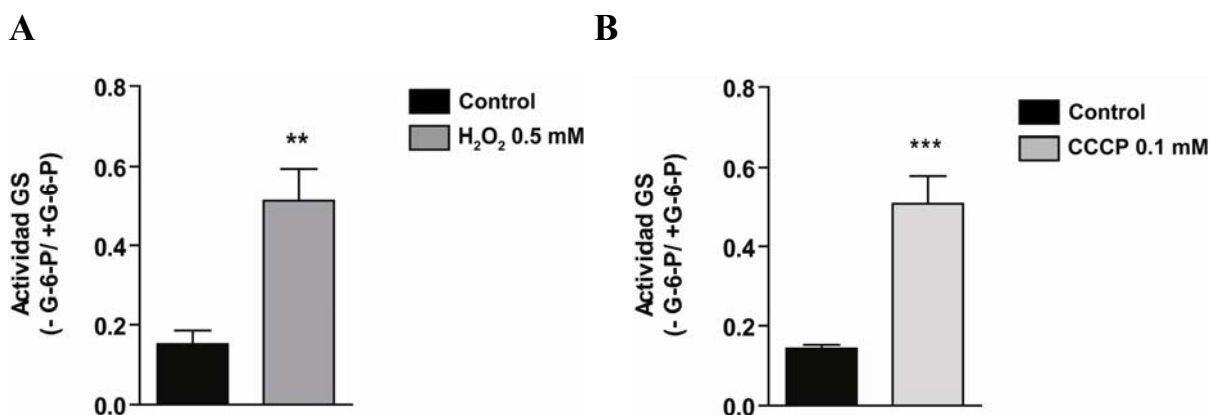


**Fig.4 Cuantificación de la activación de la GS en hipoxia mediante western blot.** Análisis representativo de los niveles de HIF 1 $\alpha$ , GS total (MGS) y fosforilación en serina 641 (pMGS) en neuronas expuestas a hipoxia y con HIF 1 $\alpha$  silenciado (sh1 HIF 1 $\alpha$ ). Virus que codificaban para una secuencia sin sentido (scramble) y contra una secuencia que no conseguía disminuir los niveles de HIF 1 $\alpha$  (Sh2 HIF 1 $\alpha$ ) fueron utilizados como control. La detección de actina es el control de carga. En todos los casos se analizaron 50  $\mu$ g de proteína por carril.

### 3.4.3. Activación de GS en presencia de estreses metabólicos

La activación de la GS ocurre bajo diversas situaciones de estrés metabólico. Así, se ha descrito una activación de la misma en adipocitos en presencia de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (Lawrence, Guinovart et al. 1977) o en hepatocitos cuando la cadena electrónica es inhibida (Carabaza, Guinovart et al. 1986). El mecanismo de activación en ambos casos es desconocido, y se ha propuesto los niveles de AMP como posible fuente de activación de la GS (Carabaza, Ricart et al. 1990). Dado que la hipoxia cursa paradójicamente con un aumento en los niveles de estrés oxidativo para la neurona y con una inhibición de la cadena de transporte electrónica, se estudió si bajo ambas situaciones la GS en la neurona también era activada. Para

ello se midió la actividad enzimática en neuronas expuestas durante 15 minutos a 0.5 mM peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (**Fig.5A**) o 0.1 mM CCCP, un desacoplador de la cadena electrónica (**Fig.5B**). En ambos casos se observó que el enzima se activaba. Esto podría suponer, por tanto, la vía a través de la cual la GS se activaba bajo hipoxia.



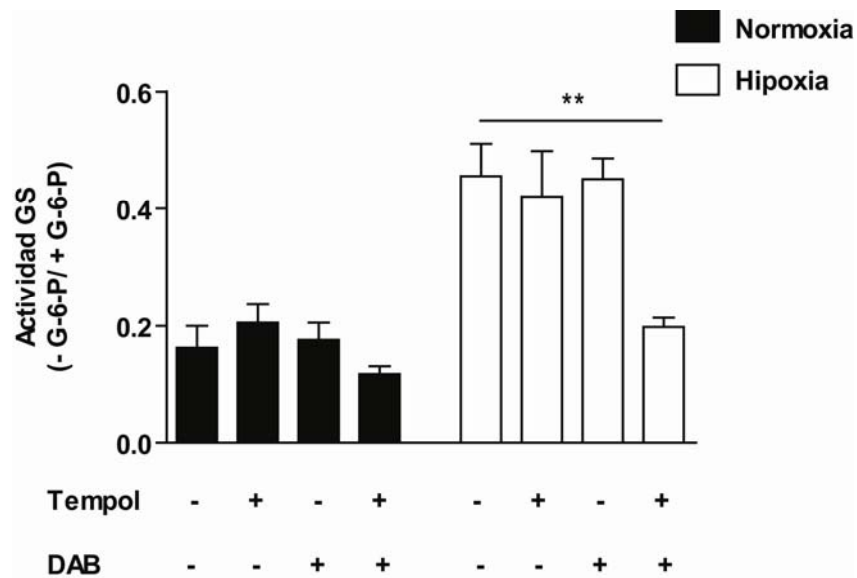
**Fig.5 Actividad GS en respuesta a estrés metabólico.** Relación de actividades GS (- G-6-P/ + G-6-P) en neuronas tratadas durante 15 minutos con (A)  $H_2O_2$  0.5 mM o (B) el inhibidor de la cadena electrónica CCCP. Los valores representan la media  $\pm$  s.e.m. de 5 experimentos independientes. \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3.4.4 Activación de GS en presencia de antioxidantes e inhibidores de la degradación de glucógeno

Otro factor propuesto para la regulación de la actividad GS tanto en músculo como en cerebro (Danforth 1965; Goldberg and O'Toole 1969) es la propia molécula de glucógeno. Así, se ha establecido una relación inversa entre la cantidad de glucógeno y la actividad GS. Por tanto, mientras menos glucógeno presente en la célula más activa estaría la GS. La justificación de esta regulación sería mantener un equilibrio en los niveles totales del gránulo, aunque no se tiene completo entendimiento de cómo funcionaría dicha regulación.

El siguiente paso en el estudio del mecanismo de activación de la GS en hipoxia fue analizar si ésta se activaba por el estrés oxidativo o por la degradación de glucógeno inducida bajo condiciones de bajo oxígeno. Se midió, por tanto, su actividad enzimática en presencia de

compuesto antioxidante a 10 mM, el 4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempol), que secuestra especies reactivas de oxígeno, y en presencia de 0.1 mM DAB, inhibidor de la GP, que se había comprobado que revertía la degradación de glucógeno. Su actividad también fue medida en presencia de ambos compuestos, para comprobar un efecto sinérgico en sus acciones (**Fig.6**). Se preincubó una hora con ambos compuestos antes de exponer las neuronas a 4h de hipoxia. Ni el DAB ni el Tempol por separado tenían ningún efecto sobre la activación de la GS en hipoxia. No obstante, al incubar las células con ambos compuestos al mismo tiempo, sí que se bloqueó la activación de la GS en hipoxia. Se podía concluir, por tanto, que ambos procesos eran necesarios para la activación de la GS en hipoxia.



**Fig.6 Activación de GS en hipoxia en presencia de Tempol y DAB.** Relación de actividades (- G-6-P/ + G-6-P) de neuronas expuestas a 4h de hipoxia con previa incubación con el antioxidante Tempol o el inhibidor de la GP DAB 0.1 mM. Los valores representan la media  $\pm$  s.e.m. de 3-5 experimentos independientes. \*\*  $P < 0.01$

### **3.5 Respuesta del metabolismo de glucógeno a condiciones de reoxigenación**

Una vez terminado el episodio de hipoxia, la restauración de niveles de oxígeno ambientales se conoce como situación de reoxigenación. En esta situación, la célula se adapta y activa determinadas vías metabólicas a un nivel superior al previo a la exposición a la hipoxia. Este proceso se denomina “super-compensación” y se considera un mecanismo de protección frente a posteriores episodios de hipoxia.

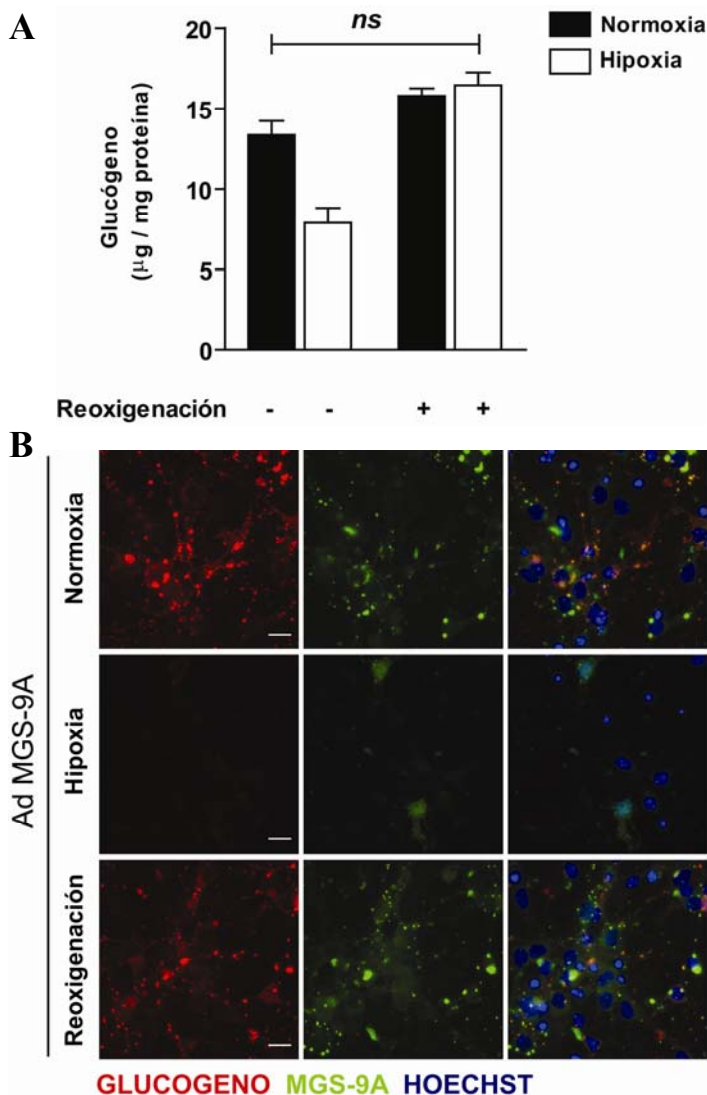
En el caso del glucógeno cerebral, en varios modelos animales se ha observado una super-compensación en su cantidad total (rata, (Brucklacher, Vannucci et al. 2002); gato (Bakay and Lee 1968); y mono (Mossakowski, Long et al. 1968)). Tras 24 horas de reoxigenación los niveles de glucógeno superaban a los niveles previos a la hipoxia, normalizándose posteriormente en el caso de no ser movilizados.

Esta respuesta en el metabolismo de glucógeno en el cerebro también se ha observado tras otros estímulos glucogenolíticos, como la hipoglucemia (Canada, Weaver et al. 2003) o ejercicio (Matsui, Ishikawa et al. 2012), y en músculo tras períodos de ejercicio (Bergstrom and Hultman 1966).

Este aumento en los niveles de glucógeno cerebral, no obstante, se ha atribuido exclusivamente a astrocitos. La activación de la GS neuronal en hipoxia descrita en el punto anterior podría ser un mecanismo para asegurar la rápida síntesis de glucógeno una vez se reestablecen las condiciones ambientales de oxígeno. El objetivo, por tanto, en este apartado, era caracterizar el metabolismo de glucógeno en la neurona en condiciones de reoxigenación.

### 3.5.1 Niveles de glucógeno en neuronas que sobre-expresan el mutante activo de GS

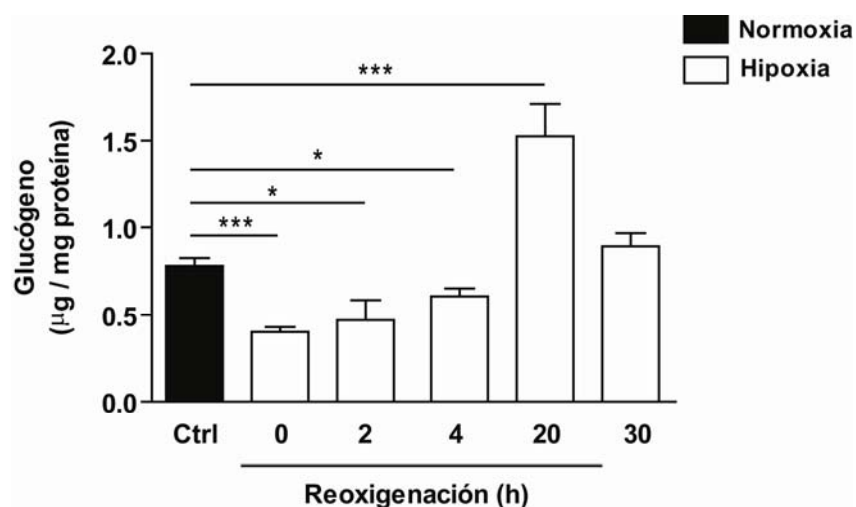
En primer lugar se caracterizó el metabolismo del glucógeno en neuronas que sobre-expresaban el mutante constitutivamente activo de GS (MGS-9A). Como se había descrito en el anterior capítulo de este capítulo, el glucógeno acumulado por la sobre-expresión del enzima era degradado en hipoxia y el enzima translocaba al núcleo. Neuronas que sobre-expresaban la MGS-9A bajo las mismas condiciones que las descritas previamente fueron expuestas a 4h de hipoxia e incubadas por 16 horas adicionales bajo 21% O<sub>2</sub> (condiciones ambientales). Los niveles de glucógeno aumentaron de nuevo tras la reoxigenación (**Fig.7A**) y el enzima presentaba una localización citoplasmática, con un patrón equivalente al observado en las células en condiciones de normoxia (**Fig.7B**). Se concluyó que la maquinaria de degradación de glucógeno dejaba de estar tan activa cuando las células eran reincubadas a concentraciones de oxígeno ambientales.



**Fig.7** Análisis de los niveles de glucógeno en neuronas que sobre-expresan MGS-9A y expuestas a 4h de hipoxia seguido de 16 horas de reoxigenación. **(A)** Contenido de glucógeno de neuronas en reoxigenación. Los valores están representados como la media  $\pm$  s.e.m. de 3-5 experimentos independientes. **(B)** Immunofluorescencia de neuronas expuestas a reoxigenación e incubadas con un anticuerpo anti glucógeno. La señal verde corresponde a la GFP unida a MGS-9A. Núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 40x. La escala representa 20  $\mu$ m.

### 3.5.2 Niveles endógenos de glucógeno

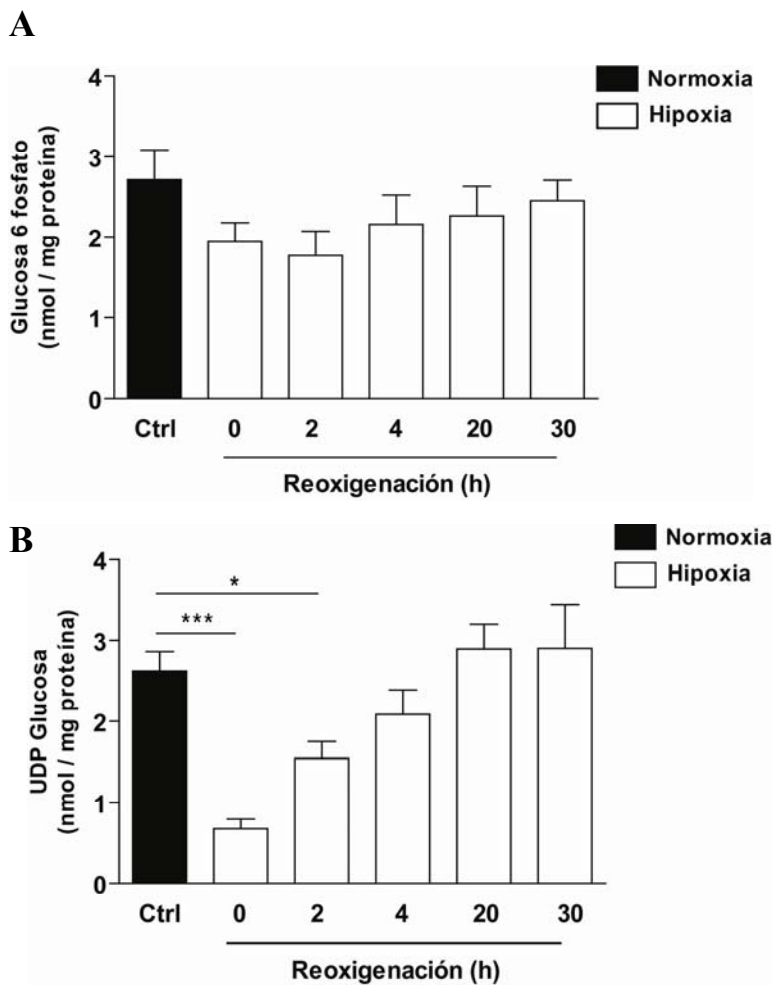
Se determinaron los niveles de glucógeno en neuronas expuestas durante 4h a hipoxia e incubadas por períodos crecientes bajo condiciones de oxígeno ambientales. Como ocurría con los niveles de glucógeno cerebrales, se observó un aumento en la cantidad total de glucógeno, que incluso doblaba los niveles iniciales tras 20 horas de reoxigenación (**Fig.8**), bajando hasta niveles similares a los iniciales a las 30h. Esta cinética en la acumulación de glucógeno era equivalente a la observada en cerebro de rata (Brucklacher, Vannucci et al. 2002), con un máximo tras 20 horas de reoxigenación.



**Fig.8 Efecto de la reoxigenación sobre los niveles de glucógeno de las neuronas.** Cantidad de glucógeno en neuronas expuestas a 4h de hipoxia tras períodos crecientes de reoxigenación. Los valores están representados como  $\mu\text{g}$  de glucógeno por  $\text{mg}$  de proteína y son la media  $\pm$  s.e.m. de 5 experimentos independientes. \* $P < 0.05$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.5.3 Niveles de glucosa 6 fosfato y UDP glucosa

Paralelamente al aumento en los niveles de glucógeno en reoxigenación, se quiso determinar cómo variaban las concentraciones de los metabolitos G-6-P y UDP glucosa bajo estas condiciones. Siguiendo un diseño experimental equivalente al del **Apartado 3.5.2**, los cultivos de neuronas fueron expuestos a 4 h de hipoxia y seguidamente analizados tras tiempos crecientes de reoxigenación. En ambos casos, la reducción observada en hipoxia se normalizaba con el tiempo, llegando a niveles similares al de los controles tras 4 horas de reoxigenación y dejando de ser, por tanto, un factor limitante en la síntesis de glucógeno (**Fig.9**).



**Fig.9 Niveles de glucosa e fosfato y UDP glucosa en reoxigenación.**

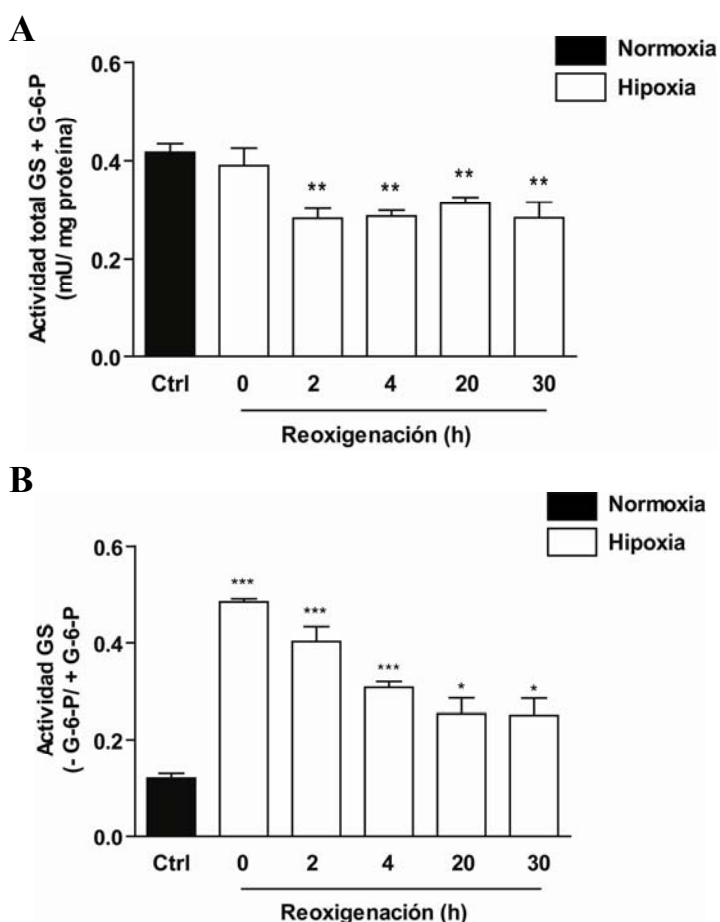
Determinación de (A) glucosa 6 fosfato y (B) UDP glucosa en neuronas expuestas a 4h de hipoxia y periodos crecientes de reoxigenación. Los valores están representados como nmol del metabolito correspondiente por mg de proteína y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4 experimentos independientes.

\* $P < 0.05$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3.5.4 Actividad GS

Otro aspecto a determinar era el impacto que tenía la reoxigenación en la actividad GS por lo que se midió su actividad enzimática en las mismas condiciones que en los anteriores apartados. En reoxigenación se pudo medir una disminución significativa en la actividad total del enzima (medido en presencia de G-6-P), sugiriendo que los niveles totales de proteína eran inferiores (**Fig.10A**). Al analizar la relación de actividades se observó que, tras el período de hipoxia en donde la actividad GS aumentaba considerablemente, la activación iba en disminución al incubar las neuronas de nuevo bajo 21% de oxígeno (**Fig.10B**). Sin embargo, el estado final de activación de la GS aún era ligeramente superior al de los controles.

Comparando la evolución de la actividad GS con la de la cantidad de glucógeno, se observó que ambas evoluciones son opuestas, lo que es coherente con la noción que la actividad GS y la cantidad de glucógeno podrían estar reguladas de manera inversa.



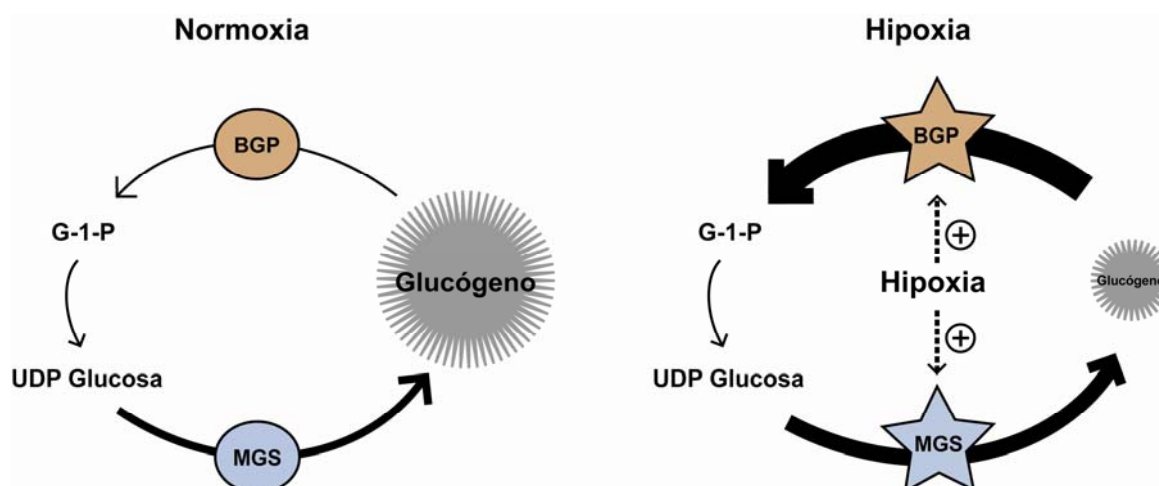
**Fig.10 Actividad GS en reoxigenación.** (A) Actividad total GS medida en presencia de G-6-P y (B) relación de actividades de neuronas expuestas a expuestas a 4h de hipoxia y períodos crecientes de reoxigenación. Los valores representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4 experimentos independientes. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$  respecto al control en normoxia.

### **3.6 Discusión**

En este capítulo se ha querido estudiar el efecto de la hipoxia sobre la GS y la síntesis de glucógeno.

En primer lugar se determinó el efecto de la hipoxia sobre la activación de la GS. Sorprendentemente y, en aparente contradicción con la degradación neta de glucógeno observada en hipoxia, se observaba una activación de la GS. Únicamente su estado de activación aumentaba y no los niveles totales, como se había ilustrado previamente con la MGS (Pescador, Villar et al. 2010). Esta diferencia podría deberse a la diferencia del modelo empleado. Los experimentos en Pescador *et al.* se realizaron utilizando principalmente la línea celular de músculo C2C12, mientras que los resultados de esta tesis están centrados en cultivos primarios de neuronas. La línea celular puede haber sufrido modificaciones como consecuencia de su inmortalización tal que su respuesta se aleje de la obtenida con un cultivo primario. Para esclarecer donde reside la diferencia sería necesario ensayos de promotor con el promotor de la GS en neuronas. También podría estudiarse una posible inducción de la expresión en exposiciones más largas de hipoxia, ya que los experimentos de Pescador *et al.* están hechos principalmente a 24 horas de hipoxia.

Tras observar una activación de la GS en hipoxia, se estudió si, paralelamente a la degradación de glucógeno, también estaba teniendo lugar su síntesis, produciéndose un ciclo fútil. En efecto, el bloqueo de la acción de la GP en hipoxia reveló una acumulación de glucógeno, por lo que se pudo concluir que, no solamente la GS se activaba, sino que también sintetizaba glucógeno en hipoxia. No obstante, la dinámica del ciclo fútil está aún por determinar. Si la síntesis y degradación tienen lugar al mismo tiempo o si están separadas en espacio y/o tiempo aún está por determinar y requerirá un seguimiento *in vivo* de los flujos metabólicos de la célula. De los resultados podemos concluir que hay una síntesis y degradación activa de glucógeno en hipoxia, como se ilustra en el *Esquema 1*.



**Esquema 1. Representación de la tasa de síntesis y degradación de glucógeno y de los niveles totales de polisacárido en normoxia e hipoxia.** En normoxia (panel izquierdo), existe un recambio de glucógeno y la isoforma muscular de GS (MGS) y la cerebral de GP (BGP) tienen una actividad basal. En estas condiciones la tasa de síntesis supera a la de degradación con la consecuente acumulación de una reserva de glucógeno. En hipoxia (panel derecho), se produce una activación de ambas enzimas (MGS y GP c), con lo que se acelera el flujo de síntesis y degradación. Sin embargo, ahora la tasa de degradación supera a la de síntesis, con la consecuente disminución en los niveles totales de glucógeno.

Sin embargo, ambos procesos parecen estar sujetos a mecanismos reguladores adicionales. Los niveles de UDP glucosa, sustrato de la GS, disminuyen considerablemente en hipoxia. Además, esta caída es independiente de la activación de la GS, como prueba la disminución equivalente de UDP glucosa en neuronas que carecen la GS. La disponibilidad de sustrato podría, por tanto, suponer un factor limitante que influiría en la tasa de síntesis de glucógeno y por tanto minimizando el ciclo fútil.

Una regulación adicional de ambos procesos podría constituir la separación espacial. La síntesis y degradación podrían tener lugar en distintas neuronas que se encontraran en diferentes estados de actividad, o en distintos tipos neuronales, que tuvieran una respuesta diferente a los estímulos de la hipoxia. Los cultivos primarios están constituidos por una variedad de tipos neuronales diferentes y, mientras en un tipo podría estar sintetizándose glucógeno, en otro se podría estar degradando. Asimismo, incluso dentro de una misma célula las distintas moléculas de glucógeno podrían estar compartimentalizadas (por ejemplo en el soma y en las dendritas) y cada una podría

responder a los estímulos dependiendo de las necesidades energéticas locales. Al realizar las mediciones bioquímicas con extractos neuronales totales, las diferencias en las respuestas individuales de cada tipo neuronal no pueden ser cuantificadas.

A pesar de parecer inicialmente contra intuitivo, la activación paralela de la síntesis y degradación del glucógeno fue descrita por (Shulman and Rothman 2001) en músculo esquelético bajo ejercicio. En este caso, se medía una activación de la GS paralela a una degradación neta en la cantidad de glucógeno y se demostró que, la degradación ocurría durante la contracción, mientras que la síntesis tenía lugar entre contracciones. En cerebro, la síntesis y degradación paralela también tienen lugar (Shulman, Hyder et al. 2001). Se ha asociado a la estimulación neuronal (Pentreath and Kai-Kai 1982; Swanson, Morton et al. 1992; Dienel, Ball et al. 2007), a la isquemia (Goldberg and O'Toole 1969) y a la recaptación de glutamato (Walls, Heimbürger et al. 2009). Esta función dinámica del glucógeno ha sido justificada por la capacidad de generación de energía rápida en un momento determinado, siendo la obtención de G-6-P a partir de glucógeno mucho más rápida que la entrada y fosforilación de glucosa extracelular. Pese a ser energéticamente desfavorable visto a corto plazo, ya que el paso de la glucosa por glucógeno requiere de una molécula adicional de ATP, supondría un beneficio funcional, ya que permitiría obtener energía rápidamente en una situación de extrema necesidad. Otra manera de justificar el paso de glucosa por glucógeno ha sido la compartimentalización de los sustratos según su procedencia. Así, el lactato derivado del glucógeno o de la glucosa extracelular se ha podido diferenciar dentro de la célula (Sickmann, Schousboe et al. 2005), por lo que la obtención de sustrato en una zona específica de la neurona sería consecuencia de una demanda energética local. Otra posibilidad sería la separación de diferentes reservas de G-6-P según su procedencia. La molécula de glucógeno cada vez se contempla más como un orgánulo que un gránulo, con una estructura dinámica y altamente regulada. Además, en su superficie se han encontrado proteínas que normalmente localizan en otros compartimentos celulares, como el lisosoma o el retículo endoplasmático (Stapleton, Nelson et al. 2010). Esto evidencia la complejidad de la molécula de glucógeno y prueba que el polisacárido no es un mero polímero de glucosa que se hace y deshace en el citoplasma.

El siguiente paso en el estudio fue la caracterización del mecanismo de activación de la GS en hipoxia. En primer lugar se analizó la implicación de los factores de transcripción HIF. Para ello se determinó qué subunidad de HIF $\alpha$  se estabilizaba en el modelo neuronal, viendo que era la subunidad HIF1 $\alpha$ . Para determinar su papel en la activación de la GS, se silenció su expresión.

Con HIF1 $\alpha$  silenciada, la GS era activada en la misma medida, descartando una posible participación de HIF1 $\alpha$  en su activación.

La hipoxia cursa con diversos cambios celulares, entre ellos una inhibición de la cadena respiratoria, un aumento del flujo glucolítico, o una producción de especies reactivas de oxígeno. Algunos de estos eventos se han relacionado directamente con la actividad de la GS. En hepatocitos, la GS se activa en respuesta a la inhibición de la cadena respiratoria (Carabaza, Guinovart et al. 1986), proceso mediado por el incremento en los niveles de AMP (Carabaza, Ricart et al. 1990). Por otro lado, en adipocitos, el estrés oxidativo activa la GS, aunque el mecanismo no está establecido (Lawrence, Guinovart et al. 1977). Se analizó el efecto de ambos estímulos sobre la GS en cultivos de neuronas, y se vio que ambos eran capaces de activar al enzima. Podían suponer, por tanto, mecanismos a través de los cuales en hipoxia se inducía una activación de GS.

La actividad de la GS también ha sido vinculada a los propios niveles de glucógeno celulares. Así, en músculo y cerebro se ha relacionado inversamente los niveles de glucógeno con la actividad de la GS. Se piensa que esta regulación es un mecanismo de mantenimiento de una homeostasis en los niveles totales de glucógeno presentes.

Para establecer si el estrés oxidativo o la bajada en los niveles de glucógeno mediaban la activación de la GS, se analizó su actividad en hipoxia en presencia de un compuesto antioxidante, que neutraliza el estrés oxidativo, y DAB, el inhibidor de la GP que revertía la degradación de glucógeno. Únicamente cuando ambos compuestos eran usados a la vez se conseguía bloquear la activación de la GS en hipoxia. La necesidad de combinar ambos compuestos podría tener dos explicaciones. Por un lado, que el estrés oxidativo y la degradación de glucógeno fueran dos mecanismos independientes que actuarían de manera sinérgica en la activación de glucógeno por lo que ambos tendrían que ser bloqueados para revertir el efecto. En hepatocitos se ha demostrado que la degradación de glucógeno es necesaria para la activación de la GS por glucosa (Halse, Fryer et al. 2003), sugiriendo que niveles bajos de glucógeno sería un requisito para la activación de la GS por otros factores. Por otro lado, por un mecanismo actualmente desconocido, el DAB podría potenciar el efecto del antioxidante Tempol, consiguiendo disminuir de una manera más efectiva el estrés oxidativo, que constituiría, en último lugar, el principal mecanismo de activación de la GS en hipoxia.

Una de las hipótesis propuestas para la activación de la GS en situaciones glucogenolíticas, como es el caso del ejercicio, ha sido la preparación para una síntesis de glucógeno inmediata tras el estímulo (Roach 2002). En hipoglucemia, ejercicio o hipoxia, los niveles de glucógeno cerebrales aumentan por encima de los iniciales una vez el estrés ha finalizado. Nuestro objetivo fue establecer si este era el caso para las neuronas, justificando así la activación de la GS observada. La resíntesis de glucógeno en neuronas que sobre-expresaban MGS-9A reflejó que la reoxigenación no se trataba de una situación tan glucogenolítica como la hipoxia, ya que la degradación del glucógeno era menor. El aumento en los niveles endógenos de glucógeno ilustró que efectivamente había una activa resíntesis en presencia de 21% de O<sub>2</sub>. La estabilización en los niveles de G-6-P y UDP glucosa indicaba que su concentración ya no suponía un factor limitante en la síntesis de glucógeno. La actividad total GS también disminuía en condiciones de reoxigenación, en contraste con el aumento de los niveles de glucógeno, apoyando la hipótesis de una regulación inversa entre la actividad enzimática y los propios niveles de glucógeno.

En conclusión, en este capítulo se demuestra el dinamismo de la molécula de glucógeno en cerebro. En condiciones basales hay un recambio normal de glucógeno, que se acelera considerablemente bajo condiciones de hipoxia y cuya regulación parece estar sujeta a diversos factores. La razón de este aumento en el recambio podría ser la rapidez en la obtención de sustrato energético en un momento determinado. Además, la activación de la GS en hipoxia podría constituir un mecanismo de preparación para la resíntesis de glucógeno una vez las neuronas se encuentran de nuevo bajo condiciones de oxígeno ambientales.

## **RESULTADOS: CAPÍTULO 4**

### **RELEVANCIA BIOLÓGICA DEL METABOLISMO DE GLUCÓGENO EN LA NEURONA**

#### **4.1 Introducción**

La falta de oxígeno conlleva cambios celulares que, prolongados por largos períodos de tiempo, acaban causando la muerte de la célula. Debido a la alta demanda metabólica, las neuronas son especialmente sensibles a fluctuaciones en la concentración de oxígeno.

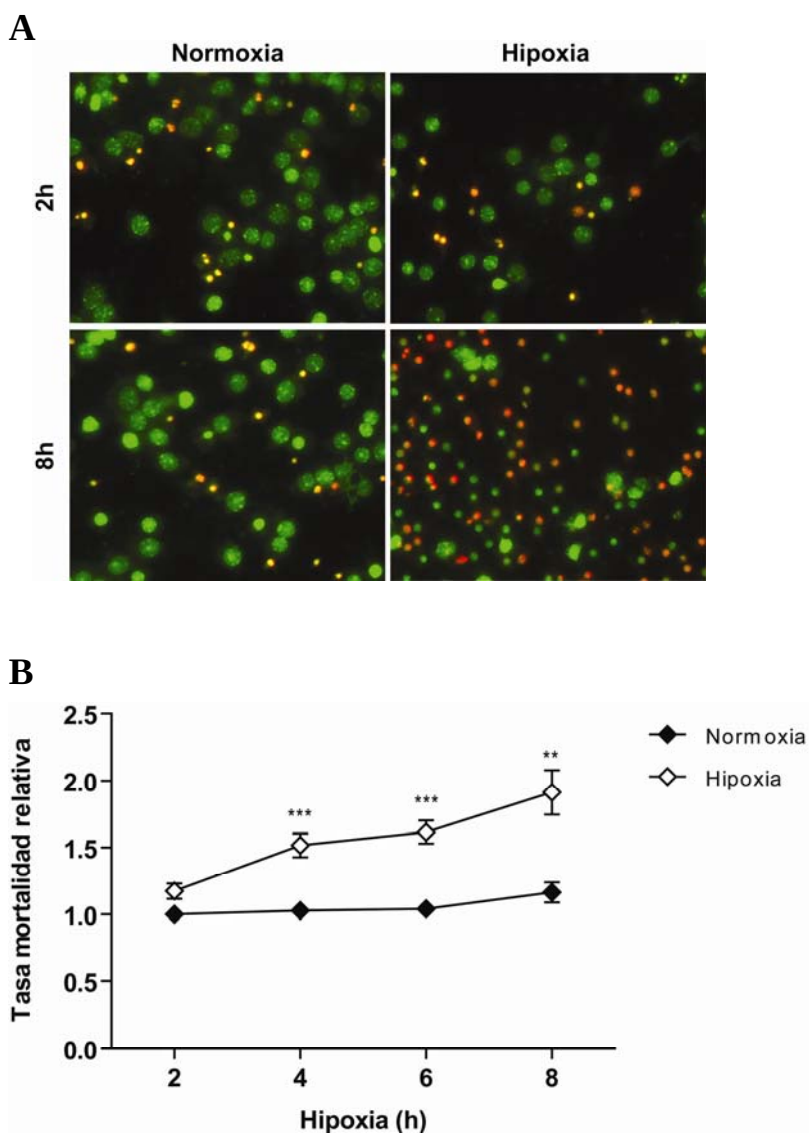
En los anteriores capítulos se ha demostrado la existencia de un metabolismo activo de glucógeno en la neurona. Por un lado se ha ilustrado la presencia de acúmulos de glucógeno bajo condiciones basales, así como una capacidad de degradación del polisacárido que se desconocía hasta el momento. Además, en condiciones de hipoxia aumentan paralelamente la tasa de síntesis y degradación, lo que sugiere que el glucógeno es una molécula dinámica, cuyo metabolismo se altera bajo condiciones de hipoxia. Sin embargo, no se ha demostrado que este metabolismo sea biológicamente relevante para la neurona.

El objetivo de este capítulo se centró en analizar la importancia del metabolismo de glucógeno para la neurona en condiciones de hipoxia. Para ello se analizó la repercusión de la falta de GS neuronal en cultivos primarios y en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*.

## **4.2 Impacto del metabolismo del glucógeno sobre la viabilidad neuronal**

### **4.2.1 Efecto de la hipoxia sobre la muerte neuronal**

Episodios prolongados de hipoxia causan la muerte de neuronas en el modelo del cultivo primario de neuronas corticales (Banasiak and Haddad 1998). En primer lugar, se caracterizó la mortalidad neuronal bajo exposiciones crecientes a una situación de 1% de O<sub>2</sub>. Un gran número de protocolos de determinación de viabilidad basan sus medidas en los niveles de ATP intracelulares o la respiración mitocondrial, como en el caso del ensayo por 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro (MTT). Como en hipoxia hay una reducción de ambos parámetros, sin que ello conlleve necesariamente la muerte celular, se optó por un método basado en la exclusión de un fluoróforo según la integridad de la membrana, que a su vez dependía de la viabilidad celular. Tras la exposición a hipoxia las células se incubaron en un medio con yoduro de propidio, un intercalante del DNA impermeable a las células y que da una fluorescencia roja, y con calceína, un fluoróforo verde, permeable a las células y que penetra por tanto en células aunque su membrana no contenga ningún poro. Se tomaron fotografías aleatoriamente bajo un microscopio de fluorescencia y el porcentaje de neuronas muertas fue estimado tras el conteo de múltiples campos de cada condición (**Fig.1A**). Se comprobó que períodos crecientes de hipoxia cursaban con un aumento en la mortalidad neuronal (**Fig.1B**), que aumentaba un 100% tras 8h de hipoxia.

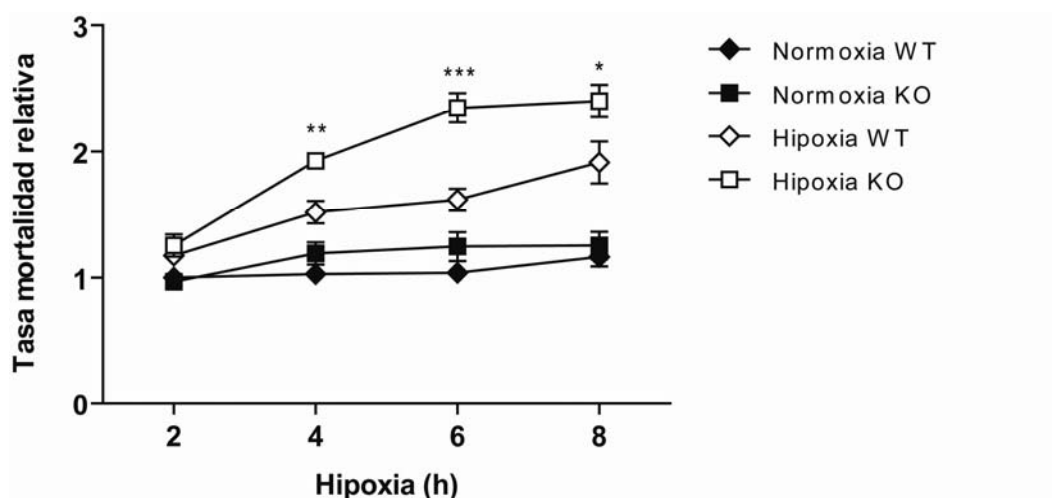


**Fig 1 Análisis de la mortalidad de neuronas en hipoxia.** (A) Representación de imágenes de neuronas expuestas a crecientes períodos de hipoxia y teñidas con dos fluoróforos; uno permeable a neuronas (verde), que marca neuronas vivas y otro (rojo) impermeable y que marca células muertas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia. (B) Cuantificación de la mortalidad neuronal. La tasa de mortalidad corresponde a una relación de neuronas teñidas con rojo (muertas) respecto a las teñidas con verde (vivas). Los valores corresponden a la media  $\pm$  s.e.m. de 10 campos de 8 cubreobjetos y de 3 experimentos independientes. Se normalizaron los datos respecto a Normoxia 2h. \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

#### 4.2.2 Efecto de la hipoxia sobre la muerte neuronal en neuronas que carecen GS

Para determinar la importancia del metabolismo del glucógeno en la neurona bajo condiciones de hipoxia, se aislaron neuronas a partir de ratones que carecían de GS específicamente en el cerebro (KO). Estas neuronas fueron cultivadas en cubreobjetos y expuestas, como en el **Apartado 4.2.1** a períodos de hipoxia de 2 a 8 horas. Neuronas que expresaban la GS y obtenidas en el mismo cultivo primario fueron utilizadas como control (WT). Se observó que, en el caso de las neuronas que no tenían GS, la mortalidad celular en hipoxia era significativamente mayor que en los

controles (**Fig.2**). Este resultado demostraba, por primera vez, la importancia biológica del metabolismo del glucógeno en la neurona; en este caso, bajo una condición de hipoxia.

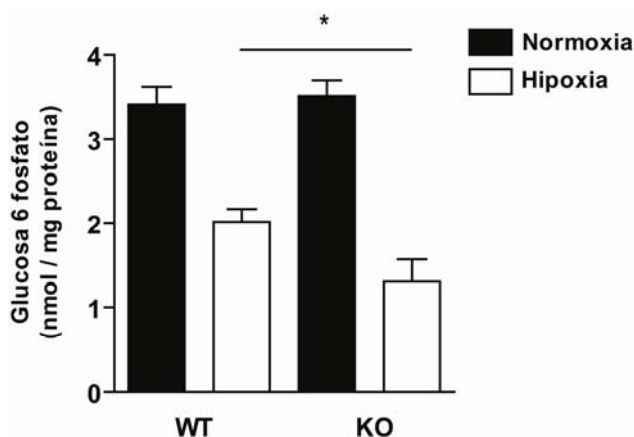


**Fig. 2 Análisis de la mortalidad celular en hipoxia en neuronas que carecen GS.** Cuantificación de la mortalidad neuronal. Células que expresaban (WT, rombos) o carecían (KO, cuadrados) la GS fueron expuestas a períodos crecientes de hipoxia y se determinó la mortalidad neuronal. El porcentaje de mortalidad corresponde a una relación de neuronas teñidas con rojo (muertas) respecto a las teñidas con verde (vivas). Los valores corresponden a la media  $\pm$  s.e.m. de 10 campos de neuronas provenientes de 6 animales diferentes. Se normalizaron los datos respecto a Normoxia WT 2h. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$  respecto a Hipoxia WT.

#### 4.2.3 Niveles de Glucosa 6 fosfato en hipoxia en neuronas que carecen GS

La disponibilidad de la G-6-P es clave ya que se encuentra en un punto de cruce de diversas vías metabólicas. Los niveles de G-6-P dependen del transporte y fosforilación de la glucosa extracelular, del flujo glucolítico, la ruta de las pentosas fosfato y la ruta de biosíntesis de hexosaminas (formación de glicoproteínas y peptidoglicanos) (Bouche, Serdy et al. 2004). Además, cada una de estas vías se encuentra regulada bajo condiciones de hipoxia. Por lo tanto, procedimos a determinar cómo se encontraban los niveles de G-6-P en neuronas que carecían de GS. Se aislaron neuronas a partir de ratones KO para GS, se expusieron 4h a hipoxia y se determinaron los niveles de G-6-P (**Fig.3**). Se comprobó que, a pesar de que los niveles de G-6-P en condiciones basales eran equivalentes en neuronas WT y KO para GS, cuando eran expuestas

a hipoxia, la disminución de G-6-P era mayor en aquellas neuronas sin GS, sugiriendo que el glucógeno servía como tampón para mantener unos niveles de G-6-P mínimos.



**Fig. 3 Cuantificación de la concentración de G-6-P en hipoxia en neuronas que carecen de GS.** Niveles de G-6-P, expresados como nmol de G-6-P por mg de proteína, en neuronas WT o KO para la GS. Los valores corresponden a la media  $\pm$  s.e.m. de 8 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  respecto a Hipoxia WT.

### 4.3 Impacto de la GS en neuronas de *Drosophila melanogaster*

La respuesta celular desencadenada en hipoxia es un mecanismo conservado a lo largo del reino animal, desde nemátodos a peces y humanos (Bruick and McKnight 2001; Epstein, Gleadle et al. 2001; Nikinmaa and Rees 2005).

No obstante, los animales invertebrados, entre ellos la *Drosophila*, tienen una tolerancia a la hipoxia mucho mayor que los mamíferos (Wegener 1988), y pueden sobrevivir a horas e, incluso días, de ausencia casi total de oxígeno. Los mecanismos que median la adaptación a la falta de oxígeno son distintos a los inducidos en la célula mamífera. Mientras el mamífero intenta suplir la demanda energética con mecanismos compensatorios, la adaptación celular de la *Drosophila* se basa en la conservación de la energía. El organismo entra en un estado de depresión metabólica, caracterizado por una reducción drástica en el consumo de ATP. Así, la célula mantiene un balance en los niveles totales de ATP, ya que, paralelamente a la disminución en la obtención de ATP, también tiene lugar un decremento en su consumo (Hochachka, Buck et al. 1996; Boutilier and St-Pierre 2000). A nivel molecular, la situación de hipometabolismo implica la supresión de gran parte de los procesos dependientes de ATP (por ejemplo, síntesis y degradación proteica o ATP asasa dependientes de iones, como la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  asa) (Hochachka, Buck et al. 1996; Rolfe

and Brown 1997). Por lo tanto el flujo glucolítico solamente es utilizado para generar el ATP necesario para sustentar los procesos energéticos residuales. Gracias a estas adaptaciones celulares la *Drosophila* es capaz de aguantar hasta cuatro horas en completa ausencia de oxígeno (Haddad, Wyman et al. 1997).

Una de las consecuencias del hipometabolismo inducido por la hipoxia es la entrada en un estado de estupor, con una pérdida completa de coordinación y posterior inmovilidad (Csik 1939; Chadwick 1940). Este estado de parálisis ocurre tras 30 segundos de falta de oxígeno y se mantiene durante toda la exposición. Sin embargo, cuando la mosca se encuentra de nuevo bajo concentraciones de oxígeno ambientales, recupera por completo sus funciones motoras (Haddad, Wyman et al. 1997). Este proceso de recuperación es dependiente del tiempo al que la mosca ha sido expuesta a hipoxia.

Los estudios centrados en analizar la tolerancia de la *Drosophila* a la hipoxia han utilizado como parámetro el tiempo que necesita la mosca para pasar del estado de parálisis a recuperar sus funciones motoras una vez se encuentra bajo 21% de oxígeno. Este tiempo se ha denominado tiempo de recuperación y ha sido ampliamente estudiado para esclarecer los mecanismos moleculares que median la tolerancia a la hipoxia (Haddad, Sun et al. 1997; Haddad, Wyman et al. 1997; Chen, Ma et al. 2002). La rapidez en la adquisición del estado de parálisis durante la exposición a la hipoxia ha hecho que este parámetro no sea adecuado para el estudio de la tolerancia.

Con el objetivo de estudiar el impacto del metabolismo de glucógeno en la neurona de la *Drosophila melanogaster*, se midió el tiempo de recuperación tras una exposición a hipoxia de diversas líneas que tenían una reducción en los niveles de GS específicamente en neuronas.

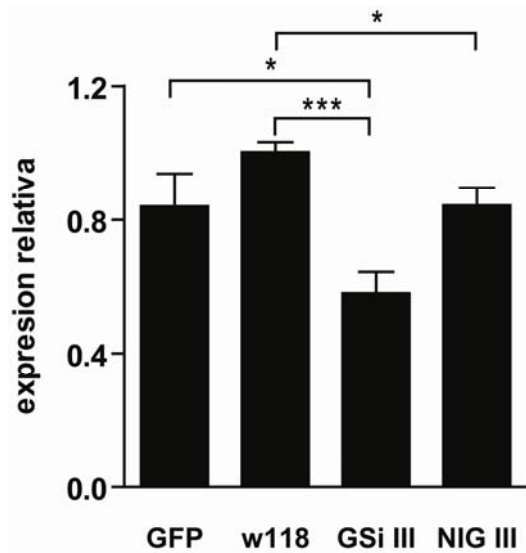
#### 4.3.1 Niveles de RNA mensajero (mRNA) de GS en moscas con niveles reducidos de GS

Para el análisis de la importancia de la GS en la neurona en la mosca del vinagre, se trabajó con líneas de moscas en que la expresión de GS se veía disminuida por constructo *short hairpin* (sh) contra la GS de *Drosophila* (dGS). Utilizando de nuevo el sistema GAL4/ UAS, detallado en el **Capítulo 2**, se restringió la expresión del constructo sh a neuronas, mediante la utilización del promotor *elav*. De este modo se obtuvieron unas líneas con niveles reducidos de GS exclusivamente en neuronas (líneas *knock down*, KD).

Se trabajó con dos líneas KD independientes, que contenían constructos diferentes contra la dGS- UAS-GSi III (GSi III) y UAS-NIG III (NIG III). Se utilizaron dos tipos diferentes de controles: una línea que no sobreexpresaba ningún transgen (denominada w118 por su fondo genético) y una línea que tenía el gen inocuo de la GFP insertado bajo el control de la secuencia UAS (GFP) y que sobreexpresaba, por tanto, la GFP específicamente en neuronas al cruzar estas moscas con las *elav-GAL4*.

El primer paso consistió en caracterizar los niveles de reducción del RNA mensajero (mRNA) de la dGS. Para ello se aisló, de cada línea, el RNA a partir de cinco cabezas de moscas y se midió el mRNA por PCR cuantitativa (**Fig.4**). Se observó que, en ambas líneas KD (GSi III y NIG III) había una reducción en los niveles de dGS. La reducción en el mRNA era considerablemente mayor en la línea GSi III que en la NIG III.

Aunque la eficiencia del silenciamiento pueda parecer baja, hay que tener en cuenta que la determinación de mRNA se llevó a cabo a partir de cabezas enteras de moscas. Por tanto, la reducción de dGS exclusiva en neuronas se ve diluida por la presencia de GS en otros tipos celulares, especialmente glía.



**Fig.4 Cuantificación de la eficiencia de silenciamiento de la dGS en distintas líneas de *Drosophila*.** Niveles de mRNA de dGS en las líneas control (GFP y w118) y en dos líneas que sobreexpresan un constructo sh contra la dGS en neuronas (GSi III y NIG III). Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 6-8 experimentos provenientes de 3 cruces independientes. \*  $P < 0.05$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

#### 4.3.2 Tiempo de recuperación tras un episodio de hipoxia de moscas con niveles reducidos de GS en neuronas

Para analizar diferencias a la tolerancia a la hipoxia entre las diferentes líneas de *Drosophila*, se determinó el tiempo de recuperación de las funciones motoras tras una exposición de hipoxia.

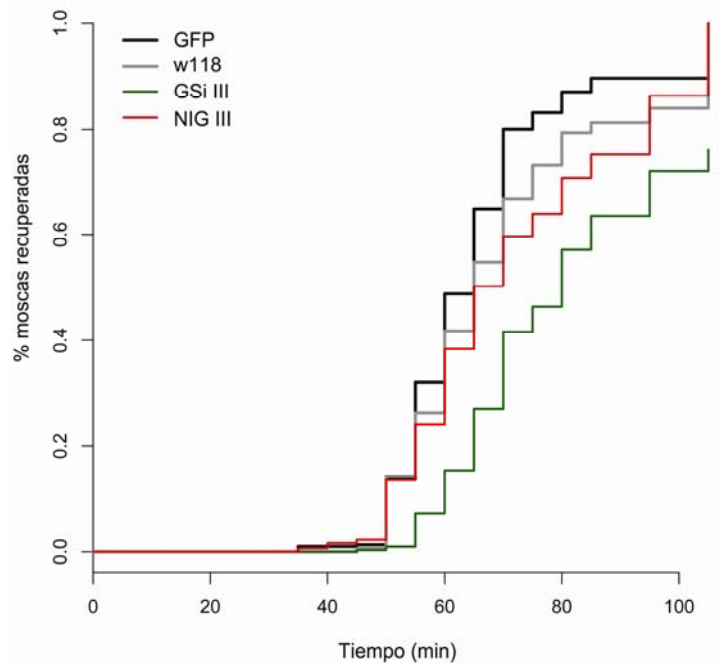
Las moscas se separaron por género y por genotipo para realizar los experimentos. Grupos de 16 moscas se colocaron en tubos sellados con una malla de nylon, que permitía el intercambio de gases. Los tubos fueron introducidos en un incubador a 29 grados con 0.6% de O<sub>2</sub> durante una hora. Como se había descrito en los estudios publicados, tras pocos segundos las moscas entraron en un estado de estupor y completa parálisis, del cual no se recuperaron durante el resto de la exposición de hipoxia. Tras una hora, se extrajeron los tubos del incubador y se colocaron en posición horizontal, con lo que las moscas inmóviles cayeron al fondo del tubo. A continuación se determinó, en intervalos de cinco minutos, el número de moscas que recuperaban sus funciones motoras, tomando como criterio el cruce de una línea arbitraria situada a un centímetro del suelo del tubo.

Se utilizó el método estadístico COX para determinar la significación estadística de los datos. Este método permite comparar datos que hacen referencia a la resistencia de un evento frente al tiempo, minimizando otros parámetros que puedan alterar los resultados, como es el género del sujeto o el día de realización del experimento. Tras aplicar este test, se obtiene un valor *Hazard*

*ratio (HR)*, que consiste en una estimación de la probabilidad de recuperación, y un valor *p* (*P value*), que determinará si dos grupos son estadísticamente diferentes entre ellos.

Se observó que ambas líneas con niveles reducidos de GS (GSi III y NIG III) tenían un tiempo de recuperación a la hipoxia significativamente mayor al de ambos controles (w118 y GFP) (**Fig.5A**). Estos resultados demostraban que la GS jugaba un papel en la neurona de la mosca en condiciones de hipoxia y, por tanto, aquellas líneas con niveles menores de GS presentaban un fenotipo empeorado. El nivel de significación con el control GFP de la línea GSi III, reflejado por el valor *P value*, era mayor que el de la línea NIG III (**Fig.5B**), en acorde con la diferente eficiencia en la reducción de los niveles de RNA mensajero de la dGS en ambas líneas KD. No existían diferencias entre la respuesta de ambos controles (GFP y w118) ni entre géneros (machos y hembras), como ilustraba el *P value*. La respuesta entre las líneas GSi III y NIG III tampoco era significativamente diferente.

A



B

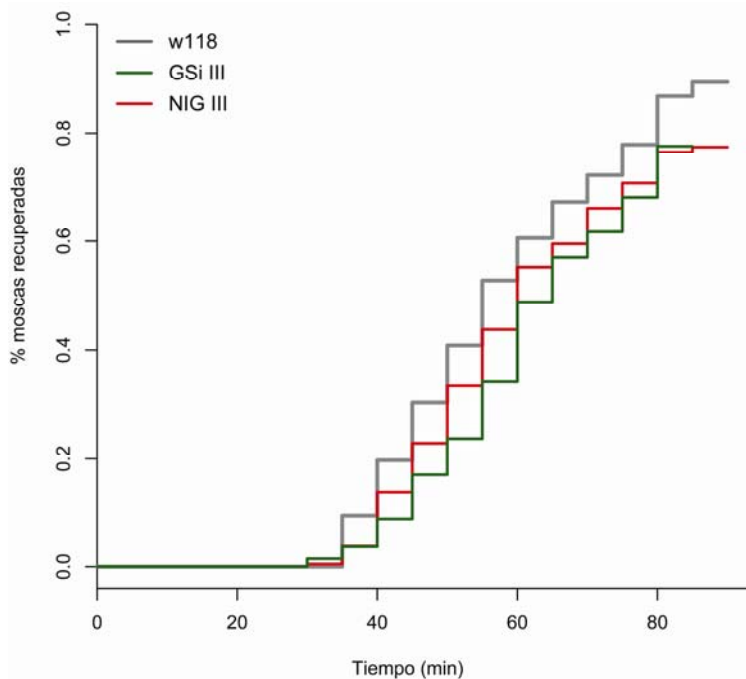
| Grupo                    | HR    | P value |
|--------------------------|-------|---------|
| <b>Control 1 vs 2</b>    |       |         |
| w118 vs GFP              | -1.07 | 0.4434  |
| <b>Líneas KD vs GFP</b>  |       |         |
| GsiIII vs GFP            | -1.32 | 0.0071  |
| NIGIII vs GFP            | -1.22 | 0.0312  |
| <b>Líneas KD1 vs KD2</b> |       |         |
| NIGIII vs GsiIII         | 1.08  | 0.4628  |
| <b>Genéro</b>            |       |         |
| Machos vs hembras        | 1.07  | 0.3616  |

**Fig.5 Recuperación a la hipoxia de moscas con niveles reducidos de dGS** (A) Tiempo de recuperación de las funciones motoras tras una hora de hipoxia de dos líneas de moscas control (GFP, w118) y dos líneas de moscas KD, con niveles reducidos de dGS en neuronas (GSi III, NIG III). Los valores representan la media de 120-160 moscas de tres cruces independientes. (B) Comparación estadística entre los diferentes grupos. Representación del Hazard Ratio y P Value entre los grupos control (Ctrl), las líneas KD frente al control GFP, las líneas KD entre si, y machos y hembras.

Aunque el fondo genético de todas las moscas era el mismo (w118), las distintas líneas procedían de orígenes diferentes. Por tanto, existía la posibilidad de que las líneas pudieran contener elementos diferenciales ajenos al metabolismo del glucógeno que fueran los responsables del fenotipo observado en la recuperación de la hipoxia. Para corroborar que la diferencia entre las líneas era únicamente dependiente de la expresión del constructo sh contra la dGS, se cruzaron moscas que contenían el constructo sh unido a la secuencia UAS con moscas que contenían el gen GFP unido UAS. Las moscas resultantes tenían en un cromosoma el gen UAS-GFP y en otro, o bien ningún transgen (cruzado con moscas sin transgen, línea control; w118), o el constructo sh

(líneas KD; GSi III o NIG III). Como estas moscas carecían del factor de transcripción GAL4 no sobre-expresaban ningún gen que estuviera bajo la secuencia UAS (ni GFP ni el sh contra dGS) y tenían, por tanto, niveles fisiológicos de dGS en las neuronas. En cambio, estas moscas sí tenían el mismo fondo genético que las utilizadas en la **Fig.5**. Se determinó el tiempo de recuperación bajo las mismas condiciones experimentales utilizadas en el anterior apartado. En este caso no se observaron diferencias en la respuesta de las distintas líneas (**Fig.6**), con lo que podíamos afirmar que el efecto observado en la **Fig.5** se debía exclusivamente a un efecto de la reducción de GS y no a otros elementos asociados al fondo genético.

**A**



**Fig.6 Recuperación a la hipoxia de moscas control (A)** Tiempo de recuperación de las funciones motoras tras una hora de hipoxia de líneas de moscas con niveles fisiológicos de dGS (w118, GSi III y NIG III). Los valores representan la media de 100-120 moscas de dos cruces independientes. **(B)** Comparación estadística entre los diferentes grupos. Representación del Hazard Ratio y P Value entre las líneas KD (GSi III y NIG III) frente al control (w118), las líneas KD entre sí, y machos y hembras.

**B**

| Grupo                    | HR    | P value |
|--------------------------|-------|---------|
| <b>Líneas KD vs Ctrl</b> |       |         |
| NIGIII vs w118           | -1.11 | 0.3604  |
| GsiIII vs w118           | -1.02 | 0.8839  |
| <b>Líneas KD1 vs KD2</b> |       |         |
| GsiIII vs NIGIII         | 1.09  | 0.5256  |
| <b>Genéro</b>            |       |         |
| Machos vs hembras        | -1.14 | 0.1959  |

#### **4.4 Discusión**

En este capítulo se presentan resultados que evidencian no solamente que la neurona posee un metabolismo activo de glucógeno, sino que éste forma parte de la maquinaria de protección de la célula frente a la condición de estrés de la hipoxia.

En primer lugar se ha ilustrado que, en el cultivo primario de neuronas, la presencia del metabolismo del glucógeno juega un papel clave en la protección a la falta de oxígeno. La ausencia de la GS aumenta la mortalidad inducida por la hipoxia de las neuronas. Si dicha protección viene dada por los niveles basales de glucógeno o por el aumento en su recambio observado en el anterior capítulo está aún por determinar. En cualquier caso, los resultados en referencia a la cantidad de G-6-P dan una idea de lo que puede estar sucediendo dentro de la célula. La notable disminución de sus niveles en hipoxia sugiere que la entrada y/o fosforilación de la glucosa es limitante respecto a la utilización de la G-6-P y no se consigue mantener los niveles endógenos del metabolito. Asimismo, el hecho de que las neuronas KO para GS tengan unos niveles ligeramente inferiores en hipoxia, sugiere que el glucógeno podría servir, al menos en parte, como tampón para intentar mantener el nivel de G-6-P.

El destino de la G-6-P podría ser múltiple, desde la entrada a la glucólisis para la producción de ATP, o su metabolización a través de la vía de las pentosas fosfato para generar el NADPH necesario para mantener el glutatión en un estado reducido. El glutatión es un agente detoxificante de peróxidos que, en su forma reducida, actúa como un donante de electrones capaz de convertir la molécula de peróxido de hidrógeno en agua (Pompella, Visvikis et al. 2003). Debido al impacto de los radicales libres generados durante la hipoxia sobre el funcionamiento de la neurona (Barnham, Masters et al. 2004), el control sobre el estado oxidativo de la célula sería clave y podría explicar las diferencias observadas en la mortalidad. En astrocitos, se ha descrito que el estrés oxidativo activa la movilización de las reservas de glucógeno y que el destino de la G-6-P derivada de la degradación de glucógeno podría ser precisamente la vía de las pentosas fosfato para la obtención de NADPH (Rahman, Kussmaul et al. 2000). Considerando la sensibilidad de la neurona por el estrés oxidativo, el glucógeno podría tener un papel equivalente en este tipo celular.

Los datos obtenidos a partir del modelo *Drosophila melanogaster* verifican los resultados obtenidos en el modelo del cultivo neuronal y refuerzan su impacto a dos niveles: por un lado demuestran que lo observado en la situación *in vitro* también sucede en el animal, descartando que el efecto pueda ser consecuencia del aislamiento de las neuronas de su ambiente nativo o de su procedencia embrionaria.

En conclusión, en este capítulo se presentan las evidencias necesarias para asegurar que en la neurona existe un metabolismo activo de glucógeno, vital para su correcto funcionamiento en la situación de estrés que supone la hipoxia, y que forma parte de la respuesta de supervivencia de la neurona activada por la falta de oxígeno.



## **VI. DISCUSIÓN**



## **DISCUSIÓN**

El glucógeno es la única reserva energética del sistema nervioso central. Aunque su concentración es claramente inferior a la de otros tejidos como el músculo o hígado, el glucógeno juega un papel importante como soporte energético en condiciones de alta actividad neuronal o situaciones de estrés tisular debido a privación energética. A pesar de que las fluctuaciones de glucógeno parecen estar ligadas a las demandas energéticas neuronales, su presencia ha sido restringida exclusivamente a astrocitos. Estas células lo administran a las neuronas en forma de lactato, en un claro ejemplo del acoplamiento metabólico y la plasticidad entre la neurona y la glía.

A pesar de la escasa presencia de glucógeno en neuronas, estas células expresan el único enzima capaz de sintetizar el polisacárido, la Glucógeno Sintasa (GS), y tienen la maquinaria necesaria para acumular glucógeno. Asimismo, en determinadas patologías neurodegenerativas, las neuronas acumulan polímeros de glucosa poco ramificados, conocidos como cuerpos de poliglucosano. El caso más evidente es la enfermedad de Lafora, una tipo de epilepsia degenerativa caracterizada por acumulaciones de glucógeno aberrante en las neuronas. Recientemente se ha demostrado que el exceso de glucógeno desencadena la apoptosis, y podría por tanto suponer un mecanismo de patogéneicidad de esta enfermedad. Aún más significativo es el caso de la enfermedad de Pompe. En esta, una deficiencia en la degradación del glucógeno conlleva a su acumulación anómala en los lisosomas de múltiples células, como en neuronas.

Estas observaciones nos hicieron pensar que la neurona podía tener un metabolismo activo del glucógeno. ¿Por qué, si no, este tipo celular mantenía la expresión de la GS aún cuando la molécula de glucógeno parecía ser tóxica para la neurona?

En primer lugar se puso de manifiesto que las neuronas sí tenían una síntesis activa del polisacárido, mediante el análisis de incorporación de glucosa a la molécula de glucógeno. Asimismo, la detección intracelular de la GS endógena corroboraba estos resultados. Hasta el momento sólo se había descrito la localización subcelular de GS sobre-expresada, situándola principalmente en el núcleo. Sin embargo, nuestros análisis revelaron que la GS endógena se encontraba en el citoplasma de la neurona en forma agregada, característica de la GS que se encuentra sintetizando glucógeno.

En este punto aún cabía la posibilidad que el glucógeno detectado fueran sólo niveles residuales, sin funcionalidad para la neurona. Se procedió a la caracterización de la maquinaria de degradación de glucógeno. Para ello se estudió la respuesta neuronal en una situación glucogenolítica, como la hipoxia. Al exponer las neuronas a condiciones de hipoxia, se observó que las reservas de glucógeno eran movilizadas. Estos resultados reflejaban que la neurona poseía un metabolismo activo de glucógeno. Estos datos tenían especial relevancia, ya que se había atribuido la ausencia de la maquinaria de degradación como responsable de la sensibilidad neuronal a la acumulación de glucógeno. Para descartar que la capacidad de degradación fuera un proceso exclusivo del sistema *in vitro* y, además, de neuronas de origen embrionario, se verificó la presencia neuronal de la maquinaria de degradación en el modelo de *Drosophila melanogaster* y en el modelo murino. Se caracterizó la vía de degradación y se determinó que el enzima responsable era la isoforma cerebral de la Glucógeno Fosforilasa (GP), presente también en neuronas de cerebro adulto de ratón.

A continuación se estableció que la hipoxia regulaba, paralelamente a la degradación de glucógeno, su síntesis. Se observó una fuerte activación de la GS, y se determinó que la GS sintetizaba glucógeno en hipoxia, con lo que aparentemente estaba teniendo lugar un ciclo fútil de glucógeno. No obstante, si la síntesis y degradación tenían lugar simultáneamente o si ambos procesos estaban separados en el tiempo y/o espacio quedaba aún por esclarecer. Por otro lado se procedió a caracterizar el mecanismo de activación de la GS. Se comprobó que era independiente del factor de transcripción HIF 1 $\alpha$ , como anteriormente se había descrito. En cambio, el estrés oxidativo, así como los niveles de glucógeno parecían estar jugando un papel en la activación del enzima. Finalmente se estudió la respuesta del metabolismo de glucógeno en neuronas en condiciones de reoxigenación, es decir, cuando las células entran en contacto de nuevo con concentraciones de oxígeno ambientales. Tal y como ocurre en cerebro entero, las neuronas presentaban una sobre-acumulación de glucógeno por encima de los niveles basales, que podría estar mediada por la previa activación de la GS en hipoxia. Las cantidades de glucógeno acababan normalizándose y volvían a los niveles iniciales.

Por último se estudió si, el metabolismo tenía una relevancia biológica para la neurona. Para ello se comparó la resistencia a la reducción de oxígeno entre neuronas con distintos niveles de GS. Por un lado, se determinó que la GS formaba parte del mecanismo de protección a la hipoxia, ya que los cultivos de neuronas obtenidos a partir de animales sin GS tenían una mayor mortalidad

cuando eran expuestos a bajas concentraciones de oxígeno. Al examinar qué vías estaban diferencialmente reguladas en hipoxia en función de la presencia de GS, se comprobó que los niveles de G-6-P, metabolito central en la glucólisis, vías de la pentosas fosfato y biosíntesis de hexoaminas, eran menores en las neuronas que no expresaban la GS, lo que apuntaba a la molécula de glucógeno como tamponadora de la concentración de G-6-P. Finalmente se corroboró la importancia del metabolismo de glucógeno para la neurona en el modelo *Drosophila melanogaster*, y se comprobó que, niveles reducidos de GS en la neurona cursaban con una menor tolerancia a la hipoxia. Este conjunto de datos evidenciaban, por primera vez, la relevancia biológica de la GS y el metabolismo de glucógeno en la célula neuronal.

Algunas de las conclusiones de esta tesis están en aparente contradicción con publicaciones previas, en especial respecto a la presencia de glucógeno y GP en neuronas. Sin embargo, diversas mejoras metodológicas establecidas en el desarrollo de la tesis podrían explicar, al menos en parte, la diferencia en los resultados obtenidos. En el inicio de este proyecto, la sensibilidad en los métodos analíticos constituyó una importante limitación. Los protocolos estaban adecuados a modelos con mayores cantidades de glucógeno y que eran con los que tradicionalmente se había trabajado en el laboratorio. Por ello, hubo de optimizar diversas técnicas para aumentar la sensibilidad y poder obtener así resultados fiables. En primer lugar fue necesaria la implementación de un método de determinación de glucógeno más sensible al que se utilizaba hasta el momento, al trabajar con un modelo que acumulaba cantidades de glucógeno mucho menores que el músculo o hígado. Por otro lado, únicamente tras añadir un paso de amplificación adicional, se consiguió detectar por inmunofluorescencia proteínas con baja expresión como la GS o GP. Al problema de la sensibilidad en la detección se sumó, además, la influencia en la detección de los enzimas de su distribución celular, que dependía del estado metabólico celular y, consecuentemente, de la disponibilidad de glucógeno. A pesar de que los niveles totales proteicos no variaban, la GS y GP eran prácticamente indetectables por técnicas de inmunofluorescencia bajo condiciones de hipoxia. Como se ha demostrado en el **Capítulo 2**, las neuronas poseen una potente capacidad de degradación de glucógeno, activada bajo condiciones de hipoxia, y que podrían modificar las cantidades de polisacárido en este tipo celular si el sacrificio del animal y obtención del cerebro no se llevara con suficiente rapidez. En conclusión, en estudios previos, la sensibilidad de los métodos utilizados y el cambio en la distribución celular de los enzimas podrían haber constituido dos importantes limitaciones a la hora de su correcta detección.

Finalmente, la posibilidad de poder establecer cultivos de neuronas a partir de animales que no expresaban GS en cerebro fue clave en la validación de los resultados y permitió, por un lado, la determinación inequívoca de cantidades de glucógeno significativas en neuronas al tener el blanco perfecto para las medidas (neuronas sin GS), y así como, por otro, establecer la importancia biológica del glucógeno.

Los resultados de esta tesis ofrecen nuevas respuestas y aclaraciones al metabolismo del glucógeno neuronal. Sin embargo, este trabajo plantea algunas cuestiones sobre las que podría ser muy interesante profundizar en un futuro. Prácticamente todo el estudio se ha realizado a partir de extractos neuronales totales. No obstante, los cultivos primarios de neuronas contienen una amplia variedad de tipos neuronales (por ejemplo neuronas excitatorias o inhibitorias), con lo que es probable que la respuesta específica de cada subtipo neuronal no sea equivalente en relación al metabolismo de glucógeno. De hecho, en la detección de la GS y GP por inmunofluorescencia en cultivos primarios, únicamente en un 30% de las células se podía detectar la proteína agregada. ¿Significa esto que el 70% restante no expresa el enzima? ¿O implica que solamente el 30% de las neuronas acumulan glucógeno y por ello la GS y GP se encuentran en forma agregada o de nuevo la baja sensibilidad de las técnicas enmascara los resultados? ¿Son aquellas neuronas que muestran una señal clara de GS las que también lo hacen para GP? Para la localización de la GP en cortes de cerebro de ratón adulto se utilizó como marcador neuronal la Parvalbúmina (PV), proteína presente en un tipo de interneuronas GABAérgicas. Se ha propuesto a este subtipo neuronal como aquel con mayores niveles de expresión de GS. El hecho de que se pudiera detectar claramente la GP en las neuronas PV+ sugiere que quizá las neuronas con mayor expresión de GS y GP sean, efectivamente, las mismas. En todo caso, este estudio requeriría continuaciones con anticuerpos que marcaran un tipo neuronal paralelo a la detección de GS o GP.

Se ha demostrado que la hipoxia activa tanto la degradación como la síntesis de glucógeno. Este hecho puede parecer difícil de explicar a primera vista, ya que el ciclo de glucógeno tiene un consumo neto de una molécula de ATP en una situación donde la neurona ya de por sí se encuentra energéticamente comprometida. Sin embargo, hay que tener en cuenta las condiciones en la que se ha llevado a cabo el análisis de la situación. La medida se hace tras un determinado tiempo de exposición a la hipoxia y constituye una medida estática, es decir, aporta información en aquel momento pero no dice nada respecto a la dinámica de los procesos durante las horas previas al análisis. No se puede descartar, por tanto, que el proceso de síntesis y degradación no ocurran simultáneamente, sino que puedan estar temporal y espacialmente separados. Dentro de

una neurona las demandas energéticas locales pueden ser distintas entre sí (necesitándose, por ejemplo, más energía en la terminal sináptica para la liberación de neurotransmisores que en el soma). Podría darse el caso que en aquella zona de la célula la molécula de glucógeno fuera degradada mientras que en otras zonas donde los requerimientos energéticos no fueran tan elevados, se produjera una síntesis de moléculas de glucógeno distintas. Por otro lado, no se ha medido la actividad neuronal durante la hipoxia. Es posible que la actividad varíe con el tiempo, y se produzcan picos de estimulación que implicarían picos de demanda energética en donde el glucógeno sería degradado. Entre estos picos de actividad, no obstante, el glucógeno sería re-sintetizado para asegurarse unas reservas para el próximo pico. Todas estas posibilidades no pueden esclarecerse analizando la situación en un momento determinado y partiendo del extracto neuronal total. Sería necesario un estudio *in vivo*, en donde se analizara los flujos metabólico y se siguiera el curso de una glucosa marcada durante toda la exposición a la hipoxia.

El metabolismo del glucógeno protege frente a la muerte en hipoxia. Sin embargo, el mecanismo que media esta protección no queda establecido. El hecho de que la activación de la GS inducida por la hipoxia sea bloqueada tras el tratamiento simultáneo del inhibidor de la GP y un antioxidante sugiere que el estrés oxidativo podría actuar como sensor para modificar los niveles de glucógeno e implicaría, a su vez, que estos podrían tener un papel en el tamponamiento del estado oxidativo. Debido a la alta tasa metabólica y a la baja capacidad de regeneración, las neuronas son especialmente sensibles al estrés oxidativo (Andersen 2004). Se han encontrado altos niveles de estrés oxidativo en las zonas que sufren procesos degenerativos, como son el hipocampo y córtex en pacientes con Alzheimer (Hensley, Maidt et al. 1998; Butterfield, Castegna et al. 2002), sustancia negra en pacientes con Parkinson (Dexter, Carter et al. 1989) y líquido cefalorraquídeo de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (Beal, Ferrante et al. 1997; Pedersen, Fu et al. 1998). Esto pone de manifiesto la importancia de los procesos celulares relacionados con el mantenimiento de los niveles de radicales libres. Sería, pues, muy interesante profundizar en la regulación mutua del estado oxidativo y la cantidad de glucógeno para esclarecer si el metabolismo de glucógeno podría utilizarse como agente protector, no solamente en la hipoxia, sino en el resto de patologías mencionadas.

La función principal propuesta inicialmente para el glucógeno en el cerebro fue como reserva energética en situaciones de limitación de nutrientes. Sin embargo, la visión del glucógeno como mera reserva de energía está siendo modificada durante la última década debida, en parte, a su baja concentración, pero también a la escasez de situaciones en las que el cerebro se ve realmente

sometido a un abastecimiento limitado de metabolitos. En consecuencia, se ha demostrado la importancia del glucógeno para el correcto funcionamiento de procesos no patológicos como son el establecimiento de la memoria o la respuesta eléctrica neuronal bajo diversos estímulos. Aunque la relevancia biológica del glucógeno en la neurona solamente se ha demostrado en una condición de estrés, el siguiente paso sería comprobar si este metabolismo es importante para su correcto funcionamiento en situaciones fisiológicas. Así, sería importante analizar su impacto en procesos celulares como la actividad eléctrica o las despolarizaciones espontáneas. De esta manera se corroboraría la importancia del glucógeno para la neurona demostrando un rol en condiciones normales. En experimentos a más largo término, se podrían repetir los experimentos realizados en animales para esclarecer la función del glucógeno cerebral, exclusivamente atribuida a astrocitos, en animales genéticamente modificados que carecieran de la GS específicamente en neuronas. Se podría estudiar así si el metabolismo del glucógeno neuronas podría tener un papel, por ejemplo, en procesos vitales como el correcto establecimiento de la memoria.

En conclusión, esta tesis muestra que las neuronas tienen un metabolismo activo de glucógeno y que éste juega un papel crucial en la supervivencia neuronal bajo condiciones de estrés, en este caso la falta de oxígeno. Estos resultados introducen un nuevo jugador en el ya de por sí complicado escenario de la energética del cerebro y tendrían que tenerse en cuenta a la hora de analizar las funciones propuestas para el glucógeno cerebral. Asimismo, considerando la alteración de la homeostasis energética neuronal que se encuentra en tantas patologías, estos resultados podrían, incluso, tener implicaciones para fines terapéuticos.

## **VII. CONCLUSIONES**



## **CONCLUSIONES**

1. Las neuronas acumulan glucógeno. Sin embargo, su concentración es muy inferior al del resto de células. La Glucógeno Sintasa (GS) se encuentra en el soma de las neuronas, distribuida en forma de agregados, que corresponde al patrón característico de la GS unida a glucógeno.
2. Las neuronas poseen la maquinaria necesaria para la degradación de glucógeno. Esta capacidad de degradación es muy alta, capaz de degradar los altos niveles de glucógeno que han acumulado por la sobre-expresión del mutante activo de la GS (MGS-9A) los modelos *in vitro* e *in vivo*.
3. Las neuronas expresan la isoforma cerebral de la Glucógeno Fosforilasa (GP), a diferencia de los astrocitos, que también expresan la muscular. Esta isoforma está presente tanto en neuronas en cultivo como en neuronas de cortes de cerebro de ratón adulto.
4. La hipoxia cursa con una activación de la GS. La activación de la GS en hipoxia es un proceso independiente del factor de transcripción HIF 1 $\alpha$  pero dependiente de la degradación de la molécula de glucógeno y de los niveles celulares de estrés oxidativo. En condiciones de hipoxia, la GS sintetiza glucógeno activamente, aunque los niveles netos del polisacárido disminuyen. La coexistencia de síntesis y degradación da lugar a un ciclo aparentemente fútil.
5. En condiciones de reoxigenación las neuronas acumulan glucógeno por encima de los niveles iniciales, de manera análoga a lo que sucede en cerebro. En este período de reoxigenación se normaliza la actividad de la GS.

6. Las neuronas que carecen la GS tienen una mortalidad más elevada en hipoxia que aquellas que sí que expresan el enzima. De forma similar, las moscas con niveles reducidos de GS específicamente en neuronas muestran un empeoramiento en la respuesta tras un período de bajo oxígeno.
  
7. El metabolismo del glucógeno forma parte de la maquinaria de protección de la neurona para resistir a la hipoxia., lo que se ha demostrado tanto *in vitro* (cultivos celulares), como *in vivo* (*Drosophila melanogaster*).

## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS**

#### **1.1 Cultivos primarios de neuronas WT**

Los cultivos de neuronas se obtuvieron a partir del telencéfalo de embriones de ratón de día embrionario 16 (ratones OF-1, Charles River Laboratories), tal como se ha descrito en (Simo, Pujadas et al. 2007).

Los cerebros de los embriones fueron diseccionados en PBS que contenía glucosa al 0.6% (p/v, Sigma). Después de extraer las meninges, se disoció mecánica y enzimáticamente el telencéfalo con tripsina (0.25%, Invitrogen). Las células disociadas se sembraron en placas (Nunc) pretratadas con poli-L-lisina (10 µg/ml, Sigma) y se cultivaron en medio Neurobasal (Invitrogen) sin suero y suplementado con L-glutamina (2 mM, Invitrogen), D-(+)-glucosa (30 mM, Sigma), bicarbonato sódico (5 mM, Invitrogen), penicilina/ estreptomicina (100 U/ml y 100 mg/ml, Invitrogen) y suplemento B27 (1/50, Invitrogen).

Tras un día en cultivo, las células fueron tratadas con los compuestos antimitóticos Uridina/ 5-fluoro-2'-deoxiuridina (50 µg/ml y 20 µg/ml, Sigma) para minimizar la contaminación astrocítica. La pureza neuronal de los cultivos se determinó por inmunocitoquímica con anticuerpos específicos de neuronas (anti tubulina-β-III (TUJ1), BABCO) y de astrocitos (anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP), Dako). Excepto en los casos especificados, las células fueron mantenidas en cultivo durante 5 días (DIV 5).

#### **1.2 Cultivos primarios de neuronas GS KO**

Las neuronas GS KO fueron generadas a partir de un modelo condicional de GS KO basado en el sistema loxP-CRE, en el que varios exones del gen de la GS están flanqueados por dos elementos loxP. La recombinación de estos elementos loxP mediada por la recombinasa CRE resulta en la escisión de los exones flanqueados y en la consecuente inactivación del gen (Sauer and Henderson 1988). Este modelo condicional se puede cruzar con diversos animales que expresan

la recombinasa CRE de manera específica de tejido para obtener la inactivación del gen en células o tejidos determinados. Para obtener neuronas GS KO se cruzó el modelo condicional de GS con animales que expresan la CRE Recombinasa bajo el promotor de la Nestina (Duran et. al., 2012, enviado). Este promotor induce la expresión de la CRE en precursores neuronales y gliales a partir del día 11 de embriogénesis (Tronche, Kellendonk et al. 1999). Como en el momento de la obtención de las células neuronales no se conocía el genotipo de cada embrión, era necesario llevar a cabo el aislamiento neuronal de manera independiente para cada individuo. El procedimiento en la obtención de neuronas era equivalente al descrito en el **Apartado 1.1**, pero, tras la disección de los cerebros en PBS-glucosa, cada cerebro fue dissociado de manera individual y diferenciada del resto de cerebros. Paralelamente a las placas sembradas para los experimentos, se sembró un remanente de células procedentes de cada embrión, que fueron tratadas con los antimitóticos de manera equivalente al resto. El día DIV5 las neuronas fueron congeladas y se determinó la presencia de GS por electroforesis e inmunodetección.

### **1.3 Exposición a hipoxia**

Tras cinco días en cultivo, se cambió el medio de las neuronas con medio fresco Neurobasal sin antimitóticos. Las células fueron expuestas a hipoxia en un incubador de niveles regulables de oxígeno (IN VIVO<sub>2</sub> 200, Ruskin). El incubador se encontraba a 37°C, y el contenido gaseoso era 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 94% N<sub>2</sub>. Excepto en los casos especificados, se incubaron las células durante 4h. Tras este período, el medio fue aspirado dentro del incubador, y las placas fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido para su posterior análisis bioquímico, o fijadas en paraformaldehído para análisis inmunocitoquímicos.

## 2. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y FLUJOS METABÓLICOS

### 2.1 Determinación de la tasa de síntesis de glucógeno

La tasa de síntesis de glucógeno se determinó incubando las neuronas con 15  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  Glucosa (Perkin Elmer Life Science) en medio Neurobasal con 25 mM glucosa. Tras la incubación, las neuronas fueron lavadas tres veces con NaCl 150 mM y se extrajo el glucógeno con NaOH 0.1M. Se desproteinizó el extracto con una solución de ácido tricloroacético 10% (p/v) y glucógeno. Se precipitó el glucógeno con etanol 66% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El precipitado resultante se dejó secar, se resuspendió en 150  $\mu\text{l}$  de agua durante 1h a  $42^{\circ}\text{C}$  y se introdujo en viales que contenían líquido de centelleo *Ecolite* (MP). Se determinó la radioactividad presente en el glucógeno con un contador de centelleo *Rack BETA 1217* (LKB).

Para conocer la radioactividad específica, se midió la radioactividad presente en una alícuota de medio de cultivo (10  $\mu\text{l}$ ). Los resultados fueron expresados como nmol de glucosa incorporada por mg de proteína.

### 2.2 Determinación de la cantidad de glucógeno por método espectrofotométrico

En los modelos que acumulaban mayor cantidad de glucógeno, como es el caso de las neuronas que sobre-expresaban el mutante activo MGS-9A, y los cerebelos de los ratones MGS-9A<sup>Pcp2</sup>, se determinó la cantidad de glucógeno a través del método espectrofotométrico, que era el que tradicionalmente se había utilizado en nuestro laboratorio.

Para la determinación a partir de extractos celulares, se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de una solución de KOH al 30% por placa de 100 mm de diámetro y, con ayuda de una rasqueta, se recuperó todo el contenido. En el caso de los cerebelos, se homogeneizaron con 600  $\mu\text{l}$  de KOH por cada 100 mg de tejido. Los extractos alcalinos se incubaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, y la cuantificación de glucógeno se realizó siguiendo el ensayo de amiloglucosidasa (Chan and Exton 1976). Se añadieron los extractos sobre papel 31-ET (Whatman) y, una vez secos, se sumergieron los papeles en etanol al 66% a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Se hicieron dos lavados de 20 minutos con etanol al 66% a temperatura ambiente, se pasaron los papeles por acetona para extraer el agua que pudiera quedar y se dejaron secar por completo. Los papeles se depositaron en tubos que contenían 1 ml de una solución de amiloglucosidasa (25 U/l) preparada en tampón de acetato de

sodio 100 mM a pH 4.8, y se incubaron a 37°C durante 90 minutos y en agitación. Este período de incubación permitía que la amiloglucosidasa hidrolizase el glucógeno dando lugar a moléculas de glucosa. La concentración de esta glucosa era la que posteriormente se analizó mediante la técnica de la hexoquinasa / G-6-P-deshidrogenasa (Bergmeyer 1974) disponible en forma de ensayo comercial (Glucose HK CP, ABX Pentra) y adaptada al autoanalizador Cobas Bio (ABX Diagnostics). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de glucógeno por  $\text{mg}$  de proteína en el caso de las células, o por  $\text{mg}$  de tejido en el caso de los cerebelos.

### **2.3 Determinación de la cantidad de glucógeno por método de fluorescencia**

Para el estudio de células con niveles bajos de glucógeno fue necesario el desarrollo de una variante del método tradicional. Este nuevo método estaba basado en la determinación final a través de fluorescencia y no a través de absorbancia, hecho que aumentaba la sensibilidad de la detección más de 50 veces.

Como en el método tradicional, se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de una solución de KOH al 30% por placa de 100 mm de diámetro y se incubaron los extractos alcalinos a 100°C durante 15 minutos. Sin embargo, la precipitación de glucógeno se realizó en solución, añadiendo etanol frío al 100% a los extractos hasta llegar a concentración final del 66%. Esta mezcla se dejó precipitando a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 4°C y 15 000 rpm la solución, y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 66% a temperatura ambiente. El sedimento final se secó durante 2 horas a 37°C y se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de una solución de amiloglucosidasa a 37°C y en agitación. La concentración de glucosa se determinó utilizando un protocolo basado en (Zhu, Romero et al. 2009). En éste, se mide la cantidad de G-6-P a través de su conversión a 6-fosfogluconato, con la formación de NADPH. El NADPH es sustrato, a su vez, de la reacción de la diaforasa, enzima que convierte el compuesto no fluorescente resazurina en el compuesto fluorescente resorufina. Añadiendo un paso previo, en donde la glucosa era convertida a G-6-P por la acción de la hexoquinasa, se podía determinar la concentración de glucosa en una solución en función de la fluorescencia emitida por la resorufina. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de glucógeno por  $\text{mg}$  de proteína.

## **2.4 Determinación de los niveles de G-6-P**

La concentración intracelular de G-6-P se midió mediante un protocolo basado, como en el apartado anterior, en (Zhu, Romero et al. 2009), en la fluorescencia generada a punto final por el compuesto resorufina.

Para la determinación de los niveles de G-6-P era clave no realizar ningún lavado de los cultivos celulares con PBS, ya que supone un ayuno puntual de las células, con la consecuente variación en los niveles intracelulares de G-6-P.

Se añadieron 100  $\mu$ l de  $\text{HClO}_4$  al 10% por placa de 60 mm, que precipitaba las proteínas pero dejaba soluble los metabolitos. Los extractos se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C y 15 000 rpm y se recogió el sobrenadante, que contenía la G-6-P. El precipitado se hirvió con 150  $\mu$ l de KOH al 30% durante 15 minutos y se utilizó para determinar la concentración proteica de las muestras. Para poder hacer una determinación enzimática del sobrenadante, se neutralizó hasta pH 7 con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  5M. Para visualizar los cambios de pH, se añadieron 10  $\mu$ l de líquido indicador universal (Merck). Como en la reacción de neutralización se formaba el precipitado  $\text{KClO}_4$ , las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 4°C y 15 000 rpm y se recuperaba el sobrenadante. Los niveles de G-6-P se detectaron por fluorescencia mediante las mismas reacciones que para la determinación de glucógeno, pero, en este caso, sin la reacción de la hexoquinasa. Los resultados fueron expresados como nmol de G-6-P por mg de proteína.

## **2.5 Determinación de los niveles de UDP glucosa**

Para la determinación de los niveles de UDP glucosa se utilizó un protocolo equivalente al del análisis de los niveles de G-6-P. Las células fueron raspadas con 100  $\mu$ l de  $\text{HClO}_4$  al 10% por placa de 60 mm. Los extractos fueron centrifugados, neutralizados con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  5M y centrifugados de nuevo, recuperando el sobrenadante. Se analizó la concentración de UDP Glucosa en el sobrenadante por fluorescencia, utilizando como primer enzima la UDP glucosa deshidrogenasa, que genera UDP glucoronato y NADH. El enzima diaforasa puede catalizar la reacción de la resazurina utilizando tanto NADPH como NADH como sustrato. A la reacción de la UDP glucosa deshidrogenasa se acopló, por tanto, la de la diaforasa, midiendo la fluorescencia generada por la resorufina. Los resultados fueron expresados como nmol de UDP Glucosa por mg de proteína.

### **3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

#### **3.1 Determinación de la actividad GS**

La actividad enzimática se determinó midiendo la incorporación de UDP-[<sup>14</sup>C]-glucosa a glucógeno (Thomas, Schlender et al. 1968).

Las células se homogeneizaron a 4°C en 200 µl de tampón de homogeneización (Tris-HCl 10 mM pH 7.0, KF 150 mM, EDTA 15 mM, 2-mercaptoetanol 15 mM, sacarosa 0.6 M, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml, benzamidina 1 mM, ácido ocláico 25 nM, PMSF 1 mM y ortovanadato sódico 1mM) por placa de 60 mm de diámetro. La presencia del ión fluoruro en el tampón de homogeneización inhibe la actividad proteína fosfatasa que pueda tener el extracto celular. El EDTA se añade para secuestrar los iones magnesio, necesarios para la actividad proteína quinasa responsable de la fosforilación del enzima. Así, se evitan cambios en el estado de fosforilación del enzima durante la manipulación de las muestras. Los extractos celulares se pasaron 5 veces por jeringa de 25G y se utilizaron para la medida de la actividad.

En todos los casos la actividad GS se midió en ausencia y presencia de G-6-P. Para determinar la actividad glucógeno sintasa en ausencia de G-6-P se utilizó una solución formada por UDP-[<sup>14</sup>C]-glucosa 18 000 cpm/ µl, UDP Glucosa 6.7 mM, glucógeno 10 mg/ml, KF 25 mM, EDTA 20 mM, y Tris 50 mM ajustado a pH 7.8 con HCl. Si se determinaba en presencia de G-6-P se preparaba la misma solución pero cambiando la concentración de UDP-[<sup>14</sup>C]-glucosa a 8000 cpm/ µl y se añadía G-6-P 10.8 mM. La medida de la actividad en ausencia de G-6-P representa la forma activa del enzima, mientras que la medida en presencia de G-6-P representa la actividad total de la GS y depende de los niveles totales de proteína. La proporción de actividad – G-6-P / + G-6-P es una medida normalizada de la actividad enzimática.

Para la realización del ensayo, se depositaron 40 µl de la solución de ensayo en un baño de 30°C. Seguidamente se añadieron 20 µl de muestra y la mezcla se dejó incubar 60 minutos a 30°C. Una vez pasados los 60 minutos, se extrajeron 50 µl de la mezcla de reacción y se depositaron en un trozo de papel 31-ET (Whatman). El glucógeno se precipitó en el papel por inmersión del mismo en etanol 66% a una temperatura de -20°C durante 10 minutos. Después de dos lavados de 20 minutos con etanol 66% a temperatura ambiente, los papeles se pasaron por acetona y se secaron completamente. Los papeles secos se introdujeron en viales que contenían líquido de centelleo

*Ecolite* (MP). La radioactividad se contaba con un contador de centelleo *Rack BETA 1217* (LKB). La actividad GS se expresaba como mU por mg de proteína.

### **3.2 Determinación de la actividad GP**

La determinación de la actividad GP se midió a partir de células congeladas con el mismo tampón y bajo las mismas condiciones de incubación que se indican en el **Apartado 3.1** para la determinación de la actividad GS.

La actividad se midió mediante un ensayo radiométrico que consiste en la medida de la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa-1-fosfato siguiendo la técnica descrita por (Gilboe, Larson et al. 1972), en ausencia o presencia de diferentes efectores. El ensayo se basa en la incubación de la GP en unas condiciones en las cuales se sintetiza glucógeno en vez de degradarlo. Es una medida de la cantidad de glucógeno producida por la GP por unidad de tiempo y proteína. La GP se puede encontrar en forma fosforilada y activa (forma a) o en estado defosforilado e inactivo (forma b).

Para determinar la actividad GP se utilizó la siguiente mezcla de reacción: [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa-1-fosfato a la concentración de 75 mM (0.005mCi/mmol), KF 125 mM y glucógeno al 0.6%. Para determinar la forma a se añadía cafeína, que es un inhibidor de la forma b a la mezcla de ensayo a una concentración final de 1 mM. También se midió la actividad GP en presencia de su activador alostérico, AMP, a una concentración de 5 mM y que en el caso de la isoforma de cerebro (muy sensible a la activación por AMP), se podía tomar como una medida de la cantidad total de enzima.

El ensayo radiométrico de actividad se realizó de la misma manera que para la GS, a 30°C durante 60 minutos utilizando el mismo procedimiento y las mismas condiciones de ensayo. La actividad se expresó como ratio de actividades en presencia de cafeína / AMP.

## **4. DETERMINACIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS**

### **4.1 Concentración proteica**

La valoración de proteína se realizó mediante el método de Bradford (Bradford 1976). El método está basado en el cambio de azul brillante de Comassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. En una solución ácida, el azul brillante de Comassie, cuando se une a proteína, cambia su máximo de absorbancia de 465 nm a 595 nm.

Las muestras a analizar se diluyeron en agua milliQ hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. Como patrones se utilizaron diferentes diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) a unas concentraciones finales de 2, 4, 8, 12 y 16  $\mu$ g/  $\mu$ l. En todos los casos se añadieron 950  $\mu$ l del reactivo de Comassie (dilución 1/5 del colorante comercial *Bio-Rad protein assay*). Después de cinco minutos de incubación se midió la absorbancia de las muestras a 595nm, utilizando como blanco de ensayo 50  $\mu$ l de agua milliQ y 950  $\mu$ l de reactivo. Los resultados se expresaron como  $\mu$ g de proteína por  $\mu$ l.

### **4.2 Electroforesis e immunoblot**

La separación de proteínas por electroforesis e immunoblot, técnica conocida como *Western Blot*, se llevó a cabo con una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Laemmli 1970). El extracto proteico se trató con un tampón que contenía SDS y, por tanto, confería carga negativa a las proteínas, manteniendo constante la relación carga-masa. Las proteínas se corrieron en una malla de polímero acrilamida-bisacrilamida por acción de un campo eléctrico. La malla era de dos tipos: el primer gel, de poros grandes, era concentrador y permitía la acumulación de las proteínas en una banda discreta antes de pasar al segundo gel, que presentaba poros más pequeños y permitía la separación de diferentes proteínas en función de su peso molecular.

El extracto proteico disuelto en tampón de carga (glicerol 20% v/v, 2-mercaptoetanol 4% v/v, azul de bromofenol 60  $\mu$ g/ ml y Tris-HCl 125 mM pH 6.8) se calentó a 100°C durante 5 minutos. Se cargó la misma cantidad total de proteína en cada carril. Los geles utilizados eran de 10x8cm, 1.5 mm de grosor y 8-12% de acrilamida, en función del peso molecular de la proteína que se quería detectar. La diferencia de potencial utilizada era de 150-200V y el tampón de electroforesis estaba compuesto por Tris 25 mM, glicina 0.192 M y SDS 0.1% a pH 8.3.

La técnica de transferencia utilizada está descrita en (Gershoni and Palade 1983). Implicaba un montaje en el que la membrana de nitrocelulosa se depositaba sobre el gel, y el conjunto de comprimía. La transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana se realizó por electroforesis a un voltaje fijo de 100V durante 2h, a 4°C para evitar un sobre-calentamiento. El tampón utilizado estaba formado por Tris 20 mM, glicina 150 mM y metanol al 20% (v/v) a pH 8.3. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de rojo de *Ponceau*. Con esta tinción reversible de las proteínas se comprobaba que la transferencia había funcionado correctamente. Las membranas se destiñeron con un lavado de PBS, Tween-20 0.1% a pH 7.4.

Para la inmunodetección se realizaron los siguientes pasos:

- a) Bloqueo: Incubación de la membrana con solución de BSA al 3% (p/v) en PBS-Tween 0.1% durante 1 hora.
- b) Incubación con el anticuerpo primario: A la solución de bloqueo se añadía el anticuerpo específico para la proteína de interés. La membrana se incubaba por un período mínimo de una hora a temperatura ambiente hasta un máximo de 12 horas a 4°C. Para eliminar los restos de anticuerpo no unido se realizaban un mínimo de 3 lavados con PBS-Tween 0.1% de 10 minutos de duración.
- c) Incubación con anticuerpo secundario: A la solución de bloqueo se añadía el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP). La membrana se incubaba durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar los restos de anticuerpo no unido se realizaban un mínimo de 3 lavados con PBS-Tween 0.1% de 10 minutos de duración.
- d) Detección: La detección de las bandas correspondientes a la proteína de interés se conseguía mediante un método fotométrico. El revelado de las membranas se llevaba a cabo con una incubación de 5 minutos con una solución de luminol (*Chemiluminescent HRP kit*, Millipore). La HRP cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno y esto desencadena una reacción quimioluminiscente que, mediante unos films de radiografía, permite visualizar las diferentes bandas correspondientes a las proteínas de interés.

Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron: anticuerpo de conejo que reconoce la MGS (1/1000; Cell Signalling, 3893), anticuerpo de conejo que reconoce el residuo de serina 641

fosforilado (1/2000; Cell Signalling), anticuerpo de conejo contra GFP (1/5000, Immunokontakt), anticuerpos de pollo y cobaya que reconocen la GP de cerebro y de músculo, respectivamente (1/10 000, Eurogentec), anticuerpo de conejo que reconoce la proteína GFAP (1/1000, Dako), anticuerpo de ratón contra HIF1 $\alpha$  (1/1000, R&D Systems), anticuerpo de conejo que reconoce HIF2 $\alpha$  (1/500, Abcam), anticuerpo de ratón que reconoce la actina (1/200 000, Sigma).

Los anticuerpos secundarios unidos a la peroxidasa de rábano (HRP) que se utilizaron fueron los siguientes: Goat Anti Rabbit-HRP (1/30 000, GE Healthcare), Rabbit Anti Mouse-HRP (1/10 000, Dako), Donkey Anti Chicken-HRP (1/30 000, Chemicon), Goat Anti Guinea Pig-HRP (1/10 000, Jackson Immunoresearch).

## **5. TÉCNICAS DE IMMUNOFLUORESCENCIA**

### **5.1 Immunofluorescencia sobre cultivos de neuronas**

Las células sembradas en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células fueron lavadas tres veces con tampón PBS y los cubreobjetos fueron mantenidos en PBS con azida al 0.05% a 4°C hasta su uso para evitar una posible contaminación por hongos. La manipulación de los cubreobjetos se llevó a cabo con pinzas invertidas (A.Dumont & Fils).

El protocolo utilizado se realizó a temperatura ambiente y consistía en los siguientes pasos:

- a) Reducción: incubación con una solución de NaBH<sub>4</sub> en PBS (1 mg/ml) durante 10 minutos para reducir la autofluorescencia de la célula.
- b) Permeabilización: incubación con una solución de Tritón X-100 0.2% en PBS (v/v) durante 10 minutos.
- c) Bloqueo: para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos a las muestras los cubreobjetos fueron tratados con una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS y Tritón X-100 al 0.2% durante 10 minutos.
- d) Incubación con el anticuerpo primario: a una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS se añadía el anticuerpo específico para la proteína de interés. Los anticuerpos primarios utilizados fueron el anticuerpo monoclonal específico para glucógeno (cedido por el Dr.

Otto Baba, dilución 1/40), al anticuerpo de ratón contra tubulina  $\beta$ -III (1/1000, BabCO), anticuerpo de conejo contra GFAP (1/500, Dako). Siempre se utilizaban controles de especificidad del anticuerpo primario, que consistían en cubreobjetos con células fijadas que no eran tratadas con el anticuerpo. Los cubreobjetos se incubaban por un período de 1.5 horas. Pasado este período, se realizaban tres lavados con PBS, de 5 minutos de duración.

- e) Incubación con el anticuerpo secundario: a una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS se añadía el anticuerpo secundario específico conjugado a un fluoróforo. Esta solución se centrifugaba durante 5 minutos a 15 000rpm para precipitar posibles agregados de anticuerpo secundario. Al sobrenadante se le añadía Hoechst 33342 (1 mg/ml, Molecular Probes) para poder visualizar los núcleos celulares. Los anticuerpos secundarios utilizados eran TRITC Goat Anti Mouse IgM (1/100, Chemicon), Oregon Green Goat Anti Mouse IgG (1/200, Molecular Probes) y Alexa Fluor 546 Goat Anti Rabbit IgG (1/500, Molecular Probes). La incubación con el anticuerpo secundario era de 45 minutos y, una vez finalizada, se realizaban tres lavados con PBS, de 5 minutos de duración.
- f) Secado y montaje: los cubreobjetos se lavaban con agua destilada, con etanol al 96% y se dejaban secar al aire hasta su montaje sobre portaobjetos de vidrio. Los diferentes cubreobjetos se colocaban sobre una gota de Mowiol (Sigma), se presionaba para eliminar los restos de resina de montaje y se guardaban a 4°C hasta su visualización.

## **5.2 Inmunofluorescencia con amplificación de señal sobre cultivos de neuronas**

En el caso de antígenos presentes a bajas concentraciones, se aplicó un protocolo de amplificación de señal basado en la tecnología de la tiramida (Tyramide Signal Amplification, TSA, PerkinElmer Life Sciences) (Bobrow, Harris et al. 1989). La peroxidasa cataliza la reacción de la deposición de la tiramida, que a su vez está unida a un fluoróforo. Para la inmunofluorescencia, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, en un protocolo equivalente al descrito en el anterior apartado. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

- a) Saturación de la actividad peroxidasa endógena: Para saturar la actividad peroxidasa que la célula pudiera tener de manera endógena, las células se trataron con una solución de  $H_2O_2$  al 3% (v/v) durante 10 minutos. Para la eliminación de posibles restos de  $H_2O_2$  las células se lavaron tres veces con PBS, en lavados de 5 minutos de duración.

- b) Permeabilización: incubación con una solución de Tritón X-100 1% en PBS (v/v) durante 10 minutos
- c) Bloqueo: para bloquear las uniones inespecíficas se trataban con una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS, Tritón X-100 al 0.1% durante 10 minutos.
- d) Incubación con el anticuerpo primario: a una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS se añadía el anticuerpo específico para la proteína de interés. Los anticuerpos primarios utilizados fueron un anticuerpo policlonal de conejo contra la MGS producido por nuestro laboratorio (1/50, (Cid, Cifuentes et al. 2005)) y un anticuerpo policlonal de pollo contra la BGP (1/100, Eurogentec). En el caso de co-tinción con otros anticuerpos, cuya señal no iba a ser amplificada, los anticuerpos se añadían en este paso. Era el caso del anticuerpo de ratón contra tubulina  $\beta$ -III (1/1000, BabCO). Los cubreobjetos se incubaban por un período de 1.5 horas. Pasado este período, se realizaban tres lavados con PBS, de 5 minutos de duración.
- e) Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado: a una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS se añadía el anticuerpo secundario biotinilado. Se utilizaron el anticuerpo secundario biotinilado contra inmunoglobulina de conejo (1/200, Vector Laboratories) o contra inmunoglobulina de pollo (1/200, Vector Laboratories). Los cubreobjetos se incubaban por un período de 45 minutos. En el caso de incubación con diversos anticuerpos primarios, que tenían que provenir de diferentes especies, el anticuerpo secundario se añadía en este paso. Era el caso del Oregon Green Goat Anti Mouse IgG (1/200, Molecular Probes). Pasado este período, se realizaban tres lavados con PBS, de 5 minutos de duración.
- f) Incubación con estreptavidina: las células se incubaban con una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS durante 45 minutos con estreptavidina unida a la HRP (1/400, GE Healthcare). Pasado este período, se realizaban tres lavados con PBS, de 5 minutos de duración.
- g) Incubación con tiramida: las células se incubaban durante 10 minutos con tiramida (1/200, PerkinElmer Life Science), diluida en el tampón que proporcionaba la casa comercial durante 10 minutos. La tiramida, que a su vez estaba unida a un fluoróforo, se deposita en aquellas zonas reconocidas por los anticuerpos, gracias a la reacción enzimática mediada por la HRP. Pasado este período, se realizaban tres lavados con PBS, de 5 minutos de duración.

- h) Tinción de núcleos: a una solución de BSA al 3% (p/v) en PBS se añadía Hoechst 33342 (Molecular Probes, 1mg/ml). Se realizaban tres lavados con PBS de 5 minutos de duración.
- i) Secado y montaje: los cubreobjetos se lavaban con agua destilada, con etanol al 96%, y se dejaban secar al aire hasta su montaje sobre portaobjetos de vidrio. Los diferentes cubreobjetos se colocaban sobre una gota de Mowiol (Sigma), se presionaba para eliminar los restos de resina de montaje y se guardaban a 4°C hasta su visualización.

### **5.3 Inmunofluorescencia sobre cortes de cerebro de ratón**

La inmunofluorescencia se realizó con los cortes de 30  $\mu$ m en suspensión (técnica conocida como *free floating*), y con constante agitación.

- a) Permeabilización: incubación con Tritón X-100 0.1% (v/v) en PBS.
- b) Bloqueo: para bloquear las uniones de anticuerpo no específicas, los cortes se incubaban en una solución de Gelatina 0.2% (v/v), Suero Normal de Cabra al 10% (v/v), Glicina 0.2M y Triton X-100 al 0.3% (v/v) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente.
- c) Incubación con el anticuerpo primario: los anticuerpos primarios se disolvían en la solución de bloqueo a las concentraciones correspondientes. Los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo de pollo contra la BGP (1/100, Eurogentec), el anticuerpo de conejo contra la proteína parvalbúmina (1/1000, Swant) y el anticuerpo de conejo contra la GFAP (1/500, Dako). La incubación se llevó a cabo a 4°C toda la noche en una cámara húmeda. Tras la incubación, se realizaron tres lavados con PBS-Triton X-100 al 0.1% de 5 minutos de duración.
- d) Incubación con el anticuerpo secundario: los anticuerpos secundarios se disolvían en la solución de bloqueo y se centrifugaban durante 5 minutos a 13 000 rpm. Los anticuerpos utilizados fueron el Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (1/500, Molecular Probes) y el Alexa Fluor 546 Goat Anti-Chicken IgG (1/500, Molecular Probes). A la solución de anticuerpo secundario se añadía Hoechst 33342 para visualizar los núcleos celulares. La incubación se llevó a cabo durante 2 horas. Tras la incubación, se realizaron tres lavados con PBS-Triton X-100 al 0.1%, y 3 lavados con PBS, todos de 5 minutos de duración.
- e) Montaje: Los cortes se disponían sobre un portaobjetos (START FROST) y, aplicando unas gotas de Mowiol, se colocaba un vidrio encima para su posterior visualización.

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, E1000) y en un microscopio confocal con una detección espectral (Leica TCS SPE).

## **6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **6.1 Purificación y retrotranscripción de RNA**

Para la purificación de RNA se utilizó el método de purificación por columna de afinidad (RNAeasy, Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

En el caso de las células en placa, se añadía 350 µl de tampón RLT a las placas, y el extracto celular se pasaba 5 veces por jeringa de 25G. Para precipitar el RNA, se añadía 350 µl de etanol al 70%, y el contenido total era pasado a una columna, que se centrifugaba a 11 000g durante 1 minuto. Posteriormente se lavaba la columna con tampón RW1 y RPE. El RNA era recuperado con 50 µl de agua libre de RNAsas.

En el caso de la purificación de RNA a partir de cabezas de *Drosophila melanogaster*, se partía de 5 cabezas por muestra, que eran homogeneizadas con un homogeneizador adaptado para muestras pequeñas (VWR Pellet Mixer, VWR) en tampón RLT suplementado con 2-mercaptoetanol (48 mM). Previo lavado de la columna, la muestra era tratada con DNasa durante 30 minutos para eliminar el DNA genómico. Finalmente, el RNA era recuperado en 30 µl de agua libre de RNAsas.

Para la cuantificación de RNA se utilizó un analizador Nanodrop (Thermo Scientific).

La retrotranscripción se realizó con hexámeros degenerados como cebadores para poder amplificar el 18S ribosomal, utilizado para normalizar los valores de mRNA de cada gen. El 18S ribosomal no contiene cola poli-A y no puede ser amplificado, por tanto, con un polímero de deoxitimidinas. La reacción se realizaba utilizando el *Super Script III First-strand síntesis super mix* (Invitrogen), que contiene la transcriptasa reversa del virus MML, que incorpora deoxinucleótidos a un cebador utilizando RNA como molde. A 1 µg de RNA añadimos 1 µl de hexámeros degenerados (2.5 ng/ µl) y 1 µl de tampón de hibridación. Esta mezcla se incubó

durante 5 minutos a 65°C y se dejó enfriar a 4°C. A continuación se añadieron 10 µl de mezcla de reacción 2X que incluía MgCl<sub>2</sub> (10 mM), los nucleótidos (10 mM) y 2 µl de enzima.

## 6.2 PCR cuantitativa en tiempo real

Esta técnica permite cuantificar la expresión de un gen determinado relativa a un gen cuya expresión no varía en las distintas condiciones. Para tal fin, se amplificó mediante una reacción de PCR el DNA complementario (cDNA) procedente del RNA purificado de las muestras a analizar con sondas específicas para el gen que se quería medir. Las sondas están generadas según la tecnología *Taqman* (Applied Biosystems), en la que para cada gen se diseñan un par de cebadores y una sonda híbrida en la región que se quiere amplificar. Esta sonda presenta un fluorocromo y un amortiguador de fluorescencia en cada extremo. Solo cuando la actividad 3'-5' exonucleasa de la DNA polimerasa la degrada porque está amplificando la región donde la sonda está hibridada, se separan el fluorocromo del amortiguador, y se emite fluorescencia. La fluorescencia será proporcional a la cantidad de DNA amplificado, que a su vez es proporcional al número de copias de cDNA iniciales en cada muestra. La fluorescencia se determina a tiempo real, ya que si se midiera a punto final la PCR podría saturarse. Así pues, se acopla un detector de fibra óptica al termociclador que determina la fluorescencia en el tubo de cada muestra en cada ciclo. El perfil que se obtiene es una curva sigmoidea, en la que se determinará el ciclo de la PCR en donde se encuentra el punto de inflexión y que solo depende de la cantidad de cDNA de la muestra inicial. Por tanto, obtendremos un número de ciclo (Ct) para cada gen de cada muestra.

Al valor de Ct de cada gen de cada muestra se le resta el Ct de un gen constitutivamente expresado, cuya expresión no varía en las diferentes condiciones analizadas. En el caso de las neuronas se utilizó el RNA ribosomal 18S y en el caso de la *Drosophila melanogaster* la proteína ribosomal RpL32. De esta manera se obtuvo el valor  $\Delta Ct$ . Se tomó como referencia una de las muestras, por ejemplo, la media del valor de las muestras control de cada experimento, y se restó este valor al resto de muestras, obteniendo el  $\Delta\Delta Ct$ . La función  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  permite comparar cuantas veces se expresa un determinado gen en una muestra en concreto respecto a la muestra control.

Para realizar la PCR cuantitativa se prepararon 25 µl de solución de *Taqman PCR Universal Master Mix*, que contiene tampón, nucleótidos y la DNA polimerasa, 2.5 µl de la sonda del gen de interés y 5 µl de cDNA (unos 33.5 ng) de la muestra a analizar que se encontraba a una concentración de 6.7 ng/ µl. Se añadieron 10 µl de esta mezcla a cada pozo en una placa de 384 pozos. Una vez

cargada, la placa se analizó con el termociclador *ABI Prism HT-7900* (Applied Biosystems). El perfil de temperaturas consistía en 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturalizar el DNA y 1 minuto a 60°C para hibridar la sonda, los cebadores y amplificar. Los resultados se analizaron con la ayuda del programa SDS para el cálculo de las Ct.

## **7. GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES**

El uso de virus recombinantes es una técnica ampliamente utilizada para la transferencia génica y tiene una eficiencia muy alta respecto a otras técnicas de transferencia génica, como, por ejemplo, la transfección. En el caso de cultivos primarios de neuronas, el uso de virus recombinantes constituye prácticamente la única manera de transferir material génico, por lo que la generación de los mismos es imprescindible tanto para poder sobre-expresar proteínas, como para silenciar genes de interés.

### **7.1 Amplificación de adenovirus**

Para amplificar los adenovirus que previamente se habían generado en nuestro laboratorio, se utilizó una modificación del protocolo descrito en (Becker, Noel et al. 1994). Esta modificación permitía aumentar la concentración de virus más de 100 veces. De esta manera se podían utilizar volúmenes aceptables para infectar los cultivos primarios de neuronas, ya que requerían multiplicidades de infección (MOIs) más elevadas que la mayoría de células.

Los adenovirus recombinantes usados como vectores carecen del gen endógeno E1A, requerido para su replicación. Por lo tanto, estos vectores se consideran incompetentes para la replicación, reduciendo el riesgo de propagación en el caso de infección accidental. La amplificación consiste en infectar grandes cantidades de placas con células HEK293 A. Esta línea celular tiene transfectado establemente el gen E1A del adenovirus, que por complementación con el genoma defectivo del adenovirus, permite la replicación de estos vectores adenovirales. En el momento de infección las células se encontraban a un 80-90% de confluencia y se infectaron con el menor volumen posible de medio, para aumentar su eficiencia (4 ml en el caso de utilizar placas de 100 mm de diámetro). Tras 2 horas de infección, el medio de infección se reemplazó con medio con bajo contenido de suero fetal bovino (0.5% v/v), para evitar la replicación celular.

Las células fueron mantenidas *in vitro* hasta el momento en que se comenzó a observar lisis celular y en el cual aproximadamente el 80% de las células presentaban una morfología circular e inflada como consecuencia de la formación de partículas víricas en su interior. En este momento se recogió casi la totalidad del medio de cultivo. Con los ml que quedaban en la placa, se levantaron las células y la suspensión se añadió al resto de medio recogido. La suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas con 1 ml de PBS. Esta suspensión celular fue sometida a 4 ciclos de congelación y descongelación para lisar las células y liberar los adenovirus. Por último, tras el último ciclo de descongelación, la suspensión fue centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm y el sobrenadante, donde se encontraban los adenovirus, fue filtrado utilizando filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ .

## **7.2 Infección de células con adenovirus**

Los cultivos primarios de neuronas fueron infectados durante 12-16 horas con los adenovirus recombinantes el día 3 de cultivo. Después de eliminar el medio de infección que contenía los virus, las células infectadas se mantuvieron durante 36 horas más con el medio de cultivo suplementado con los antimetabólicos. Tras 36 horas (correspondiente al día de cultivo 5), se realizaron los experimentos de hipoxia.

## **7.3 Generación de lentivirus**

Las partículas víricas que contenían el RNA de interferencia (sh RNA) contra el gen HIF1 $\alpha$  fueron obtenidas cotransfectando los vectores pLKO.1-puro, que contenía el shRNA para HIF1 $\alpha$  (MISSION shRNA Library, Sigma) junto con los vectores empaquetadores pRRE, pRSV y VSV-G. Los vectores pRRE y pRSV contenían la cantidad mínima de genes víricos necesarios para la generación de la estructura proteica del virion y la adquisición de las funciones de ensamblaje (Dull, Zufferey et al. 1998). El vector VSV-G ampliaba el tropismo del lentivirus. Estos vectores fueron cotransfectados en la línea celular HEK293 T. Esta línea expresa de manera estable el antígeno T del virus SV40 que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados y que contienen el origen de replicación SV40. La cotransfección se llevó a cabo utilizando polietilenimina (PEI, Polysciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. El PEI condensa el DNA en partículas cargadas positivamente, que se unen a la superficie aniónica de la célula y entran dentro de la misma vía endocitosis.

Las partículas del lentivirus fueron obtenidas tras 24 y 48 horas de cotransfección. Se recogió el medio de incubación, que contenía las partículas víricas, y estas fueron centrifugadas durante 2h a 18 000 g a 4°C. Se aspiró el sobrenadante, dejando 2 ml por tubo. El resto de medio fue utilizado para resuspender los lentivirus, que, posteriormente, fueron filtrados con un filtro de 0.22 µm y guardados a -20°C.

#### **7.4 Infección de células con lentivirus**

Los cultivos primarios de neuronas fueron infectados durante 12-16 horas con los lentivirus recombinantes el día 1 de cultivo. Tras el período de infección, el medio fue repuesto por medio Neurobasal fresco que contenía antimetabólicos. El día de cultivo 5 las células fueron expuestas a hipoxia y la eficiencia del silenciamiento de HIF1α fue analizada mediante análisis por *Western Blot*.

### **8. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR**

La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el kit *Live Dead Cell Staining kit* (Abcam). Este método está basado en la exclusión celular de dos fluoróforos en función de la integridad de la membrana plasmática.

Las neuronas fueron crecidas en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina e incubadas durante distintos tiempos en hipoxia. A continuación, las células fueron incubadas con una solución de yoduro de propidio y calceína (1/2000) durante 15 minutos a 37°C. El yoduro de propidio (emisión máxima a 617 nm) es impermeable a las células y solamente puede penetrar cuando la membrana plasmática contiene poros, situación que se da cuando la célula está muerta. En cambio, la calceína (emisión máxima a 515 nm) difunde libremente a través de la membrana plasmática y no discrimina, por tanto, entre células vivas o muertas. Tras la incubación, los cubreobjetos fueron visualizados en un microscopio de fluorescencia (Nikon E1000) y se tomaron fotografías de manera aleatoria. El porcentaje de células muertas se estimó por conteo celular en diez campos de 5 a 8 cubreobjetos pertenecientes a tres experimentos independientes (500-600 células en total).

## 9. PROCEDIMIENTO CON *Drosophila melanogaster*

La *Drosophila melanogaster* es una especie que posee un reducido número de cromosomas (4 pares), breve ciclo de vida (15-21 días) y aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el genoma de las moscas de la fruta. Además, el 50% de las secuencias proteínicas de la mosca tiene análogos en los mamíferos (Reiter, Potocki et al. 2001).

### 9.1 Obtención de las diferentes líneas

Las modificaciones genéticas se pueden realizar en un tejido específico haciendo uso del sistema Gal4-UAS. Este sistema fue desarrollado por Andrea Brand y Norbert Perrimon en 1993 (Brand and Perrimon 1993) y consta de dos partes: la inserción del gen GAL4, que codifica para la proteína de levadura activadora de la transcripción, y la secuencia UAS (Upstream Activation Sequence), un elemento activador al cual se une GAL4 específicamente para la activación de la transcripción de un gen determinado. La expresión de GAL4 puede ser modulada dependiendo el promotor bajo el cual esté condicionado. Así, se utilizó un promotor específico de neuronas, el gen *elav* (Robinow and White 1988), para sobre-expresar el transgén específicamente en este tipo celular.

Las líneas *elav-GAL4*, *UAS-GFP* y *UAS-GSi III* fueron obtenidas del Centro Bloomington, en Austria. La línea *UAS-NIG III* se consiguió a través del *National Institute of Genetics Fly Stock Center*, en Japón. La línea de moscas que sobre-expresaba la forma humana de la MGS se generó en nuestro laboratorio (Duran, Tevy et al. 2012). Para obtener las diferentes líneas de moscas se cruzaron hembras vírgenes que contenían el gen *elav-GAL4* en homocigosis con machos que contenían los shRNA insertados en ambos cromosomas o con machos que contenían la MGS.

### 9.2 Exposición a hipoxia

El protocolo utilizado para los experimentos de hipoxia está basado en un estudio descrito en (Haddad, Sun et al. 1997). Las moscas de siete días fueron separadas según el género y genotipo. Grupos de 16-20 moscas fueron colocados en tubos que contenían una malla de nylon, que permitía el intercambio de gases. Los tubos se introdujeron en un incubador de hipoxia (IN VIVO<sub>2</sub> 200, Ruskin) durante 1 hora a 0.6% de O<sub>2</sub> y 99.4% de N<sub>2</sub>. Tras pocos minutos de hipoxia,

las moscas perdieron la coordinación y las funciones motoras y cayeron al fondo del tubo. Durante el resto de la exposición, las moscas permanecieron inmóviles. Después de la hipoxia, se extrajeron las moscas del incubador y fueron expuestas de nuevo a oxígeno ambiental. Se estimó el tiempo de recuperación, tomando como referencia el tiempo que tardaban las moscas desde que se extraían del incubador hasta que recuperaban sus funciones motoras y cruzaban una línea arbitraria trazada a 2 cm del fondo del tubo. El experimento se repitió 10 veces con moscas de tres cruces independientes, con un número total de moscas por grupo entre 160-180, aproximadamente.

### **9.3 Obtención de muestra para análisis de glucógeno y mRNA**

Para el análisis de glucógeno, las moscas de los distintos genotipos fueron expuestas a hipoxia durante 1 hora a 0.6% de O<sub>2</sub> y 99.4% de N<sub>2</sub>. Tras la incubación, las moscas fueron extraídas de la cámara y rápidamente congeladas en nitrógeno líquido. Se guardaron las moscas a -80°C hasta su procesamiento. Para la determinación de glucógeno, las moscas fueron diseccionadas, y se aisló la cabeza. Se utilizaron 5 cabezas por muestra y se procedió a la extracción mediante KOH, como se detalla en el **Apartado 2.3**.

En el caso de la purificación de RNA, las moscas de los distintos genotipos fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su procesamiento. Para el aislamiento de RNA, las moscas fueron diseccionadas, y se separó la cabeza. Se utilizaron 5 cabezas por muestra.

## **10. PROCEDIMIENTO CON ANIMALES**

### **10.1 Condiciones generales de estabulación**

Todos los procedimientos utilizados fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Parque Científico de Barcelona y se llevaron a cabo siguiendo las directrices del *European Community Council Directive* y *National Institute of Health*. Los ratones tenían acceso libre a pienso y agua. Estaban estabulados a una temperatura de 22°C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas en condiciones de esterilidad de la Plataforma de Investigación Aplicada en Animal de Laboratorio del Parque Científico de Barcelona. Se utilizaron ratones de la cepa C57/b6 de distintas edades, según el experimento a realizar.

## **10.2 Perfusión con paraformaldehído**

Para la obtención de muestras histológicas, los ratones de 40 semanas fueron anestesiados con tiobarbital (100  $\mu$ l / 22 g de peso), y perfundidos con paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros fueron extraídos y fijados toda la noche con la misma solución de paraformaldehído, crioprotegido con sacarosa al 30% (p/v) en PBS y congelados en una solución de 2-metilbutano. Fueron seccionados a 30  $\mu$ m con un criostato (Criostato CM 1900, Leica) a una temperatura de -80°C y guardados a -20°C hasta su posterior análisis por inmunofluorescencia.

## **10.3 Perfusión con solución de salino**

La generación de los animales MGS-9A<sup>Pcp2</sup> está descrita en (Duran, Tevy et al. 2012). Ratones de 8 semanas de edad fueron anestesiados con una solución de tiobarbital (100  $\mu$ l / 22 mg de peso, Brain). El control del plano anestésico fue observar la ausencia de reflejos, en este caso, del reflejo caudal. A continuación fueron perfundidos intracardiácamente con una solución salina (NaCl) 150 mM. Tras cinco minutos, se aisló el cerebelo y se congeló en nitrógeno líquido, para la posterior determinación de glucógeno.

## **11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores obtenidos están representados como la media  $\pm$  s.e.m. (error estándar de la media). Excepto indicado, la significancia estadística fue analizada con el test *t-Student* utilizando el software *GraphPad Prism*. Se consideraron diferencias significativas las medidas que daban una probabilidad inferior a 0.05.

Para el análisis estadístico del tiempo de recuperación de las moscas, se ajustó un modelo de riesgos proporcionales de Cox (Cox 1972). Se obtuvieron los valores P mediante el test de razón de verosimilitud (mediante la función *coxph* de R) con el ensayo como variable de ajuste.



## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



- Acharya, J. N., P. Satishchandra, et al. (1995). "Familial progressive myoclonus epilepsy: clinical and electrophysiologic observations." Epilepsia **36**(5): 429-434.
- Andersen, B., A. Rassov, et al. (1999). "Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol." Biochem J **342 Pt 3**: 545-550.
- Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" Nat Med **10 Suppl**: S18-25.
- Aragones, J., P. Fraisl, et al. (2009). "Oxygen sensors at the crossroad of metabolism." Cell Metab **9**(1): 11-22.
- Aragones, J., M. Schneider, et al. (2008). "Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism." Nat Genet **40**(2): 170-180.
- Arbuckle, M. I., A. M. Brant, et al. (1994). "Mammalian glucose transporters: intracellular signalling and transporter translocation." Biochem Soc Trans **22**(3): 664-667.
- Armstrong, C. G., G. J. Browne, et al. (1997). "PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1." FEBS Lett **418**(1-2): 210-214.
- Bai, G., Z. J. Zhang, et al. (1990). "The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. Absence of phosphorylation sites 1a and 1b." J Biol Chem **265**(14): 7843-7848.
- Bakay, L. and J. C. Lee (1968). "The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system." Brain **91**(4): 697-706.
- Banasiak, K. J. and G. G. Haddad (1998). "Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death." Brain Res **797**(2): 295-304.
- Baque, S., J. J. Guinovart, et al. (1997). "Glycogenin, the primer of glycogen synthesis, binds to actin." FEBS Lett **417**(3): 355-359.
- Barnham, K. J., C. L. Masters, et al. (2004). "Neurodegenerative diseases and oxidative stress." Nat Rev Drug Discov **3**(3): 205-214.
- Baskaran, S., P. J. Roach, et al. (2010). "Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(41): 17563-17568.
- Beal, M. F., R. J. Ferrante, et al. (1997). "Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **42**(4): 644-654.
- Becker, T. C., R. J. Noel, et al. (1994). "Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells." Methods Cell Biol **43 Pt A**: 161-189.
- Bell, G. I., C. F. Burant, et al. (1993). "Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters." J Biol Chem **268**(26): 19161-19164.

- Ben-Yosef, Y., N. Lahat, et al. (2002). "Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation." Circ Res **90**(7): 784-791.
- Bergersen, L., O. Waerhaug, et al. (2001). "A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with delta-glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses." Exp Brain Res **136**(4): 523-534.
- Bergmeyer, H. U. (1974). Methods of Enzymatic Analysis/Methoden der enzymatischen Analyse, New York, Academic Press.
- Bergstrom, J. and E. Hultman (1966). "Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man." Nature **210**(5033): 309-310.
- Berkovic, S. F., J. Cochius, et al. (1993). "Progressive myoclonus epilepsies: clinical and genetic aspects." Epilepsia **34 Suppl 3**: S19-30.
- Berman, H. K., R. M. O'Doherty, et al. (1998). "Overexpression of protein targeting to glycogen (PTG) in rat hepatocytes causes profound activation of glycogen synthesis independent of normal hormone- and substrate-mediated regulatory mechanisms." J Biol Chem **273**(41): 26421-26425.
- Berra, E., A. Ginouves, et al. (2006). "The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling." EMBO Rep **7**(1): 41-45.
- Bianchi, L., L. Tacchini, et al. (1999). "HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation." Nucleic Acids Res **27**(21): 4223-4227.
- Bittar, P. G., Y. Charnay, et al. (1996). "Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain." J Cereb Blood Flow Metab **16**(6): 1079-1089.
- Bloom, W. F., D.W. (1968). A Textbook of Histology. Philadelphia, London, Toronto, W.B.Saunders Co.
- Bobrow, M. N., T. D. Harris, et al. (1989). "Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays." J Immunol Methods **125**(1-2): 279-285.
- Bollen, M. (2001). "Combinatorial control of protein phosphatase-1." Trends Biochem Sci **26**(7): 426-431.
- Borke, R. C. and M. E. Nau (1984). "Glycogen, its transient occurrence in neurons of the rat CNS during normal postnatal development." Brain Res **318**(2): 277-284.
- Bouche, C., S. Serdy, et al. (2004). "The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes." Endocr Rev **25**(5): 807-830.

- Bouskila, M., R. W. Hunter, et al. (2010). "Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle." Cell Metab **12**(5): 456-466.
- Boutillier, R. G. and J. St-Pierre (2000). "Surviving hypoxia without really dying." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **126**(4): 481-490.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2005). "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." Mol Cell Biol **25**(3): 1025-1040.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-415.
- Brizel, D. M., S. P. Scully, et al. (1996). "Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma." Cancer Res **56**(5): 941-943.
- Brown, A. M. (2004). "Brain glycogen re-awakened." J Neurochem **89**(3): 537-552.
- Brown, A. M., S. Baltan Tekkok, et al. (2004). "Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen." Neurochem Int **45**(4): 529-536.
- Brown, A. M., R. D. Evans, et al. (2012). "Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function." Annals of Neurology: n/a-n/a.
- Brown, A. M. and B. R. Ransom (2007). "Astrocyte glycogen and brain energy metabolism." Glia **55**(12): 1263-1271.
- Brown, A. M., S. B. Tekkok, et al. (2003). "Glycogen regulation and functional role in mouse white matter." J Physiol **549**(Pt 2): 501-512.
- Brown, J. M. and A. J. Giaccia (1998). "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy." Cancer Res **58**(7): 1408-1416.
- Browner, M. F., E. B. Fauman, et al. (1992). "Tracking conformational states in allosteric transitions of phosphorylase." Biochemistry **31**(46): 11297-11304.
- Brucklacher, R. M., R. C. Vannucci, et al. (2002). "Hypoxic preconditioning increases brain glycogen and delays energy depletion from hypoxia-ischemia in the immature rat." Dev Neurosci **24**(5): 411-417.
- Bruick, R. K. and S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." Science **294**(5545): 1337-1340.
- Burrow, T. A., L. A. Bailey, et al. (2010). "Acute progression of neuromuscular findings in infantile Pompe disease." Pediatr Neurol **42**(6): 455-458.

- Bursell, S. E., A. C. Clermont, et al. (1996). "Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(5): 886-897.
- Busard, H. L., W. O. Renier, et al. (1987). "Lafora disease: a quantitative morphological and biochemical study of the cerebral cortex." Clin Neuropathol **6**(1): 1-6.
- Butterfield, D. A., A. Castegna, et al. (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death." Neurobiol Aging **23**(5): 655-664.
- Cai, Z., H. Zhong, et al. (2008). "Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha." Cardiovasc Res **77**(3): 463-470.
- Cairns, R. A. and R. P. Hill (2004). "Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma." Cancer Res **64**(6): 2054-2061.
- Cammermeyer, J. and I. M. Fenton (1981). "Improved preservation of neuronal glycogen by fixation with iodoacetic acid-containing solutions." Exp Neurol **72**(2): 429-445.
- Canada, S. E., S. A. Weaver, et al. (2003). "Brain glycogen supercompensation in the mouse after recovery from insulin-induced hypoglycemia." J Neurosci Res **89**(4): 585-591.
- Carabaza, A., J. J. Guinovart, et al. (1986). "Activation of hepatocyte glycogen synthase by metabolic inhibitors." Arch Biochem Biophys **250**(2): 469-475.
- Carabaza, A., M. D. Ricart, et al. (1990). "Role of AMP on the activation of glycogen synthase and phosphorylase by adenosine, fructose, and glutamine in rat hepatocytes." J Biol Chem **265**(5): 2724-2732.
- Cardenas, M. L., A. Cornish-Bowden, et al. (1998). "Evolution and regulatory role of the hexokinases." Biochim Biophys Acta **1401**(3): 242-264.
- Carling, D. and D. G. Hardie (1989). "The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase." Biochim Biophys Acta **1012**(1): 81-86.
- Carmeliet, P., Y. Dor, et al. (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." Nature **394**(6692): 485-490.
- Cataldo, A. M. and R. D. Broadwell (1986). "Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions: I. Neurons and glia." Journal of Electron Microscopy Technique **3**(4): 413-437.

- Cavanagh, J. B. (1999). "Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases." Brain Res Brain Res Rev **29**(2-3): 265-295.
- Cid, E., D. Cifuentes, et al. (2005). "Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase." Febs J **272**(12): 3197-3213.
- Cohen, P. (1978). "The role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle." Curr Top Cell Regul **14**: 117-196.
- Cohen, P. and D. G. Hardie (1991). "The actions of cyclic AMP on biosynthetic processes are mediated indirectly by cyclic AMP-dependent protein kinase." Biochim Biophys Acta **1094**(3): 292-299.
- Conway, E. M., D. Collen, et al. (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." Cardiovasc Res **49**(3): 507-521.
- Cox, D. R. (1972). "Regression models and life tables." Journal of the Royal Statistical Society Series B **34**(2): 187-220.
- Crerar, M. M., O. Karlsson, et al. (1995). "Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation." J Biol Chem **270**(23): 13748-13756.
- Cruz, N. F. and G. A. Dienel (2002). "High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes." J Cereb Blood Flow Metab **22**(12): 1476-1489.
- Csik, L. (1939). "The susceptibility to oxygen want of different Drosophila species." Zeitschrift für vergleichende Physiologie **27**: 304-310.
- Chadwick, L., Gilmour, D (1940). "Respiration during flight in Drosophila Repleta Wollaston: the oxygen consumption considered in relation to the wing-rate." Physiological Zoology **13**: 398-410.
- Champe, P. H., R.A. (1994). Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. Lippincott, Williams& Wilkins.
- Chan, E. M., E. J. Young, et al. (2003). "Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy." Nat Genet **35**(2): 125-127.
- Chan, T. M. and J. H. Exton (1976). "A rapid method for the determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes." Anal Biochem **71**(1): 96-105.
- Chen, Q., E. Ma, et al. (2002). "Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in Drosophila melanogaster." J Biol Chem **277**(5): 3274-3279.

- Choi, I. Y., E. R. Seaquist, et al. (2003). "Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo." J Neurosci Res **72**(1): 25-32.
- Danforth, W. H. (1965). "Glycogen Synthetase Activity in Skeletal Muscle. Interconversion of Two Forms and Control of Glycogen Synthesis." J Biol Chem **240**: 588-593.
- Dang, C. V. and G. L. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." Trends Biochem Sci **24**(2): 68-72.
- Debernardi, R., K. Pierre, et al. (2003). "Cell-specific expression pattern of monocarboxylate transporters in astrocytes and neurons observed in different mouse brain cortical cell cultures." J Neurosci Res **73**(2): 141-155.
- Dexter, D. T., C. J. Carter, et al. (1989). "Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease." J Neurochem **52**(2): 381-389.
- Diaz, A., C. Martinez-Pons, et al. (2011). "Processivity and subcellular localization of glycogen synthase depend on a non-catalytic high affinity glycogen-binding site." J Biol Chem **286**(21): 18505-18514.
- Dienel, G. A., K. K. Ball, et al. (2007). "A glycogen phosphorylase inhibitor selectively enhances local rates of glucose utilization in brain during sensory stimulation of conscious rats: implications for glycogen turnover." J Neurochem **102**(2): 466-478.
- Doherty, M. J., G. Moorhead, et al. (1995). "Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding (GL)-subunit of protein phosphatase-1." FEBS Lett **375**(3): 294-298.
- Dringen, R., R. Gebhardt, et al. (1993). "Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells." Brain Res **623**(2): 208-214.
- Drochmans, P. (1962). "[Morphology of glycogen. Electron microscopic study of the negative stains of particulate glycogen]." J Ultrastruct Res **6**: 141-163.
- Dull, T., R. Zufferey, et al. (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." J Virol **72**(11): 8463-8471.
- Duran, J., M. F. Tevy, et al. (2012). "Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice." EMBO Mol Med **4**(8): 719-729.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, et al. (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." Cell **107**(1): 43-54.
- Falkowski, P. G. (2006). "Evolution. Tracing oxygen's imprint on earth's metabolic evolution." Science **311**(5768): 1724-1725.
- Feldser, D., F. Agani, et al. (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2." Cancer Res **59**(16): 3915-3918.

- Ferrer, J. C., S. Baque, et al. (1997). "Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose." *FEBS Lett* **415**(3): 249-252.
- Flotow, H. and P. J. Roach (1989). "Synergistic phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by cyclic AMP-dependent protein kinase and casein kinase I. Implications for hormonal regulation of glycogen synthase." *J Biol Chem* **264**(16): 9126-9128.
- Folbergrova, J., K. I. Katsura, et al. (1996). "Glycogen accumulated in the brain following insults is not degraded during a subsequent period of ischemia." *J Neurol Sci* **137**(1): 7-13.
- Folbergrova, J., O. H. Lowry, et al. (1970). "Changes in metabolites of the energy reserves in individual layers of mouse cerebral cortex and subjacent white matter during ischaemia and anaesthesia." *J Neurochem* **17**(8): 1155-1162.
- Fong, N. M., T. C. Jensen, et al. (2000). "Identification of binding sites on protein targeting to glycogen for enzymes of glycogen metabolism." *J Biol Chem* **275**(45): 35034-35039.
- Freemont, P. S. (2000). "RING for destruction?" *Curr Biol* **10**(2): R84-87.
- Friede, R. L. (1959). "Histochemical distribution of phosphorylase in the brain of the guinea-pig." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **22**: 325-329.
- Fukuda, R., H. Zhang, et al. (2007). "HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells." *Cell* **129**(1): 111-122.
- Ganesh, S., K. L. Agarwala, et al. (2000). "Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes." *Hum Mol Genet* **9**(15): 2251-2261.
- Garcia-Rocha, M., A. Roca, et al. (2001). "Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes." *Biochem J* **357**(Pt 1): 17-24.
- Gentry, M. S., C. A. Worby, et al. (2005). "Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24): 8501-8506.
- Gershoni, J. M. and G. E. Palade (1983). "Protein blotting: principles and applications." *Anal Biochem* **131**(1): 1-15.
- Gibbs, M. E., D. G. Anderson, et al. (2006). "Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens." *Glia* **54**(3): 214-222.
- Gidday, J. M., J. C. Fitzgibbons, et al. (1994). "Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat." *Neurosci Lett* **168**(1-2): 221-224.
- Gilboe, D. P., K. L. Larson, et al. (1972). "Radioactive method for the assay of glycogen phosphorylases." *Anal Biochem* **47**(1): 20-27.

- Goldberg, N. D. and A. G. O'Toole (1969). "The properties of glycogen synthetase and regulation of glycogen biosynthesis in rat brain." J Biol Chem **244**(11): 3053-3061.
- Goncharova, L. S. (1957). "[Some protein substances in large arteries in hypertension with atherosclerotic lesions]." Arkh Patol **19**(12): 35-40.
- Gould, G. W. and G. D. Holman (1993). "The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression." Biochem J **295 ( Pt 2)**: 329-341.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, et al. (1996). "Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours." Nature **379**(6560): 88-91.
- Guth, L. and P. J. Dempsey (1970). "Mechanisms controlling glycogen levels in injured brain, normal brain, liver, and heart." Exp Neurol **29**(1): 152-161.
- Haddad, G. G., Y. Sun, et al. (1997). "Genetic basis of tolerance to O<sub>2</sub> deprivation in *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10809-10812.
- Haddad, G. G., R. J. Wyman, et al. (1997). "Behavioral and Electrophysiologic Responses of *Drosophila melanogaster* to Prolonged Periods of Anoxia." J Insect Physiol **43**(3): 203-210.
- Halse, R., L. G. Fryer, et al. (2003). "Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen: a possible role for AMP-activated protein kinase." Diabetes **52**(1): 9-15.
- Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.
- Harik, S. I., W. D. Lust, et al. (1995). "Brain glucose metabolism in hypobaric hypoxia." J Appl Physiol **79**(1): 136-140.
- Hensley, K., M. L. Maidt, et al. (1998). "Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation." J Neurosci **18**(20): 8126-8132.
- Hewitson, K. S., L. A. McNeill, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family." J Biol Chem **277**(29): 26351-26355.
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-276.
- Hochachka, P. W., L. T. Buck, et al. (1996). "Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9493-9498.
- Iadecola, C., F. Zhang, et al. (1995). "Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **15**(3): 378-384.

- Ibrahim, M. Z. (1972). "The response of the brain to hypoxia and ischaemia." J Neurol Sci **17**(3): 271-279.
- Ibrahim, M. Z., H. Atlan, et al. (1970). "Synthetic and hydrolytic enzymes of glycogen in the normal and the irradiated rat brain." Radiat Res **43**(2): 341-356.
- Inoue, N., Y. Matsukado, et al. (1988). "Localization of glycogen synthase in brain." J Neurochem **50**(2): 400-405.
- Ivan, M., K. Kondo, et al. (2001). "HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing." Science **292**(5516): 464-468.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." Genes Dev **12**(2): 149-162.
- Jaakkola, P., D. R. Mole, et al. (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-472.
- Jain, S., E. Maltepe, et al. (1998). "Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse." Mech Dev **73**(1): 117-123.
- Jendroska, K., O. M. Hoffmann, et al. (1997). "Amyloid beta peptide and precursor protein (APP) in mild and severe brain ischemia." Ann N Y Acad Sci **826**: 401-405.
- Jiang, B. H., J. Z. Zheng, et al. (1997). "Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension." J Biol Chem **272**(31): 19253-19260.
- Katzen, H. M., D. D. Soderman, et al. (1965). "Kinetic and Electrophoretic Evidence for Multiple Forms of Glucose-Atp Phosphotransferase Activity from Human Cell Cultures and Rat Liver." Biochem Biophys Res Commun **19**: 377-382.
- Kelsall, I. R., M. Voss, et al. (2011). "R3F, a novel membrane-associated glycogen targeting subunit of protein phosphatase 1 regulates glycogen synthase in astrocytoma cells in response to glucose and extracellular signals." J Neurochem **118**(4): 596-610.
- Kietzmann, T., U. Roth, et al. (1999). "Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes." Blood **94**(12): 4177-4185.
- Kim, J. W., I. Tchernyshyov, et al. (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia." Cell Metab **3**(3): 177-185.
- Kim, J. Y. and J. H. Park (2003). "ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death." FEBS Lett **549**(1-3): 94-98.

- Kocur, I. and S. Resnikoff (2002). "Visual impairment and blindness in Europe and their prevention." Br J Ophthalmol **86**(7): 716-722.
- Koehler-Stec, E. M., I. A. Simpson, et al. (1998). "Monocarboxylate transporter expression in mouse brain." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): E516-524.
- Koizumi, J. and H. Shiraishi (1970). "Glycogen accumulation in dendrites of the rabbit pallidum following trifluoperazine administration." Exp Brain Res **11**(4): 387-391.
- Kong, J., P. N. Shepel, et al. (2002). "Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep." J Neurosci **22**(13): 5581-5587.
- Kotoulas, O. B., S. A. Kalamidas, et al. (2004). "Glycogen autophagy." Microsc Res Tech **64**(1): 10-20.
- Krebs, E. G. and E. H. Fischer (1956). "The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **20**(1): 150-157.
- Krishnamachary, B., S. Berg-Dixon, et al. (2003). "Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1." Cancer Res **63**(5): 1138-1143.
- Kung, A. L., S. Wang, et al. (2000). "Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription." Nat Med **6**(12): 1335-1340.
- Kunz, M., S. Ibrahim, et al. (2001). "Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma." Cell Growth Differ **12**(3): 137-145.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lamperti, C., S. Salani, et al. (2009). "Neuropathological study of skeletal muscle, heart, liver, and brain in a neonatal form of glycogen storage disease type IV associated with a new mutation in GBE1 gene." J Inherit Metab Dis.
- Lando, D., D. J. Peet, et al. (2002). "Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch." Science **295**(5556): 858-861.
- Lawrence, J. C., Jr., J. J. Guinovart, et al. (1977). "Activation of rat adipocyte glycogen synthase by insulins." J Biol Chem **252**(2): 444-450.
- Lerin, C., E. Montell, et al. (2000). "Overexpression of protein targeting to glycogen in cultured human muscle cells stimulates glycogen synthesis independent of glycogen and glucose 6-phosphate levels." J Biol Chem **275**(51): 39991-39995.
- Levy, A. P., N. S. Levy, et al. (1995). "Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia." J Biol Chem **270**(22): 13333-13340.
- Li, J., M. Post, et al. (2000). "PR39, a peptide regulator of angiogenesis." Nat Med **6**(1): 49-55.

- Lipton, P. (1989). "Regulation of glycogen in the dentate gyrus of the in vitro guinea pig hippocampus; effect of combined deprivation of glucose and oxygen." J Neurosci Methods **28**(1-2): 147-154.
- Long, D. M., M. J. Mossakowski, et al. (1972). "Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia." Acta Neuropathol **20**(4): 335-347.
- Lowry, O. H., J. V. Passonneau, et al. (1964). "Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the Glycolytic Pathway in Brain." J Biol Chem **239**: 18-30.
- Madsen, N. B. (1986). Glycogen Phosphorylase. The enzymes. **17**: 365-394.
- Magistretti, P. J. (2006). "Neuron-glia metabolic coupling and plasticity." J Exp Biol **209**(Pt 12): 2304-2311.
- Magistretti, P. J., O. Sorg, et al. (1993). "Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells." Dev Neurosci **15**(3-5): 306-312.
- Maher, E. R. and W. G. Kaelin, Jr. (1997). "von Hippel-Lindau disease." Medicine (Baltimore) **76**(6): 381-391.
- Mahon, P. C., K. Hirota, et al. (2001). "FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity." Genes Dev **15**(20): 2675-2686.
- Mamedova, L. K., V. Shneyvays, et al. (2003). "Mechanism of glycogen supercompensation in rat skeletal muscle cultures." Mol Cell Biochem **250**(1-2): 11-19.
- Manalo, D. J., A. Rowan, et al. (2005). "Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1." Blood **105**(2): 659-669.
- Marber, M. S. and D. M. Yellon (1992). "Hypoxic preconditioning of ischaemic myocardium." Cardiovasc Res **26**(5): 556-557.
- Marti, H. J., M. Bernaudin, et al. (2000). "Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia." Am J Pathol **156**(3): 965-976.
- Masson, N., C. Willam, et al. (2001). "Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation." EMBO J **20**(18): 5197-5206.
- Mathwes, C. K. V. H., K.E. (1990). Biochemistry, Redwood City, Calif: Benjamin/ Cummings Pub.Co.
- Matsui, T., T. Ishikawa, et al. (2012). "Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise." J Physiol **590**(Pt 3): 607-616.

- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, et al. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." *Nature* **399**(6733): 271-275.
- Maynard, M. A., A. J. Evans, et al. (2005). "Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma." *Faseb J* **19**(11): 1396-1406.
- Melendez, R., E. Melendez-Hevia, et al. (1998). "Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach." *Biophys J* **75**(1): 106-114.
- Millhorn, D. E., R. Raymond, et al. (1997). "Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia." *Kidney Int* **51**(2): 527-535.
- Montori-Grau, M., M. Guitart, et al. (2011). "Differential pattern of glycogen accumulation after protein phosphatase 1 glycogen-targeting subunit PPP1R6 overexpression, compared to PPP1R3C and PPP1R3A, in skeletal muscle cells." *BMC Biochem* **12**: 57.
- Morello, C. M. (2007). "Etiology and natural history of diabetic retinopathy: an overview." *Am J Health Syst Pharm* **64**(17 Suppl 12): S3-7.
- Morgello, S., R. R. Usón, et al. (1995). "The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes." *Glia* **14**(1): 43-54.
- Mossakowski, M. J., D. M. Long, et al. (1968). "The early histochemical and ultrastructural changes in perinatal asphyxia." *J Neuropathol Exp Neurol* **27**(1): 126-127.
- Mukhopadhyay, C. K., B. Mazumder, et al. (2000). "Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency." *J Biol Chem* **275**(28): 21048-21054.
- Munro, S., H. Ceulemans, et al. (2005). "A novel glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that is regulated by insulin and shows differential tissue distribution in humans and rodents." *Febs J* **272**(6): 1478-1489.
- Nelson, S. R., D. W. Schulz, et al. (1968). "Control of glycogen levels in brain." *J Neurochem* **15**(11): 1271-1279.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." *Faseb J* **13**(1): 9-22.
- Newgard, C. B., M. J. Brady, et al. (2000). "Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1." *Diabetes* **49**(12): 1967-1977.
- Newgard, C. B., P. K. Hwang, et al. (1989). "The family of glycogen phosphorylases: structure and function." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **24**(1): 69-99.

- Nielsen, J. N., W. Derave, et al. (2001). "Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content." J Physiol **531**(Pt 3): 757-769.
- Nikinmaa, M. and B. B. Rees (2005). "Oxygen-dependent gene expression in fishes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(5): R1079-1090.
- Nilsson, L. H. and E. Hultman (1973). "Liver glycogen in man--the effect of total starvation or a carbohydrate-poor diet followed by carbohydrate refeeding." Scand J Clin Lab Invest **32**(4): 325-330.
- Ohh, M., C. W. Park, et al. (2000). "Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein." Nat Cell Biol **2**(7): 423-427.
- Oosthuysen, B., L. Moons, et al. (2001). "Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration." Nat Genet **28**(2): 131-138.
- Ortiz-Barahona, A., D. Villar, et al. (2010). "Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction." Nucleic Acids Res **38**(7): 2332-2345.
- Ozaki, H., A. Y. Yu, et al. (1999). "Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(1): 182-189.
- Palmer, L. A., G. L. Semenza, et al. (1998). "Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1." Am J Physiol **274**(2 Pt 1): L212-219.
- Papandreou, I., R. A. Cairns, et al. (2006). "HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption." Cell Metab **3**(3): 187-197.
- Parodi, A. J., J. Mordoh, et al. (1970). "Action patterns of phosphorylase and glycogen synthetase on glycogen." Eur J Biochem **16**(3): 499-507.
- Passonneau, J. V. and O. H. Lowry (1971). "Metabolite flux in single neurons during ischemia and anesthesia." Curr Probl Clin Biochem **3**: 198-212.
- Pedersen, W. A., W. Fu, et al. (1998). "Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients." Ann Neurol **44**(5): 819-824.
- Pederson, B. A., C. Cheng, et al. (2000). "Regulation of glycogen synthase. Identification of residues involved in regulation by the allosteric ligand glucose-6-P and by phosphorylation." J Biol Chem **275**(36): 27753-27761.

- Peers, C., M. L. Dallas, et al. (2009). "Hypoxia and neurodegeneration." Ann N Y Acad Sci **1177**: 169-177.
- Pellegri, G., C. Rossier, et al. (1996). "Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase." Brain Res Mol Brain Res **38**(2): 191-199.
- Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10625-10629.
- Pellerin, L. and P. J. Magistretti (2012). "Sweet sixteen for ANLS." J Cereb Blood Flow Metab **32**(7): 1152-1166.
- Pellerin, L., G. Pellegri, et al. (1998). "Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle." Dev Neurosci **20**(4-5): 291-299.
- Pelletier, J., G. Bellot, et al. (2012). "Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival." Front Oncol **2**: 18.
- Pentreath, V. W. and M. A. Kai-Kai (1982). "Significance of the potassium signal from neurones to glial cells." Nature **295**(5844): 59-61.
- Perez-Pinzon, M. A., P. L. Mumford, et al. (1996). "Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine." Neuroscience **75**(3): 687-694.
- Pescador, N., D. Villar, et al. (2010). "Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1." PLoS One **5**(3): e9644.
- Pfeiffer-Guglielmi, B., B. Fleckenstein, et al. (2003). "Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies." J Neurochem **85**(1): 73-81.
- Phelps, C. H. (1972). "Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study." Brain Res **39**(1): 225-234.
- Pierre, K., L. Pellerin, et al. (2000). "Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy." Neuroscience **100**(3): 617-627.
- Pompella, A., A. Visvikis, et al. (2003). "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist." Biochem Pharmacol **66**(8): 1499-1503.
- Pouyssegur, J., F. Dayan, et al. (2006). "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression." Nature **441**(7092): 437-443.

- Prats, C., J. A. Cadefau, et al. (2005). "Phosphorylation-dependent translocation of glycogen synthase to a novel structure during glycogen resynthesis." *J Biol Chem* **280**(24): 23165-23172.
- Printen, J. A., M. J. Brady, et al. (1997). "PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism." *Science* **275**(5305): 1475-1478.
- Pugh, C. W., J. F. O'Rourke, et al. (1997). "Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit." *J Biol Chem* **272**(17): 11205-11214.
- Rahman, B., L. Kussmaul, et al. (2000). "Glycogen is mobilized during the disposal of peroxides by cultured astroglial cells from rat brain." *Neurosci Lett* **290**(3): 169-172.
- Ratcliffe, P. J. (2003). "New insights into an enigmatic tumour suppressor." *Nat Cell Biol* **5**(1): 7-8.
- Reiter, L. T., L. Potocki, et al. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*." *Genome Res* **11**(6): 1114-1125.
- Richter, F., H. J. Bohme, et al. (1983). "Developmental changes of glycogen phosphorylase b isozymes in rat tissues." *Biomed Biochim Acta* **42**(10): 1229-1235.
- Roach, P. J. (1990). "Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation." *Faseb J* **4**(12): 2961-2968.
- Roach, P. J. (2002). "Glycogen and its metabolism." *Curr Mol Med* **2**(2): 101-120.
- Roach, P. J., A. A. DePaoli-Roach, et al. (1978). "Ca<sup>2+</sup>-stimulated phosphorylation of muscle glycogen synthase by phosphorylase b kinase." *J Cyclic Nucleotide Res* **4**(4): 245-257.
- Roach, P. J., Y. Takeda, et al. (1976). "Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. I. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties." *J Biol Chem* **251**(7): 1913-1919.
- Robinow, S. and K. White (1988). "The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages." *Dev Biol* **126**(2): 294-303.
- Rolfe, D. F. and G. C. Brown (1997). "Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals." *Physiol Rev* **77**(3): 731-758.
- Rolfs, A., I. Kvietikova, et al. (1997). "Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1." *J Biol Chem* **272**(32): 20055-20062.
- Roma-Mateo, C., P. Sanz, et al. (2012). "Deciphering the role of malin in the lafora progressive myoclonus epilepsy." *IUBMB Life* **64**(10): 801-808.
- Rosengarten, H. (1970). "Glycogen level and oxygen consumption of rabbit brain tissue slices under ethyl ether and halothane anesthesia." *Agressologie* **11**(2): 159-162.
- Saikumar, P., Z. Dong, et al. (1998). "Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury." *Oncogene* **17**(26): 3401-3415.

- Sainz, J., B. A. Minassian, et al. (1997). "Lafora progressive myoclonus epilepsy: narrowing the chromosome 6q24 locus by recombinations and homozygosities." Am J Hum Genet **61**(5): 1205-1209.
- Sakanaka, M., T. C. Wen, et al. (1998). "In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4635-4640.
- Salavert, A., P. J. Roach, et al. (1979). "Effect of partial tryptic proteolysis on the kinetic properties of rabbit muscle glycogen synthase." Biochim Biophys Acta **570**(2): 231-238.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-5170.
- Schmidt, D. D., W. Frommer, et al. (1977). "alpha-Glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin." Naturwissenschaften **64**(10): 535-536.
- Schurr, A., C. A. West, et al. (1988). "Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation." Science **240**(4857): 1326-1328.
- Seagroves, T. N., H. E. Ryan, et al. (2001). "Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells." Mol Cell Biol **21**(10): 3436-3444.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-732.
- Semenza, G. L., M. K. Neufeldt, et al. (1991). "Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5680-5684.
- Serratos, J. M., A. V. Delgado-Escueta, et al. (1995). "The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q." Hum Mol Genet **4**(9): 1657-1663.
- Shen, G. M., F. L. Zhang, et al. (2010). "Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia." FEBS Lett **584**(20): 4366-4372.
- Shi, J., S. H. Yang, et al. (2000). "Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model." Brain Res **853**(1): 1-4.
- Shimizu, N. and T. Kumamoto (1952). "Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain." Anat Rec **114**(3): 479-497.
- Shimizu, N. and M. Okada (1957). "Histochemical distribution of phosphorylase in rodent brain from newborn to adults." J Histochem Cytochem **5**(5): 459-471.
- Shimoda, L. A., M. Fallon, et al. (2006). "HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(5): L941-949.

- Shulman, R. G., G. Bloch, et al. (1995). "In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8535-8542.
- Shulman, R. G., F. Hyder, et al. (2001). "Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6417-6422.
- Shulman, R. G. and D. L. Rothman (2001). "The "glycogen shunt" in exercising muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 457-461.
- Sickmann, H. M., A. Schousboe, et al. (2005). "Compartmentation of lactate originating from glycogen and glucose in cultured astrocytes." Neurochem Res **30**(10): 1295-1304.
- Sidman, R. L., T. Taksir, et al. (2008). "Temporal neuropathologic and behavioral phenotype of 6neo/6neo Pompe disease mice." J Neuropathol Exp Neurol **67**(8): 803-818.
- Sikorska, M. and M. Smialek (1974). "Glycogen level and UDPglucose: glycogen alpha-4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in the brains of rabbits after experimental circulatory hypoxia." Neuropatol Pol **12**(4): 655-664.
- Simo, S., L. Pujadas, et al. (2007). "Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation." Cereb Cortex **17**(2): 294-303.
- Skurat, A. V., Y. Wang, et al. (1994). "Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites." J Biol Chem **269**(41): 25534-25542.
- Sorg, O. and P. J. Magistretti (1992). "Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition." J Neurosci **12**(12): 4923-4931.
- Sorg, O., L. Pellerin, et al. (1995). "Adenosine triphosphate and arachidonic acid stimulate glycogenolysis in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes." Neurosci Lett **188**(2): 109-112.
- Sridharan, V., J. Guichard, et al. (2008). "O(2)-sensing signal cascade: clamping of O(2) respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration." Am J Physiol Cell Physiol **295**(1): C29-37.
- Stapleton, D., C. Nelson, et al. (2010). "Analysis of hepatic glycogen-associated proteins." Proteomics **10**(12): 2320-2329.
- Subbarao, K. V. and L. Hertz (1990). "Effect of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of astrocytes." Brain Res **536**(1-2): 220-226.

- Sun, Y., K. Jin, et al. (2001). "Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15306-15311.
- Sun, Y., K. Jin, et al. (2003). "Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3497-3500.
- Suzuki, A., S. A. Stern, et al. (2011). "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation." Cell **144**(5): 810-823.
- Swanson, R. A. and D. W. Choi (1993). "Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro." J Cereb Blood Flow Metab **13**(1): 162-169.
- Swanson, R. A., M. M. Morton, et al. (1992). "Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography." Neuroscience **51**(2): 451-461.
- Swanson, R. A., S. M. Sagar, et al. (1989). "Regional brain glycogen stores and metabolism during complete global ischaemia." Neurol Res **11**(1): 24-28.
- Takeuchi, T. (1958). "Histochemical demonstration of branching enzyme (amylase-1,4-1,6-transglucosidase) in animal tissues." J Histochem Cytochem **6**(3): 208-216.
- Takeuchi, T. (1965). "[Histochemical observations on glycogen metabolism in nerve tissue]." Shinkei Kenkyu No Shimpo **9**(4): 695-699.
- Tang, P. M., J. A. Bondor, et al. (1991). "Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase." J Biol Chem **266**(24): 15782-15789.
- Thomas, J. A., K. K. Schlender, et al. (1968). "A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose." Anal Biochem **25**(1): 486-499.
- Tronche, F., C. Kellendonk, et al. (1999). "Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety." Nat Genet **23**(1): 99-103.
- Ullah, M. S., A. J. Davies, et al. (2006). "The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism." J Biol Chem **281**(14): 9030-9037.
- Valles-Ortega, J., J. Duran, et al. (2011). "Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease." EMBO Mol Med **3**(11): 667-681.
- Vannucci, S. J. and R. C. Vannucci (1980). "Glycogen metabolism in neonatal rat brain during anoxia and recovery." J Neurochem **34**(5): 1100-1105.
- Vilchez, D., S. Ros, et al. (2007). "Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy." Nat Neurosci **10**(11): 1407-1413.

- Villar-Palasi, C. and J. J. Guinovart (1997). "The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase." *Faseb J* **11**(7): 544-558.
- Wagner, S. R. t. and W. L. Lanier (1994). "Metabolism of glucose, glycogen, and high-energy phosphates during complete cerebral ischemia. A comparison of normoglycemic, chronically hyperglycemic diabetic, and acutely hyperglycemic nondiabetic rats." *Anesthesiology* **81**(6): 1516-1526.
- Walls, A. B., C. M. Heimbürger, et al. (2009). "Robust glycogen shunt activity in astrocytes: Effects of glutamatergic and adrenergic agents." *Neuroscience* **158**(1): 284-292.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5510-5514.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1993). "General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4304-4308.
- Wang, J., J. A. Stuckey, et al. (2002). "A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen." *J Biol Chem* **277**(4): 2377-2380.
- Webster, N. J., K. N. Green, et al. (2002). "Altered processing of amyloid precursor protein in the human neuroblastoma SH-SY5Y by chronic hypoxia." *J Neurochem* **83**(6): 1262-1271.
- Wegener, G. (1988). Oxygen availability, energy metabolism and metabolic rate in invertebrates and vertebrates. *Oxygen Sensing in Tissues*. H. Ackers. Berlin: Springer-Verlag: pp. 13–35.
- Whatley, S. A., C. Hall, et al. (1981). "Hypothalamic neurons in dissociated cell culture: the mechanism of increased survival times in the presence of non-neuronal cells." *J Neurochem* **36**(6): 2052-2056.
- Wilson, W. A., A. V. Skurat, et al. (2005). "Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(46): 16596-16601.
- Yager, J. Y., S. Wright, et al. (2006). "The influence of aging on recovery following ischemic brain damage." *Behav Brain Res* **173**(2): 171-180.
- Zhang, H., M. Bosch-Marce, et al. (2008). "Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia." *J Biol Chem* **283**(16): 10892-10903.
- Zhang, H., P. Gao, et al. (2007). "HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity." *Cancer Cell* **11**(5): 407-420.
- Zhu, A., R. Romero, et al. (2009). "An enzymatic fluorimetric assay for glucose-6-phosphate: application in an in vitro Warburg-like effect." *Anal Biochem* **388**(1): 97-101.



## **X. ANEXOS**



## **Neurons have an active glycogen metabolism that plays a key role in tolerance to hypoxia**

**Isabel Saez<sup>1,2</sup>, Jordi Duran<sup>1,3</sup>, Christopher Sinadinos<sup>1</sup>, Oscar Yanes<sup>3,4,5</sup>, Carles Martínez-Pons<sup>1</sup>, Florencia Tevy<sup>1</sup>, Marco Milan<sup>1,6</sup>, Joan J. Guinovart<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) Barcelona 08028, Spain

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 08017 Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Metabolomics Platform, Campus Sescelades, Edifici N<sub>2</sub>, Rovira i Virgili University, 43007 Tarragona, Spain

<sup>5</sup>Institut d'Investigació Biomèdica Pere Virgili (IISPV), 43201 Reus, Spain

<sup>6</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

### **Correspondence should be addressed to:**

Joan J. Guinovart, Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Baldri i Reixac, 10, Barcelona 08028, Spain. Email: [guinovart@irbbarcelona.org](mailto:guinovart@irbbarcelona.org)

## **Abstract**

Glycogen synthesis in the brain has been traditionally related to astrocytes. However, neurons express Glycogen Synthase (GS), the unique enzyme capable of its synthesis in mammals, and its biological significance has not been established. Here we evidence the presence of glycogen in neurons and show that they have the necessary machinery for degrading it, both in mouse and *Drosophila melanogaster* neurons. This machinery is activated in oxygen reduced conditions (hypoxia), and is mediated through the expression of the brain isoform of Glycogen Phosphorylase (GP). Glycogen turnover is enhanced in hypoxia, rendering a progressive decay in the amount of the polysaccharide. Finally, we illustrate that glycogen metabolism is part of the protection program the neuron initiates under low oxygen. Our results prove an active glycogen metabolism in the neuron and highlight its physiological role of GS during a stress.

## Introduction

Glucose is the main source of energy in the brain and is stored in form of glycogen. Due to its low concentration in the brain (3-12  $\mu\text{mol/g}$ ) (Cruz and Dienel, 2002) compared to other glycogenic tissues such as skeletal muscle (300-350  $\mu\text{mol/g}$ ) (Chryssanthopoulos et al., 2004), its function has been underestimated for the past decades. However, brain glycogen undergoes a turnover 50-100 times that of lipids and exceeds by several orders of magnitude that of liver glycogen (Watanabe and Passonneau, 1973). Thus, a role for glycogen as an energy buffer (capable of providing rapid energy requirements) rather than an energy reserve (as a long term energetic sustention) has been proposed. In this context, brain glycogen levels drop in response to hypoglycemia (Choi et al., 2003; Goncharova, 1957) and ischemia (Lipton, 1989; Passonneau and Lowry, 1971). In addition, glycogen has been reported to sustain neuronal activity under physiological normoglycemia during sensory stimulation (Brown et al., 2012; Brown et al., 2003; Cruz and Dienel, 2002) or memory consolidation (Gibbs et al., 2006; Suzuki et al., 2011) showing its importance even in non pathological conditions.

Glycogen in the brain has been described to vary depending on age, regions and conditions of the tissue (Friede, 1966; Shimizu and Kumamoto, 1952). The cellular distribution of glycogen has been thoroughly discussed, and its exact distribution has still to be elucidated. While incorporation of radioactive glucose into glycogen has been shown to occur both in glia and neurons (Wolfe and Nicholls, 1967), glycogen has been mainly localized in astrocytes (Cataldo and Broadwell, 1986; Peters, 1991). However, and although found at lower concentrations than in astrocytes, some glycogen has been detected in larger neurons (Borke and Nau, 1984; Takeuchi, 1958), neuronal perikarya of the CNS (Cammermeyer and Fenton, 1981) and in pre and post synaptic terminations (Koizumi and Shiraishi, 1970). The low concentration of glycogen detected in neurons is in accordance with recent reports, which demonstrate that an excess of glycogen accumulation triggers apoptosis in neurons (Duran et al., 2012; Vilchez et al., 2007).

In mammals, glycogen biosynthesis takes place under the action of the enzyme Glycogen Synthase (GS), which catalyzes the formation of the  $\alpha$ -1-4-glycosidic linkage of glycogen using UDP-glucose as the donor. GS is regulated by phosphorylation at multiple serine residues located in the amino- and carboxy-terminal domains of the enzyme. Phosphorylation by several kinases, including GSK3, induces the inactivation of the enzyme, while dephosphorylation causes its activation (Skurat et al., 1994). GS is also allosterically activated by glucose-6-phosphate (G-6-P) in the brain (Goldberg and O'Toole, 1969) and in other tissues (Bouskila et al., 2010; Villar-Palasi and Guinovart, 1997). High levels of G-6-P fully activate GS even when the enzyme is phosphorylated. In mammals there are two GS isoforms, liver glycogen synthase (LGS),

whose expression is tissue-specific, and muscle glycogen synthase (MGS), which is expressed elsewhere including the brain (Roach et al., 1998). The degradation of glycogen is mediated by Glycogen Phosphorylase (GP), which acts on the glycogen molecule releasing glucose-1-phosphate, rapidly converted into glucose-6-phosphate. Three isoforms of GP have been described: the muscle, the liver and the brain isozyme. In the brain, both the brain and the muscle isoform are expressed (Pfeiffer-Guglielmi et al., 2003). Neurons express MGS (Inoue et al., 1988; Pellegrini et al., 1996) and have the full machinery to synthesize glycogen (Vilchez et al., 2007). However, opposite reports have been released regarding the presence of GP in neurons, describing on one side its absence in most neurons (Ignacio et al., 1990; Pfeiffer-Guglielmi et al., 2003), or reporting its presence (Friede, 1959; Ibrahim et al., 1970; Pellegrini et al., 1996; Takeuchi, 1965).

Despite all the data released, the biological significance for the expression of the glycogen metabolic machinery in neurons has not been addressed. Here we have analyzed the presence of glycogen in neurons and its regulation in a well known glycogenolytic condition, such as hypoxia. To avoid the involvement of astrocytes in the response, we have worked with pure neuronal cultures and neuron-specific genetically engineered flies and mice.

## **Methods**

### **Primary cultures of neurons**

Neuronal cultures were obtained from the telencephalon of mouse embryos at embryonic day 16 (OF1 mice, Charles River Laboratories) as previously described (Simo et al., 2007). Briefly, mouse brains were dissected in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.6% glucose (w/v, Sigma). After removal of the meninges, the telencephalon was mechanically and enzymatically dissociated with trypsin (0.25%, Invitrogen). Dissociated cells were then seeded on plates (Nunc) pre-treated with poly-L-lysine (10 µg/ml, Sigma) and maintained in serum-free Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with L-glutamine (2 mM, Invitrogen), D-(+)-glucose (30 mM, Sigma), sodium bicarbonate (5 mM, Invitrogen),

penicillin/streptomycin (100 U /ml and 100 mg/ml, Invitrogen) and B27 supplement (1/50, Invitrogen). After one day in culture, we treated the cells with Uridine/5-fluoro-2'-deoxyuridine (50 µg/ml, 20 µg/ml, Sigma) to eliminate astrocytes. The purity of the cultures was determined by immunocytochemistry with neuron- (anti  $\beta$ -III-tubulin (TUJ1, BABCO), and astrocyte- (anti-gial fibrillar acidic protein, GFAP (Dako))-specific antibodies. The cells were maintained 5 days (DIV5) in culture before performing the experiments. For hypoxia treatments, cells were incubated at DIV5 for the indicated times at 37°C in an oxygen regulated incubator (IN VIVO<sub>2</sub> 200, Ruskin ) set at 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>.

### **Glycogen synthesis**

Glycogen synthesis was measured after incubation of primary cultured neurons with 15 µCi/ml [U-<sup>14</sup>C] glucose (PerkinElmer Life Sciences) in Neurobasal media with 25 mM glucose. On termination of the incubations, neurons were washed three times with 150 mM NaCl and extracted in 0.1 M NaOH. Extracts were deproteinized with trichloroacetic acid (10%, w/v) containing glycogen carrier, glycogen was isolated and the radioactivity incorporated into glycogen was measured.

### **Metabolite Determinations**

Glycogen content was determined using a modification of a previously described method (Newgard et al., 1983). Briefly, cells were scrapped into 30% KOH and the extract was heated for 15 minutes at 100°C. Glycogen was selectively precipitated with cold 66% ethanol overnight and the pellet was digested with  $\alpha$ -amylglucosidase. The glucose concentration was determined based on a fluorometric assay (Zhu et al., 2009). The intracellular concentration of G-6-P and UDP Glucose was measured according to the same fluorometric protocol.

### **Enzyme Activity Assays**

To measure GS and GP activity, cell culture plates frozen in liquid nitrogen were scrapped using 100 µl of ice-cold homogenization buffer consisting of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM potassium fluoride, 15 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoethanol, 0.6 M sucrose, 1 mM benzamidine, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 nM okadaic acid, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml pepstatin. The extracts were passed 10 times through a 25-gauge needle. Protein concentration was measured following the method of Bradford (Bradford, 1976) using a Bio-Rad assay reagent. GS activity was measured in the presence or absence of 6.6 mM G-6-P (Thomas et al., 1968). GS activity measured in the presence of G-6-P informs on the total amount of enzyme, whereas measurement in the absence of G-6-P is an indication of the active GS form. The - G-6-P /+ G-6-P activity ratio is an estimation of the activation state of the enzyme. GP activity was determined by measuring the incorporation of [U-<sup>14</sup>C] glucose 1-phosphate into glycogen in the

absence or presence of 5 mM AMP as previously described (Gilboe et al., 1972). The ratio + Caffeine/ + AMP is an estimation of the activation state of the enzyme for the brain isoform of GP.

### **Electrophoresis and immunoblotting**

50 µg of protein of the GS activity homogenates were resolved by 10% SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Millipore), and probed with the following antibodies: rabbit antibody against MGS (1:1000, Cell Signalling 3893), rabbit antibody against GS phosphorylated on Ser641 (1:2000, Cell Signaling), rabbit antibody against GFP (1:5000, Immunokontakt), chicken and guinea pig antibodies against brain and muscle GP, respectively, (1:10 000, Eurogentec), rabbit antibody against GFAP (1:1000, DAKO), mouse antibody against HIF1α (1:1000, R&D Systems), rabbit antibody against HIF2α (1:500, Abcam) or a mouse antibody against actin (1:200 000, Sigma). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) against rabbit (1:30 000, GE Healthcare), mouse (1:10 000, Dako Cytomation), chicken (1:30 000, Chemicon) or guinea pig (1:10 000, Jackson Immunoresearch) immunoglobulins were used. Immunoreactive bands were visualized using a Chemiluminescent HRP kit (Millipore), following the manufacturer's instructions.

### **Immunocytochemistry**

Cells seeded on poly-L-lysine coated coverslips were fixed for 30 min in PBS containing 4% (w/v) paraformaldehyde. For glycogen detection, cells were washed with PBS followed by three 10-min sequential incubations with PBS containing: (1) NaBH<sub>4</sub> (1 mg/ml) (2) 0.2% (v/v) Triton X-100 and (3) 3% bovine serum albumin (BSA) with 0.2% Triton X-100. Incubation with the primary and secondary antibodies was carried out as previously described (Cid et al., 2005). Nuclei were stained with Hoechst (1 mg/ml) parallel to secondary antibody incubation. The primary monoclonal antibody raised against glycogen was a gift from O. Baba, Tokyo Medical and Dental University.

For detection of Glycogen Synthase and Phosphorylase, an amplification protocol was applied based on the Tyramide Signal Amplification (TSA) technology (PerkinElmer Life Sciences) (Bobrow et al., 1989). Cells were incubated with hydrogen peroxide (3% v/v), permeabilized with PBS containing 1% (v/v) Triton X-100 and blocked with PBS- 3% BSA (w/v) - 0.1% Triton (v/v) for 10 min each. Primary antibodies against the muscle isoform of GS and the brain GP isozyme, produced in our lab, were incubated for 1.5 h, and biotinylated secondary antibodies further 45 min. Coverslips were treated with Streptavidin conjugated HRP for 45 min and subsequently with TSA for 10 min. Hoechst 33342 (1 mg/ml) was used for nuclei staining after the TSA incubation. Samples were mounted using Mowiol. Epifluorescence images were obtained with a Nikon E1000 epifluorescence microscope and confocal images with a Leica SPE spectral microscope.

### **Immunohistochemistry**

40-week old mice were anesthetized and perfused transcardiacally with PBS containing 4% (w/v) paraformaldehyde. Brains were removed, post fixed in the same solution overnight, cryoprotected with 30% (w/v) sucrose and sectioned at coronally planes (30  $\mu$ M thick). For immunodetection of antigens, sections were washed in PBS and PBS-0.1% Triton X-100, blocked for 2 h at RT with PBS containing 10% of normal goat serum (NGS) and 0.2% of gelatin. Primary antibodies (brain GP, produced in our lab; Parvalbumin, Swant and GFAP, DAKO) were incubated overnight at 4°C with PBS–5% NGS. Dye- labelled secondary antibodies and Hoechst 33342 were incubated for 2 h at RT in PBS-5% NGS and mounted in Mowiol. Confocal images were taken with a Leica SPE microscope.

### **RNA purification and quantitative RT-PCR**

Total RNA from 5 adult fly heads was extracted and purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen). 0.5 mg of total RNA from each sample was reverse transcribed to cDNA (Invitrogen). The standard protocol of the ABI Prism 7700 Detection System was followed using ready-made TaqMan primer and probe sets (Applied Biosystems). Each sample was analyzed in triplicate wells with 75 ng of first-strand cDNA in a total reaction volume of 10  $\mu$ l. The temperature profile consisted of 40 cycles of 15s at 95°C and 1 min at 60°C. Data was analyzed with the comparative  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using ribosomal Rpl32 protein as endogenous control.

### **Cell viability assay**

Neurons were seeded in poly-L-lysine coated coverslips and incubated in normoxia and hypoxia for the indicated times. After treatments, analysis was carried out using the Live Dead Cell Staining kit (Abcam). This assay is based on the membrane permeabilization discrimination of two dyes, which differentiates between live and dead cells. Neurons were examined and randomly photographed under fluorescence microscopy. Average of dead cells was estimated by cell count in 10 fields from 5-8 coverslips of three independent experiments.

### **Adenoviral and Lentiviral production, and RNA interference**

The adenovirus of the active mutant of GS was prepared as follows: the DNA encoding for the protein GFP linked to the active form of human muscle glycogen synthase (MGS-9A) was obtained from the pEGFP/HMGS 22a3abc451ab vector (Cid et al., 2005) by PCR using the forward primer GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG and the reverse primer GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTTACGCTCCTCGCCCAG. The DNA was cloned into pAd/CMV/V5-DEST Gateway vector (Invitrogen) using Gateway cloning system (Invitrogen). The resulting adenoviral vector was linearized with PacI restriction enzyme and transfected into HEK293A

cells (Invitrogen). Cells were kept in culture for 7 days until the adenovirus was generated. Then the medium and the cells were collected, freeze-dried and thawed three times and centrifuged. Finally, the supernatant with the adenovirus encoding for GFP-saHMGS was collected for further adenoviral amplification.

Lentiviral particles encoding the mouse HIF1 $\alpha$  sh RNA sequence were obtained by cotransfection of the sh RNA containing vector pLKO.1-puro (MISSION shRNA Library, Sigma) together with the packaging vectors pRRE, pRSV and VSV-G in the HEK293T cell line. pRRE and pRSV contain the minimal set of lentiviral genes required to generate the virion structural proteins and packaging functions (Dull et al., 1998). VSV-G pseudotyping broadens the viral tropism associated with the virus. Lentiviral particles were obtained after 24 and 48 h of cotransfection and were purified by centrifugation at 18000 g for 2 h. Neurons were infected with the lentivirus after 24 h of the establishment of the culture. The efficiency of the knockdown was analyzed by Western Blot after 4 days of infection.

### **Fly strains and hypoxia exposure**

The GAL4/UAS system was used to control gene expression (Brand and Perrimon, 1993; Elliott and Brand, 2008). Neuronal specificity of transgene expression was achieved by using the *elav-GAL4* driver (Robinow and White, 1988). *elav-GAL4*, *UAS-GFP* and *UAS-GSi III* lines were obtained from the Bloomington Stock Centre. The *UAS-NIG III* stock was obtained from the National Institute of Genetics Fly Stock Center, Japan. Generation of transgenic flies expressing the human form of MGS (hMGS) is described in Duran et al., 2012. The hypoxia experiments were based on previous reports (Haddad et al., 1997). Briefly, groups of 16-20 flies, aged 7 days, were placed into nylon sealed tubes which allows air exchange and put into an oxygen regulated incubator (IN VIVO<sub>2</sub> 200, Ruskin) set at 0.6% O<sub>2</sub> and 99.4% N<sub>2</sub> for 1 h prior to recovery in room air (21% O<sub>2</sub>). Flies became uncoordinated within 30 s of hypoxic exposure, resulting in their fall to the bottom of the chamber, where they remained motionless for the rest of the insult. Recovery time was measured as the period of latency between the end of the insult and the time point when flies crossed an arbitrary line drawn in the tube 2 cm above the bottom.

### **Animal studies**

All procedures were approved by the Barcelona Science Park's Animal Experimentation Committee and were carried out in accordance with the European Community Council Directive and National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals. Mice were allowed free access to a standard chow diet and water and maintained on a 12:12-h light–dark cycle under specific pathogen-free conditions in the Animal Research Centre at the Barcelona Science Park. MGS-9A<sup>Pcp2</sup> mice were generated as

previously reported (Duran et al., 2012). 8 week animals were anesthetized and perfused transcardiacally with 150 mM NaCl. After five minutes the cerebellum was removed and frozen for glycogen determination.

### **Statistical analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m of 4-8 independent experiments. Unless otherwise stated, significance was analyzed by Student's *t* test using GraphPad Prism software.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. For the statistical analysis of the flies' recovery time, the Cox Proportional Hazards likelihood ratio test was used (Cox, 1972). *P* values were obtained using the R function *coxph* from package *survival* with the different trials as adjustment variable.

## **Results**

### **Neurons actively synthesize glycogen under basal conditions**

To study glycogen metabolism solely in neurons, we worked with pure neuronal cultures. After 96h of antimitotic treatment, neuronal purity of the cultures was above 99.9%, as shown by neuronal (TUJ1) and astroglial (GFAP) specific immunolabelling (Supplementary1).

Initially we wanted to determine whether neurons were synthesizing glycogen under basal conditions. Neurons were incubated with media containing [ $^{14}\text{C}$ ] – Glucose for increasing periods and the amount of radioactivity incorporated into glycogen was measured. Increasing amounts of Glucose incorporation were detected with time (Figure 1A), thus pointing to an active glycogen synthesis taking place under resting conditions. To corroborate the accumulation of glycogen, primary neurons were obtained from a brain-specific MGS knockout mouse model (Submitted). These neurons did not express MGS, as compared with the neurons obtained from their littermate controls (WT) (Figure 1B). Detectable amounts of glycogen could be measured in WT neurons, but not in the KO cells (Figure 1C), thus confirming the presence of glycogen in neurons. Although neurons have been known to express MGS, little is known about its subcellular distribution. Working with amplification techniques to overcome the sensitivity problems associated with its low expression, endogenous MGS sub-cellular localization in neurons was determined (Figure 1D). MGS

was clustered in the cytoplasm of the neuron (Figure 1D), which is the typical location for GS under conditions of an active glycogen synthesis (Diaz et al., 2011; Garcia-Rocha et al., 2001).

### **Neurons have the necessary machinery to degrade glycogen**

To analyze if neurons had the necessary machinery to mobilize glycogen, cells were incubated in conditions of diminished oxygen (hypoxia), a situation in which brain glycogen is degraded (Harik et al., 1995; Swanson et al., 1989; Wagner and Lanier, 1994). Indeed, after 4h hypoxia, glycogen content was reduced (Figure 2A, Hypoxia), in comparison with neurons grown at 21% O<sub>2</sub> (Normoxia). When analyzing the intracellular distribution of MGS, it did no longer show the spotty pattern after the hypoxic exposure (Figure 2B), which was in agreement with the degradation of glycogen previously observed. We wanted to further characterize the glycogen degradation capacity. For this purpose, neurons were forced to overexpress a mutant form of human MGS using recombinant adenovirus (Ad MGS-9A). This mutant MGS has all nine Serine residues mutated to Alanine and thus cannot be inactivated by phosphorylation, remaining in a constitutively active state. Neurons were forced to accumulate glycogen for 2 days and then exposed to 4-h hypoxia. Remarkably, glycogen was degraded after hypoxia, pointing to a strong degradation capacity, activated during incubation with low oxygen concentration (Figure 2C). The reduction of glycogen was further confirmed by immunofluorescence analysis with a glycogen antibody (Figure 2D). Interestingly, MGS-9A subcellular localization in hypoxia changed to the nucleus, no longer colocalizing with glycogen. To rule out a possible reduction in the amount of glycogen due to the decay of MGS-9A ectopic expression, its protein levels were determined by Western Blot after hypoxia (Figure 2E), finding no change in the amount of protein.

We next studied the neuronal capacity to synthesize and degrade glycogen utilizing the fly model *Drosophila melanogaster*. We used a transgenic line previously reported (Duran et al., 2012) which expresses the human form of the muscle Glycogen Synthase and accumulates glycogen specifically in neurons (*elav>hMGS*). Both the control (*elav>w118*) and the hMGS overexpressing lines were exposed to hypoxia and glycogen from whole heads was measured (Figure 2F). While in the control line there was a net reduction in glycogen of 0.43 µg, the reduction in the hMGS line corresponded to 0.81 µg. Thus, at least part of the glycogen reduction in the hMGS line corresponded to degradation occurring specifically in neurons.

This result was further supported using a genetically engineered mouse line published by our lab (Duran et al., 2012). This line expresses the active form of GS, MGS-9A, specifically in the Purkinje neurons (*MGS-9A<sup>Pcp2</sup>*). Mice were perfused with saline, mimicking an extreme aglycemic anoxic condition. The cerebellum

was isolated and total glycogen content was determined (Figure 2G). Glycogen content from control mice almost completely dropped to zero after the saline perfusion, corroborating that the model was mimicking a highly glycogenolytic situation. MGS-9A<sup>Pcp2</sup> mice, which had a 15 fold increased glycogen accumulation, also showed a marked reduction in their glycogen levels after the saline administration that can only be accounted for the glycogen being synthesized and degraded in Purkinje neurons. Taken together, our results show *in vivo* that neurons have the complete machinery to degrade glycogen.

### **Neurons can highly degrade glycogen through Brain Glycogen Phosphorylase**

We next characterized the molecular mechanism through which glycogen was mobilized. For this, neurons overexpressing MGS-9A were exposed to hypoxia and incubated in the presence of inhibitors of GP (1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, DAB), autophagy (chloroquine) or lysosomal acid alpha-1,4-glucosidase (acarbose). Only selectively blocking GP prevented glycogen from being degraded (Figure 3A). In addition, under normoxic conditions glycogen content was almost doubled when GP was inhibited. The observations were further confirmed by detecting glycogen using a specific antibody in neurons overexpressing MGS-9A (Figure 3B). No data about the isoform of GP present in neurons has been released, although astrocytes express both the muscle and brain isoforms (Pfeiffer-Guglielmi et al., 2003). Western Blot analysis using isoform specific antibodies revealed only the presence of the brain isoform (Figure 3C). No changes in total protein levels were observed after 4-h hypoxia. When determined the intracellular localization of brain GP in neurons, GP was detected both in the cell soma and in neurites, in a spotty pattern similar to MGS (Figure 3D). However, and although total GP levels remained unchanged after hypoxia, GP showed a diffuse pattern all over the soma, parallel to the degradation of glycogen. The change in pattern was accompanied by an increase in the activity of the enzyme in hypoxia (Figure 3E). Brain GP distribution was also analyzed in brain sections from adult mice. Parvalbumin positive neurons are a subtype of interneurons which have been described to express high levels of MGS (Valles-Ortega et al., 2011) and could thus be a good candidate for having the complete glycogen metabolism machinery. Therefore, these neurons were stained for Brain GP, and positive signal through the neuronal soma could be detected (Figure 3F). Astrocytic Brain GP detection, as assessed by colocalization of both Brain GP and GFAP, was used as a positive control of the study. Taken together, these findings demonstrate that neurons have the necessary machinery to degrade glycogen, and it is highly activated in conditions of low oxygen.

### **Glycogen Synthase gets activated and synthesizes glycogen in hypoxia**

MGS is highly regulated in neurons (Vilchez et al., 2007) but what can trigger its activation remains unknown. To ascertain whether hypoxia could directly regulate GS, its enzymatic activity was determined. Surprisingly, the activation state of MGS dramatically increased in neurons exposed to hypoxia (Figure 4A, left panel). GS activity in the presence of its allosteric activator G-6-P, which is taken as a measure of total GS, remained unaltered (Figure 4A, right panel), indicating no changes in the total amount of protein. The enzyme showed increased electrophoretic mobility (Figure 4B), which is characteristic of the activated, dephosphorylated form of the enzyme. Accordingly, its phosphorylation in Serine 641 almost disappeared in hypoxia. Glycogen accumulation was measured in neurons exposed to hypoxia in the presence of the GP inhibitor DAB (Figure 4C). In agreement with the GS activity data, there was a statistically significant increase in hypoxia when DAB was added, showing that both synthesis and degradation were taking place at the same time (schematically represented in Figure 4G). To further study the metabolic cycle which seemed to be occurring, GS substrate UDP Glucose was measured (Figure 4D). In hypoxia, a five fold decrease in the amount of UDP Glucose was observed. However, this decrease could be explained either by a consequence of the cellular adaptations to the lack of oxygen, as it has been reported (Aw and Jones, 1984) or as a result of the overactivation of GS. To solve this controversy, UDP Glucose levels in hypoxia were measured in neurons lacking GS. Neurons without GS had equivalent levels of UDP Glucose as the wild type ones, demonstrating that the hypoxia-induced decrease in UDP Glucose was not the consequence of increased GS activity. Interestingly, basal levels of UDP Glucose in GS KO neurons were significantly higher than the WT, supporting the hypothesis that neurons have an active glycogen synthesis under resting conditions.

Hypoxia induced transcription factors (HIF) are a family of transcription factor complex which are degraded in the presence of oxygen via hydroxylation mediated proteolysis. HIF complex is a heterodimer composed of an inducible-expressed HIF $\alpha$  subunit and a constitutively-expressed HIF $\beta$  subunit (Wang et al., 1995). Reduced oxygen availability induces HIF $\alpha$  accumulation by relaxing its proteasome dependent degradation (Maxwell et al., 1999). The transcription factor binds to HIF1 $\beta$  and activates a number of adaptive responses to match O<sub>2</sub> reduction. There are two HIF $\alpha$  subunits, the HIF1 $\alpha$  and HIF2  $\alpha$ , structurally similar but which differ in their target genes (Hu et al., 2003). HIF1 $\alpha$  regulates glycogen metabolism in order cell types (Pescador et al., 2010; Shen et al., 2010), by increasing the expression of GS. After hypoxia, HIF1 $\alpha$  stabilization could be detected (Supplementary Figure 2). However, no alterations in the hypoxia mediated GS activation could be determined when HIF1 $\alpha$  was silenced.

After a hypoxic episode, total brain glycogen levels are reported to rise above the normal levels before the insult (Brucklacher et al., 2002), known as a supercompensation mechanism. To test if this may also be the case in neurons, glycogen content was determined in neurons exposed to 4h 1% O<sub>2</sub> conditions, and then incubated for increasing periods of time under 21% O<sub>2</sub> (reoxygenation). Indeed, there was a two-fold increase compared to the basal glycogen levels after 20 hours of 21% O<sub>2</sub> exposure (Figure 4E). The levels fell to the normal values after 30 hours of reoxygenation, as previously described for the whole brain (Brucklacher et al., 2002). UDP Glucose concentration increased after reoxygenation, and reached the basal levels after 20 hours (Figure 4F), thus no longer being a limiting factor in the synthesis of glycogen.

### **Glycogen Synthase has a protective role in neurons in hypoxia**

In order to address the functional relevance of the neuronal glycogen metabolism, neurons isolated either from WT or GS KO mice were subjected to increasing hypoxia exposures, and neuronal death was assessed (Figure 5A). A time dependent increase in neuronal death was observed in WT cells. Importantly, GS KO neuronal mortality in hypoxia was clearly enhanced when compared to the WT control, therefore demonstrating that GS was playing a role in the neuronal response to the lack of oxygen.

To corroborate the importance of glycogen metabolism for neurons *in vivo*, we studied its role in *Drosophila melanogaster*. We generated a fly model system in which we knocked down *Drosophila* GS (dGS) specifically in neurons with shRNA constructs. We first determined the efficiency of the dGS knock down, by measuring the messenger RNA levels of dGS from total heads (Figure 5C). The levels of GS were lower in the GSi III than in the NIG III line. Based on previous reports where tolerance to a hypoxic stresses was tested in flies (Chen et al., 2002; Ma and Haddad, 1997), flies were exposed for one hour to 0.6% O<sub>2</sub>, and their recovery latency in room air was determined, as a read out of their hypoxic tolerance (Figure 5D). Knocking down dGS in adult neurons significantly enlarged the recovery time of both knock down lines compared to the control lines, making these flies more sensitive to the stress. Although both knock down lines showed a statistically increase in their recovery time, GSi III line showed a worse phenotype than NIG III, which was in accordance with the different knock down efficiencies shown Figure 5C. To corroborate that the observed effects were due to the transgene expression and not due to strain dependent differences, we determined the recovery latency of the control crosses GFP> w118, GFP> GSi III and GFP> NIG III. These crosses lack the expression of the transcription factor GAL4 and do not consequently express the shRNA against dGS (Supplementary 3). No differences could be seen between the different lines.

## Discussion

In this study we illustrate the presence of glycogen in neurons and report a situation in which neuronal glycogen metabolism plays a crucial role for neuronal survival. Our findings demonstrate the existence of a modifiable glycogen pool in neurons during resting conditions, as well as a previously uncharacterized glycogen degradation capacity which is mediated through the expression of the brain isoform of Glycogen Phosphorylase (GP).

For the past decades, the presence of glycogen in neurons has been thoroughly debated (reviewed in (Brown, 2004)). The disagreement regarding the presence of glycogen in neurons might be due to its low concentration, physical state and turnover of the polysaccharide, which may influence its proper detection. In addition, the rapid activation of the degradation machinery during the anoxia which accompanies the post mortem state could explain the disparities in the released data. To better control the environmental influences on glycogen metabolism, and to study the existence of glycogen exclusively in neurons, we have worked with pure neuronal cultures. Since our studies are restricted to primary neuronal cultures from telencephalon and specific neuronal types in animals, the possibility that different subset of neurons could differ in their response in glycogen metabolism should not be ruled out. From our results we conclude that neurons actively synthesize glycogen, which is absent in neurons isolated from MGS KO mice.

Furthermore we show that neurons have a strong capacity of glycogen degradation. This is the case both in neuronal cultures as well as in mice and flies. The combination of the low concentration of glycogen and the degradation capacity observed in neurons could have hindered its proper detection. We have shown that the degradation is mediated through the expression of GP, present in both neuronal cultures and neurons from adult mice brain slices. Previous studies show that neurons actively express GP, although for the last decade they have been reported to lack the enzyme. Possible explanations of these discrepancies could be as follows: on the one hand glycogen bound enzymes have a highly dynamic cellular translocation depending on the energetic status of the cell and its proper detection is influenced by the presence of glycogen which they bind to. As seen in this study, both MGS and GP can be detected by immunofluorescence only when glycogen is present, but not when neurons are exposed to hypoxia, although total protein levels remain unaltered. On the other hand, the sensitivity of the method has to be taken into account when analyzing these low abundant proteins: in this study both GS and GP could only be detected when using an amplification based protocol. Since GP levels in neurons are far lower than the ones in astrocytes (Pellegrini et al., 1996), it seems plausible that the detection techniques weren't sensitive enough. Our results show that neurons express exclusively the brain isozyme and not the muscle one, while

astrocytes express both (Pfeiffer-Guglielmi et al., 2003). Both isoforms differ in their kinetic properties. The muscle isoform, principally activated through phosphorylation, is primarily tailored to respond to extracellular control via signals triggering the phosphorylation cascade, whereas the brain isoform, extremely sensitive to increases in AMP levels, is more adapted to provide energy for internal benefits (Crerar et al., 1995). Thus, the fact that neurons expressed only the brain isoenzyme suggests that glycogen metabolism in these cells is primarily designed to respond to their own high energetic demands.

Neurons showed a glycogen turnover under resting conditions, as suggested by the incorporation of radiolabelled glucose into glycogen while glycogen amount was kept in steady-state. When a constitutively active form of GS was expressed, there was degradation of the polysaccharide, which was reverted upon GP inhibition. These findings suggest a regulation of the neuron to control the deposition of glycogen. Since an overaccumulation of glycogen in neurons triggers apoptosis, the necessity to limit its concentration seems a plausible mechanism.

However, under hypoxic conditions, both glycogen synthesis and degradation increased with net glycogen consumption (represented in Figure 4G). While seeming initially counterintuitive, the parallel activation of glycogen synthesis and degradation was first shown by (Shulman and Rothman, 2001) in exercised muscle and referred to as the “glycogen shunt”. This dynamic role of the glycogen molecule has been justified by the capacity of yielding energy at a specific time point very rapidly, with a faster ATP production per molecule from glycogen derived glucose than from extracellular hexose. Albeit being energetically unfavorable viewed in short term, it would suppose a benefit at a long term, since glycogen pools would never run out totally. In the brain, the glycogen shunt hypothesis has been also demonstrated to occur (Shulman et al., 2001). It has been associated with intense neuronal stimulation (Dienel et al., 2007; Pentreath and Kai-Kai, 1982; Swanson et al., 1992), ischemia (Goldberg and O'Toole, 1969) and glutamate uptake (Walls et al., 2009).

The dynamics of the cycle are, however, still to be elucidated. From our results we conclude that glycogen synthesis is increased in hypoxia, as GP inhibition causes an over-accumulation of glycogen. GS is strongly dephosphorylated and thus activated in hypoxia. However, other factors might be limiting the rate of glycogen synthesis. Indeed, the levels of both the allosteric activator of GS, G-6-P, and its substrate, UDP Glucose, fall in hypoxia, and could negatively regulate the activity of the enzyme. A different regulation of the process could be a compartmentalization of metabolites, as it could be the case with glycogen derived or hexokinase derived G-6-P. Thus, the production of G-6-P in a specific subcellular region would respond to the local needs inside the cells. This has been described to be the case with lactate derived from cellular

glucose and from glycogen in astrocytes (Sickmann et al., 2005). The compartmentalization could even occur between different glycogen molecules. Synthesis and degradation of glycogen could be spatiotemporally separated (i.e. in different neurons or even inside one neuron in perikarya and axon), something which would not be detectable when performing biochemical analysis with one cellular extract.

Moreover, the hypoxia-induced activation of GS could be a preparation mechanism for the neuron to immediately resynthesize glycogen once the stress is over. Glycogen in the brain has been described to supercompensate, reaching glycogen levels above the initial values after different stresses such as hypoglycemia (Canada et al., 2003) and hypoxia (Brucklacher et al., 2002). We have shown that this is the case in neurons when incubated back to 21% O<sub>2</sub>, when UDP Glucose levels no longer represent a limiting factor. This supercompensation has been hypothesized as a protection mechanism against further stresses. For the supercompensation to occur, a previous activation of GS would be required. This situation would mimic an exercising muscle, in which GS gets activated parallel to net glycogen reduction (Shulman and Rothman, 2001) and there is a glycogen super-compensation after the contraction.

This is the first time in which a biological function for glycogen metabolism in neurons has been demonstrated. Brain glycogen energetically sustains neuronal function under high activity or hypoglycemic conditions. However, this role has exclusively been attributed to astrocytes. Here we report an energetic challenging situation in which GS in neurons prevents the cell from death. If the protection derives from the basal glycogen or the enhanced glycogen turnover is still to be determined. Although extracellular glucose is not significantly decreased in hypoxia (data not shown), the decrease of intracellular G-6-P levels suggests that the uptake and phosphorylation of glucose is a limiting factor to fulfill the energetic needs of the neuron subjected to hypoxia. The lower levels of G-6-P in hypoxia in neurons devoid of GS compared to the WT suggest that glycogen could serve as an energetic buffer to prevent G-6-P levels from massive drop in hypoxia. G-6-P could then be further oxidized via glycolysis to obtain additional energy. Besides its role as a readily available fuel store, G-6-P levels could enter the pentose phosphate pathway to generate the NADPH required for restoring the glutathione engaged in the cellular defense against reactive oxygen species, as it is the case with glycogen from astrocytes (Rahman et al., 2000).

On the whole, here we present novel data which demonstrate that neuronal glycogen metabolism plays a crucial role for the survival of the neuron under stress conditions. These findings introduce a new player into the brain energetics and should be taken into account when analyzing the multiple roles glycogen has in the brain. In addition, our findings could be therapeutically relevant if considering the multiple conditions in which the neuron encounters a stress and is consequently challenged energetically.

## References

- Aw, T.Y., and Jones, D.P. (1984). Control of glucuronidation during hypoxia. Limitation by UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem J* 219, 707-712.
- Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J., and Litt, G.J. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125, 279-285.
- Borke, R.C., and Nau, M.E. (1984). Glycogen, its transient occurrence in neurons of the rat CNS during normal postnatal development. *Brain Res* 318, 277-284.
- Bouskila, M., Hunter, R.W., Ibrahim, A.F., Delattre, L., Pegg, M., van Diepen, J.A., Voshol, P.J., Jensen, J., and Sakamoto, K. (2010). Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metab* 12, 456-466.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brown, A.M. (2004). Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem* 89, 537-552.
- Brown, A.M., Evans, R.D., Black, J., and Ransom, B.R. (2012). Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function. *Annals of Neurology*, n/a-n/a.
- Brown, A.M., Tekkok, S.B., and Ransom, B.R. (2003). Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol* 549, 501-512.
- Brucklacher, R.M., Vannucci, R.C., and Vannucci, S.J. (2002). Hypoxic preconditioning increases brain glycogen and delays energy depletion from hypoxia-ischemia in the immature rat. *Dev Neurosci* 24, 411-417.
- Cammermeyer, J., and Fenton, I.M. (1981). Improved preservation of neuronal glycogen by fixation with iodoacetic acid-containing solutions. *Experimental neurology* 72, 429-445.
- Canada, S.E., Weaver, S.A., Sharpe, S.N., and Pederson, B.A. (2003). Brain glycogen supercompensation in the mouse after recovery from insulin-induced hypoglycemia. *J Neurosci Res* 89, 585-591.
- Cataldo, A.M., and Broadwell, R.D. (1986). Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions: I. Neurons and glia. *Journal of Electron Microscopy Technique* 3, 413-437.
- Cid, E., Cifuentes, D., Baque, S., Ferrer, J.C., and Guinovart, J.J. (2005). Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase. *Febs J* 272, 3197-3213.
- Cox, D.R. (1972). Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 34, 187-220.
- Crerar, M.M., Karlsson, O., Fletterick, R.J., and Hwang, P.K. (1995). Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation. *J Biol Chem* 270, 13748-13756.
- Cruz, N.F., and Dienel, G.A. (2002). High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1476-1489.
- Chen, Q., Ma, E., Behar, K.L., Xu, T., and Haddad, G.G. (2002). Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 277, 3274-3279.
- Choi, I.Y., Seaquist, E.R., and Gruetter, R. (2003). Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J Neurosci Res* 72, 25-32.
- Chryssanthopoulos, C., Williams, C., Nowitz, A., and Bogdanis, G. (2004). Skeletal muscle glycogen concentration and metabolic responses following a high glycaemic carbohydrate breakfast. *Journal of sports sciences* 22, 1065-1071.
- Diaz, A., Martinez-Pons, C., Fita, I., Ferrer, J.C., and Guinovart, J.J. (2011). Processivity and subcellular localization of glycogen synthase depend on a non-catalytic high affinity glycogen-binding site. *J Biol Chem* 286, 18505-18514.
- Dienel, G.A., Ball, K.K., and Cruz, N.F. (2007). A glycogen phosphorylase inhibitor selectively enhances local rates of glucose utilization in brain during sensory stimulation of conscious rats: implications for glycogen turnover. *J Neurochem* 102, 466-478.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Duran, J., Tevy, M.F., Garcia-Rocha, M., Calbo, J., Milan, M., and Guinovart, J.J. (2012). Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice. *EMBO Mol Med* 4, 719-729.
- Elliott, D.A., and Brand, A.H. (2008). The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol* 420, 79-95.
- Friede, R.L. (1959). Histochemical distribution of phosphorylase in the brain of the guinea-pig. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 22, 325-329.

Friede, R.L. (1966). *Topographic Brain Chemistry*. (Academic Press, New York).

Garcia-Rocha, M., Roca, A., De La Iglesia, N., Baba, O., Fernandez-Novell, J.M., Ferrer, J.C., and Guinovart, J.J. (2001). Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 357, 17-24.

Gibbs, M.E., Anderson, D.G., and Hertz, L. (2006). Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens. *Glia* 54, 214-222.

Gilboe, D.P., Larson, K.L., and Nuttall, F.Q. (1972). Radioactive method for the assay of glycogen phosphorylases. *Anal Biochem* 47, 20-27.

Goldberg, N.D., and O'Toole, A.G. (1969). The properties of glycogen synthetase and regulation of glycogen biosynthesis in rat brain. *J Biol Chem* 244, 3053-3061.

Goncharova, L.S. (1957). [Some protein substances in large arteries in hypertension with atherosclerotic lesions]. *Arkh Patol* 19, 35-40.

Haddad, G.G., Sun, Y., Wyman, R.J., and Xu, T. (1997). Genetic basis of tolerance to O<sub>2</sub> deprivation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10809-10812.

Harik, S.I., Lust, W.D., Jones, S.C., Lauro, K.L., Pundik, S., and LaManna, J.C. (1995). Brain glucose metabolism in hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 79, 136-140.

Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 23, 9361-9374.

Ibrahim, M.Z., Atlan, H., Miquel, J., and Castellani, P. (1970). Synthetic and hydrolytic enzymes of glycogen in the normal and the irradiated rat brain. *Radiat Res* 43, 341-356.

Ignacio, P.C., Baldwin, B.A., Vijayan, V.K., Tait, R.C., and Gorin, F.A. (1990). Brain isozyme of glycogen phosphorylase: immunohistological localization within the central nervous system. *Brain Res* 529, 42-49.

Inoue, N., Matsukado, Y., Goto, S., and Miyamoto, E. (1988). Localization of glycogen synthase in brain. *J Neurochem* 50, 400-405.

Koizumi, J., and Shiraishi, H. (1970). Glycogen accumulation in dendrites of the rabbit pallidum following trifluoperazine administration. *Exp Brain Res* 11, 387-391.

Lipton, P. (1989). Regulation of glycogen in the dentate gyrus of the in vitro guinea pig hippocampus; effect of combined deprivation of glucose and oxygen. *J Neurosci Methods* 28, 147-154.

Ma, E., and Haddad, G.G. (1997). Anoxia regulates gene expression in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Brain Res Mol Brain Res* 46, 325-328.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.

Newgard, C.B., Hirsch, L.J., Foster, D.W., and McGarry, J.D. (1983). Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway? *J Biol Chem* 258, 8046-8052.

Passonneau, J.V., and Lowry, O.H. (1971). Metabolite flux in single neurons during ischemia and anesthesia. *Curr Probl Clin Biochem* 3, 198-212.

Pellegrini, G., Rossier, C., Magistretti, P.J., and Martin, J.L. (1996). Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain Res Mol Brain Res* 38, 191-199.

Pentreath, V.W., and Kai-Kai, M.A. (1982). Significance of the potassium signal from neurones to glial cells. *Nature* 295, 59-61.

Pescador, N., Villar, D., Cifuentes, D., Garcia-Rocha, M., Ortiz-Barahona, A., Vazquez, S., Ordonez, A., Cuevas, Y., Saez-Morales, D., Garcia-Bermejo, M.L., et al. (2010). Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One* 5, e9644.

Peters, A., Palay, S. L., Webster, H. (1991). *Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells*. (Oxford University Press, USA).

Pfeiffer-Guglielmi, B., Fleckenstein, B., Jung, G., and Hamprecht, B. (2003). Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem* 85, 73-81.

Roach, P.J., Cheng, C., Huang, D., Lin, A., Mu, J., Skurat, A.V., Wilson, W., and Zhai, L. (1998). Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology* 9, 139-151.

Robinow, S., and White, K. (1988). The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev Biol* 126, 294-303.

Shen, G.M., Zhang, F.L., Liu, X.L., and Zhang, J.W. (2010). Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia. *FEBS Lett* 584, 4366-4372.

Shimizu, N., and Kumamoto, T. (1952). Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain. *Anat Rec* 114, 479-497.

Shulman, R.G., Hyder, F., and Rothman, D.L. (2001). Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6417-6422.

Shulman, R.G., and Rothman, D.L. (2001). The "glycogen shunt" in exercising muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 457-461.

Sickmann, H.M., Schousboe, A., Fosgerau, K., and Waagepetersen, H.S. (2005). Compartmentation of lactate originating from glycogen and glucose in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 30, 1295-1304.

Simo, S., Pujadas, L., Segura, M.F., La Torre, A., Del Rio, J.A., Urena, J.M., Comella, J.X., and Soriano, E. (2007). Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cereb Cortex* 17, 294-303.

Skurat, A.V., Wang, Y., and Roach, P.J. (1994). Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J Biol Chem* 269, 25534-25542.

Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810-823.

Swanson, R.A., Morton, M.M., Sagar, S.M., and Sharp, F.R. (1992). Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography. *Neuroscience* 51, 451-461.

Swanson, R.A., Sagar, S.M., and Sharp, F.R. (1989). Regional brain glycogen stores and metabolism during complete global ischaemia. *Neurol Res* 11, 24-28.

Takeuchi, T. (1958). Histochemical demonstration of branching enzyme (amylo-1,4-1,6-transglucosidase) in animal tissues. *J Histochem Cytochem* 6, 208-216.

Takeuchi, T. (1965). [Histochemical observations on glycogen metabolism in nerve tissue]. *Shinkei Kenkyu No Shimpō* 9, 695-699.

Thomas, J.A., Schlender, K.K., and Lerner, J. (1968). A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal Biochem* 25, 486-499.

Valles-Ortega, J., Duran, J., Garcia-Rocha, M., Bosch, C., Saez, I., Pujadas, L., Serafin, A., Canas, X., Soriano, E., Delgado-Garcia, J.M., et al. (2011). Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease. *EMBO Mol Med* 3, 667-681.

Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Valles, J., Garcia-Fojeda, B., Criado-Garcia, O., Fernandez-Sanchez, E., Medrano-Fernandez, I., Dominguez, J., et al. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* 10, 1407-1413.

Villar-Palasi, C., and Guinovart, J.J. (1997). The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *Faseb J* 11, 544-558.

Wagner, S.R.t., and Lanier, W.L. (1994). Metabolism of glucose, glycogen, and high-energy phosphates during complete cerebral ischemia. A comparison of normoglycemic, chronically hyperglycemic diabetic, and acutely hyperglycemic nondiabetic rats. *Anesthesiology* 81, 1516-1526.

Walls, A.B., Heimbürger, C.M., Bouman, S.D., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2009). Robust glycogen shunt activity in astrocytes: Effects of glutamatergic and adrenergic agents. *Neuroscience* 158, 284-292.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.

Watanabe, H., and Passonneau, J.V. (1973). Factors affecting the turnover of cerebral glycogen and limit dextrin in vivo. *J Neurochem* 20, 1543-1554.

Wolfe, D.E., and Nicholls, J.G. (1967). Uptake of radioactive glucose and its conversion to glycogen by neurons and glial cells in the leech central nervous system. *J Neurophysiol* 30, 1593-1609.

Zhu, A., Romero, R., and Petty, H.R. (2009). An enzymatic fluorimetric assay for glucose-6-phosphate: application in an in vitro Warburg-like effect. *Anal Biochem* 388, 97-101.

## Figure Legends

**Figure 1. Neurons actively synthesize glycogen under basal conditions.** (A) Time dependent glucose incorporation into glycogen. Neuronal cultures obtained from WT mice were cultured in the presence of [ $^{14}\text{C}$ ] - Glucose for the indicated times. After this incubation period, glycogen was extracted and incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ] - Glucose was measured. \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus 0.5h. (B) Neuronal cultures were obtained from WT and -brain specific- GYS1 KO mice and tested for the expression of MGS by Western blot analysis and (C) glycogen content. Actin was used as a loading control for the Western Blot. \* $P < 0.05$  versus WT. (D) Detection by immunofluorescence of MGS (red) and neuronal specific marker,  $\beta$ -III tubulin, TUJ1 (grey) in WT neurons. Cells were grown in coverslips and fixed with Paraformaldehyde after day in vitro (DIV) 5. Nuclei were stained with Hoechst 33342 and images were acquired with a confocal microscope using a 63x objective. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2. Neurons have the necessary machinery to degrade glycogen.** (A) Glycogen content after hypoxic exposure. Neuronal cultures were exposed for 4h to 1%  $\text{O}_2$  and rapidly frozen. Glycogen content was determined in control (Normoxia, exposed to environmental 21%  $\text{O}_2$ ) and treated neurons (Hypoxia, exposed to 1%  $\text{O}_2$ ) \*\*\* $P < 0.001$  versus Normoxia. (B) Immunofluorescence analysis with MGS (red) and TUJ1 (grey) in control neurons and after hypoxic insult. Cells were incubated for 4h in 1%  $\text{O}_2$  and were fixed with Paraformaldehyde. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342. All images were acquired with a confocal microscope using a 63x objective. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . (C) Glycogen content after hypoxic exposure of neurons overexpressing a constitutively active Glycogen Synthase (Ad MGS-9A). Neuronal cultures were infected with adenovirus encoding MGS-9A for 24h and were subsequently exposed to 1%  $\text{O}_2$  for 4h. The plates were rapidly frozen and analyzed for glycogen content. No inf= non infected cells. \*\*\* $P < 0.001$  versus Normoxia Ad MGS-9A. (D) Glycogen (red) and MGS-9A (green) immunocytochemistry of primary cultures of neurons infected with Ad MGS-9A and exposed 4h hypoxia under the same conditions as C. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342. All images were acquired with an epifluorescent microscope using a 40x objective. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ . (E) Western Blot analysis against MGS-9A of neurons overexpressing MGS-9A and exposed to hypoxia as described in C. (F) Glycogen content in a *Drosophila melanogaster* line overexpressing human muscle GS (hMGS) specifically in neurons. Flies were exposed for 1 hour to 0.6%  $\text{O}_2$  and immediately frozen in liquid nitrogen. Heads were dissected and glycogen content was determined from 5 heads per sample. The line elav> w118 (w118) was used as a control. \*  $P < 0.05$  versus w118 Normoxia and \*\*\*  $P < 0.001$  versus hMGS Normoxia. All flies were tested at 7 days of age. (G) Glycogen content in the

cerebellum of a genetically engineered mouse which accumulates glycogen in the neurons. 8 week old mice overexpressing the constitutively active form of GS (MGS-9A) specifically in the Purkinje neurons (MGS-9A<sup>Pcp2</sup>) were perfused with saline. Cerebellum was isolated and rapidly frozen. Their mice littermates lacking expression of MGS-9A (Ctrl) were used as a control. \*\*\*  $P < 0.001$  versus Ctrl – Saline and \*\*  $P < 0.01$  versus MGS-9A<sup>Pcp2</sup> – Saline.

**Figure 3. Glycogen Phosphorylase is responsible for the hypoxia mediated glycogen degradation in neurons.** (A) Neuronal cultures were infected with adenovirus encoding a constitutively active Glycogen Synthase (Ad MGS-9A) for 24h, incubated with inhibitors of Glycogen Phosphorylase (DAB), autophagy (Chloroquine) and acid alpha-1,4-glucosidase (Acarbose) and were immediately exposed to 1% O<sub>2</sub> for 4h. Glycogen content was determined biochemically. \*\*\* $P < 0.001$  versus control without inhibitor inside the normoxic or hypoxic group (B) Glycogen detection by immunocytochemistry of glycogen in neurons treated with adenovirus and exposed to hypoxia under the same conditions as A. All images were acquired with an epifluorescent microscope using a 40x objective. Scale bar = 20  $\mu$ m. (C) Brain and muscle specific isoform levels of Glycogen Phosphorylase (Brain GP and Muscle GP, respectively) in neurons exposed to hypoxia. Neurons obtained from WT animals were exposed to 1% O<sub>2</sub> for 4h. GFAP, an astroglial marker, was used to rule out a possible contamination of astrocytes on the neuronal extracts and total brain homogenate (B) was loaded as a positive control for Brain, Muscle GP and GFAP. (D) Brain GP intracellular detection (red) by immunofluorescence in primary neuronal cultures exposed to 1% O<sub>2</sub> for 4h. TUJ1 (grey) and Hoechst 33342 (blue) staining is used as markers of neurons and nuclei, respectively. All images were acquired with an epifluorescent microscope using a 40x objective. Scale bar = 20  $\mu$ m. (E) GP activity, expressed as a ratio between the activity in the presence of Caffeine and AMP (+ Caf/ + AMP), in primary neurons exposed to 1% O<sub>2</sub>. \* $P < 0.05$  versus Normoxia. (F) Representative images of brain GP localization in brain slices from adult mice. 40 week old mice were perfused with paraformaldehyde, and brains were frozen. Slices were stained for the brain specific GP isoform (red, see white arrows), Parvalbumin (green, a-c) and GFAP (grey, d-f), markers specific for neurons and astroglia, respectively. Nuclei (blue) were stained with Hoechst 3342. Images were obtained with a confocal microscope using a 63x objective. Scale bar = 10  $\mu$ m.

**Figure 4. Glycogen Synthase is activated and synthesizes glycogen in hypoxia.** (A) GS activity ratio (expressed as the ratio – G-6-P/ + G-6-P, left panel) and total GS activity (measured in the presence of G-6-P, right panel) in neuronal cultures exposed to 1% O<sub>2</sub> for 4h. \*\*\* $P < 0.001$  versus normoxia. (B) Western Blot

analysis using antibodies against total (MGS) and phosphorylated 641 Serine MGS (pMGS) in neuronal cultures after the same treatment as **A**. Actin was used as a loading control. **(C)** Glycogen content of neurons after hypoxia in the presence of the Glycogen Phosphorylase inhibitor DAB. Neuronal cultures were incubated in the presence or absence of 0.1mM DAB for 1 hour and subsequently exposed to 1% O<sub>2</sub> for 4h. Cells were frozen and glycogen was determined. \* $P < 0.05$  of + DAB hypoxia versus + DAB normoxia. \*\*\* $P < 0.001$  of + DAB hypoxia versus – DAB hypoxia. **(D)** Intracellular UDP Glucose levels of neurons obtained either from WT animals or – brain specific- GYS1 KO mice and exposed to 4h 1%O<sub>2</sub>. \*\*\* $P < 0.001$  of WT normoxia versus WT hypoxia and KO normoxia. **(E)** Glycogen content and **(F)** UDP Glucose levels in reoxygenated neurons. Neurons were exposed for 4h to 1% O<sub>2</sub> and then incubated at 21% O<sub>2</sub> (Reoxygenation) for the indicated times. **(F)** Schematic representation of glycogen turnover in normoxia and hypoxia. MGS and BGP are mostly inactive in hypoxia (circle) and get activated in hypoxia (stars).

**Figure 5. Glycogen Synthase has a protective role in neurons in hypoxia** **(A)** Death fold change after increasing hypoxic times in GS Wild Type (WT, rhombus) and Knock Out (KO, square) neurons. Neurons were isolated from GYS1 WT or KO animals, exposed for the indicated times to 1% O<sub>2</sub> and stained with two cell permeable dyes, which differentially stained living and dead cells. The average of dead cells was estimated in 10 fields from 5-8 independent animals, 900-1000 total cells. Data were normalized against 2h normoxia for WT neurons. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$  of Hypoxia KO versus Hypoxia WT. **(C)** dGS mRNA levels from whole adult heads in several *Drosophila melanogaster* transgenic lines. In these lines, the promotor *elav* drives the expression of UAS-GFP control (GFP) and two short hairpin RNAi constructs targeting *Drosophila* GS (dGS): UAS-sh dGS Gsi III (Gsi III) or UAS- sh dGS NIG III (NIG III), using the UAS-GAL4 system. W118 *elav* driven control lines lacking any UAS insertion were used as an additional control (w118). \*  $P < 0.05$  versus GFP. **(D)** Time to recovery after hypoxic exposure of the transgenic lines used in **C** (control lines, GFP, black and w118, grey; and the dGS *knock down* lines Gsi III, green and NIG III, red). Groups of 16 flies were placed in a nylon sealed tube and incubated for to 0.6% O<sub>2</sub>, during which they entered in a stupor state. After 1h, flies were again exposed to environmental oxygen tension and the time to recover their motor functions was determined for each line.  $P$  values were calculated against GFP using the Cox proportional hazard model.

**Supplementary 1. Neuronal and astrocytic composition of primary neuronal cultures.** Neurons were obtained from WT mice and incubated for 96h in the presence of antimetotics. Composition of neurons and

astrocytes was assessed by immunofluorescence using neuron (TUJ1) and astrocyte (GFAP) specific antibodies. Images were obtained with a confocal microscope using a 10x objective. Scale bar = 40  $\mu$ m.

**Supplementary 2. GS is activated through a HIF1 $\alpha$  independent mechanism. (A)** Western Blot analysis against HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  in neuronal cultures exposed 1% O<sub>2</sub> for 4h **(B)** Hypoxia mediated GS activation was measured after silencing HIF1 $\alpha$ . Neurons were infected 24hours after the establishment of the culture with lentivirus containing a shRNA sequence against HIF1 $\alpha$  (sh1 HIF1 $\alpha$ ). After 3 days of expression of the transgene, neurons were exposed to the same conditions as **A** and analyzed by Western Blot for HIF1 $\alpha$ , total (MGS) and phosphorylated 641 Serine GS (pMGS). Scrambled shRNA and sh2 HIF1 $\alpha$ , which weren't expected to knock down the levels of HIF1 $\alpha$ , were used as controls. Actin was used as a loading control.

**Supplementary 3. The impaired hypoxic response in *Drosophila* UAS dGS RNAi lines is dGS knockdown dependent.** Time of recovery to 1h of 0.6% O<sub>2</sub> hypoxic exposure of different *Drosophila melanogaster* transgenic lines. The flies contain one UAS-dGS RNAi chromosome (NIG III or GSi III) and another of elav-GAL4, and so do not express the transcription factor GAL4. Consequently, these lines are not expected to exhibit any knock down of dGS. *P* values were calculated against w118 using the Cox proportional hazard model.

Figure 1

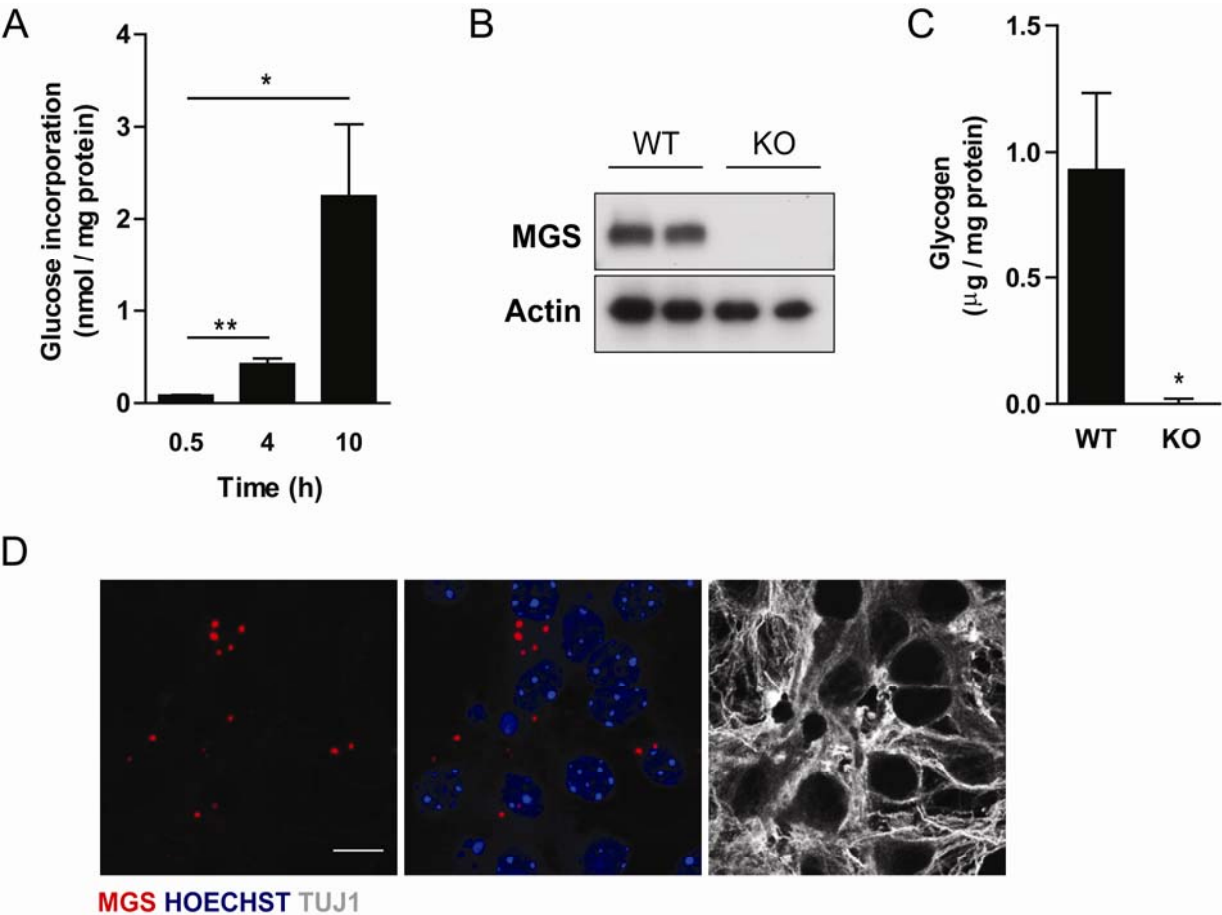


Figure 2

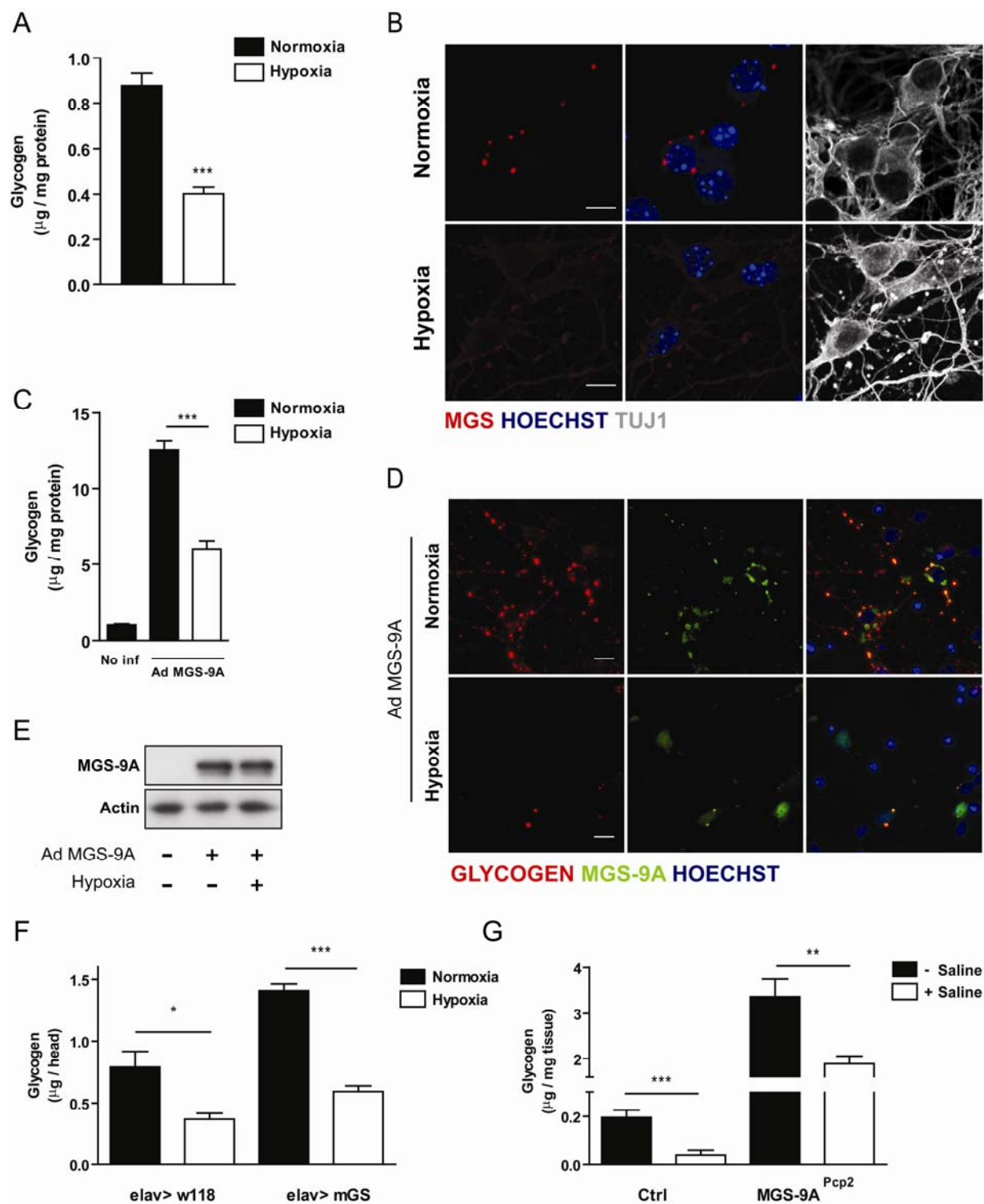
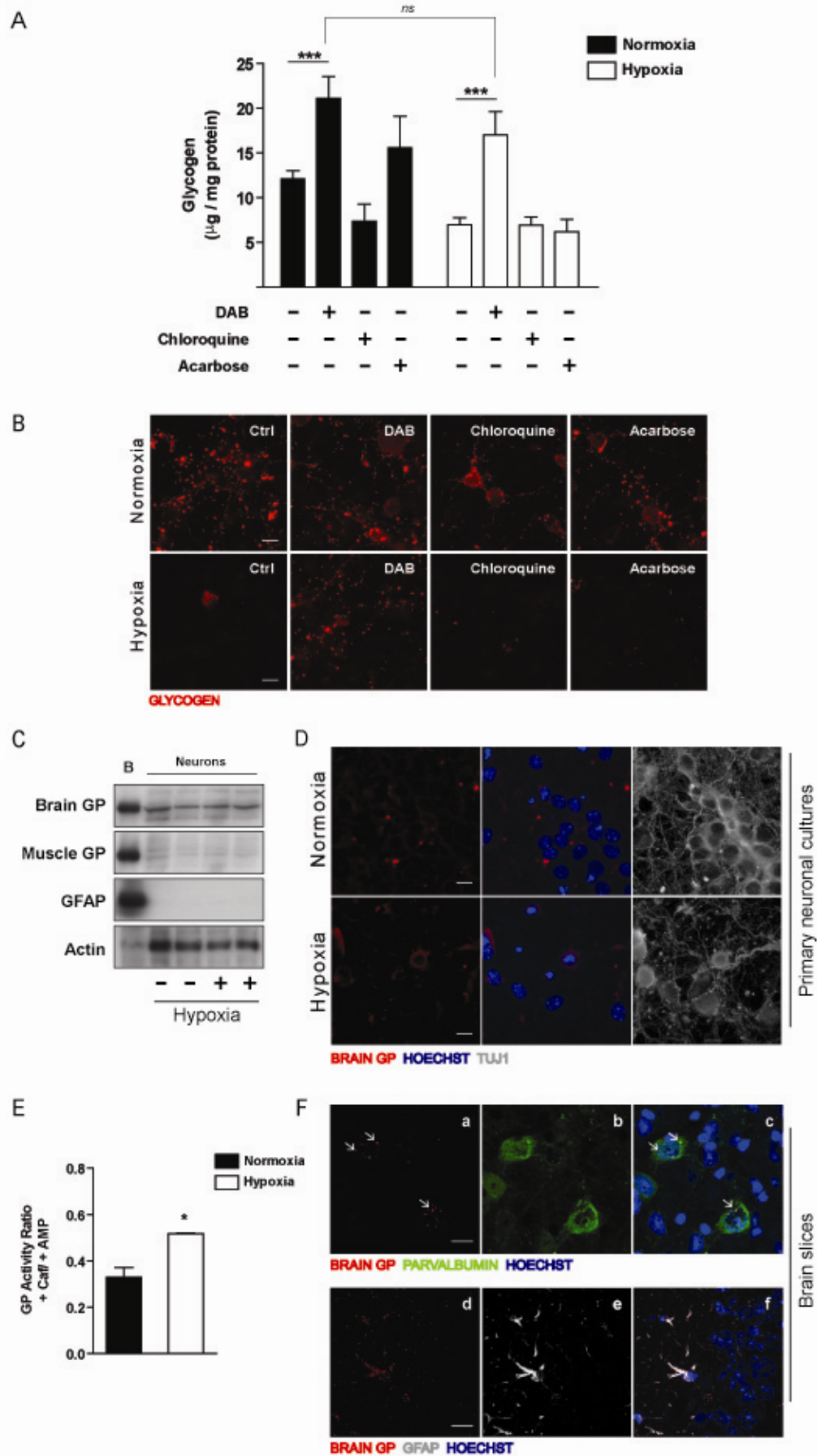
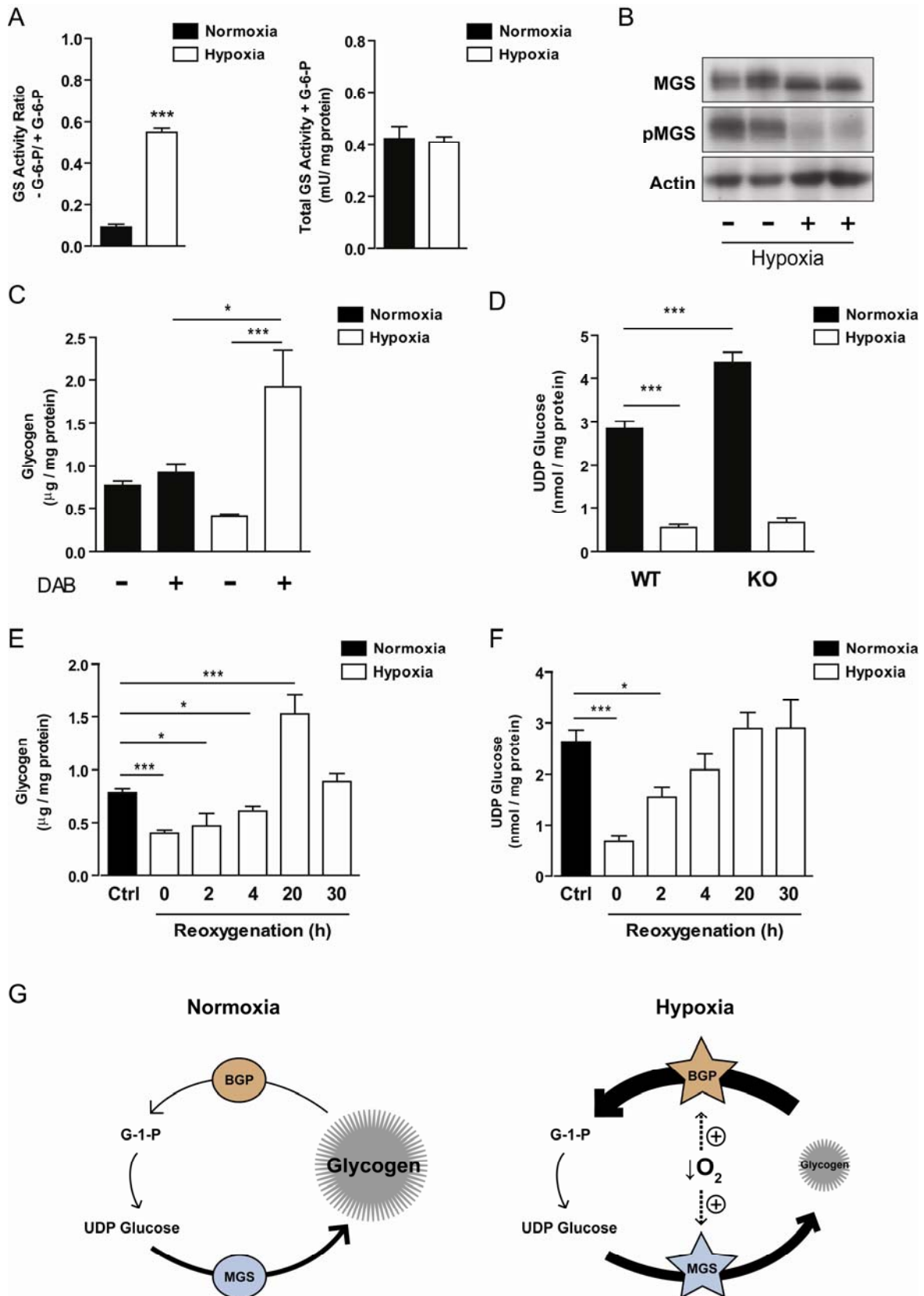


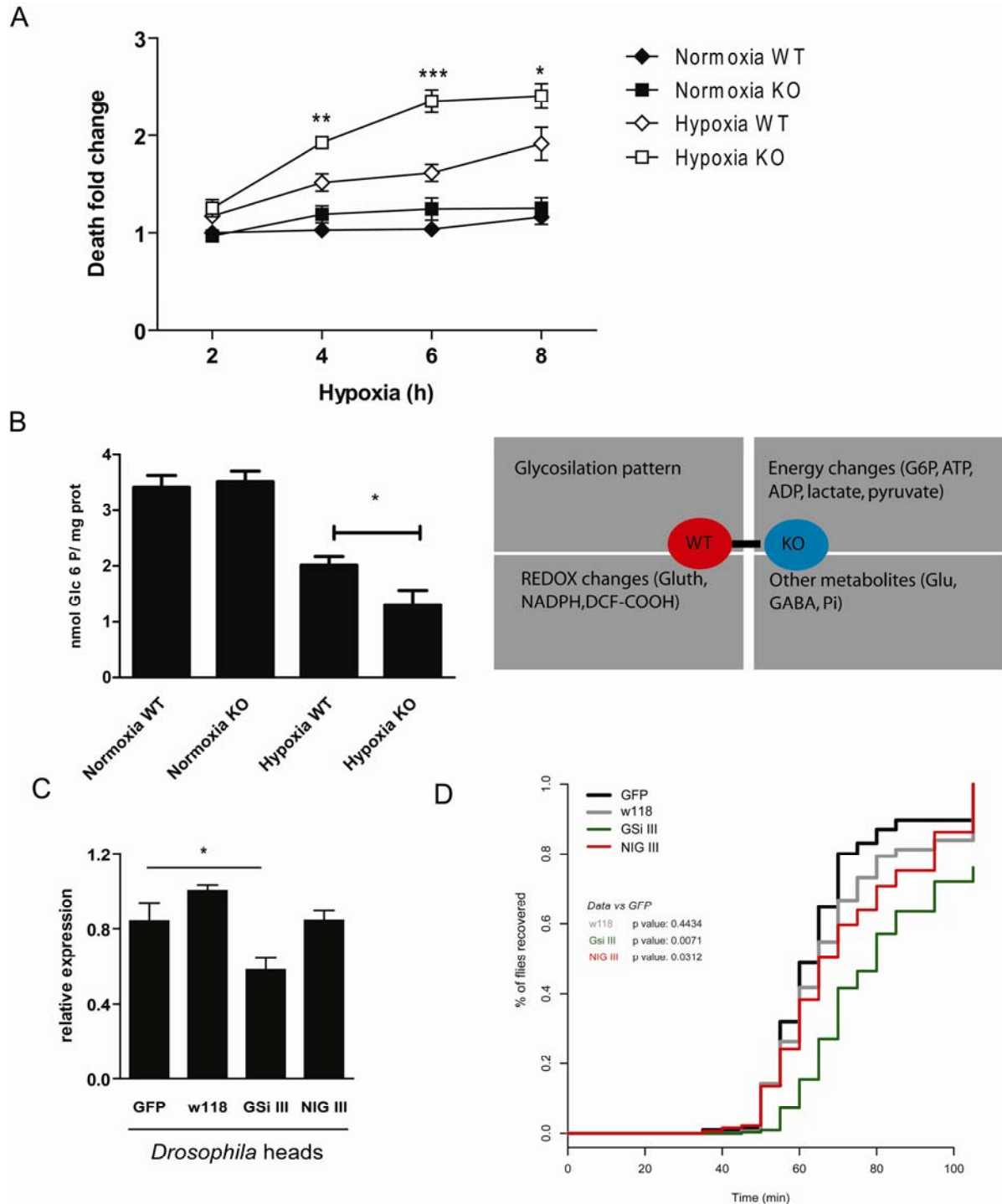
Figure 3



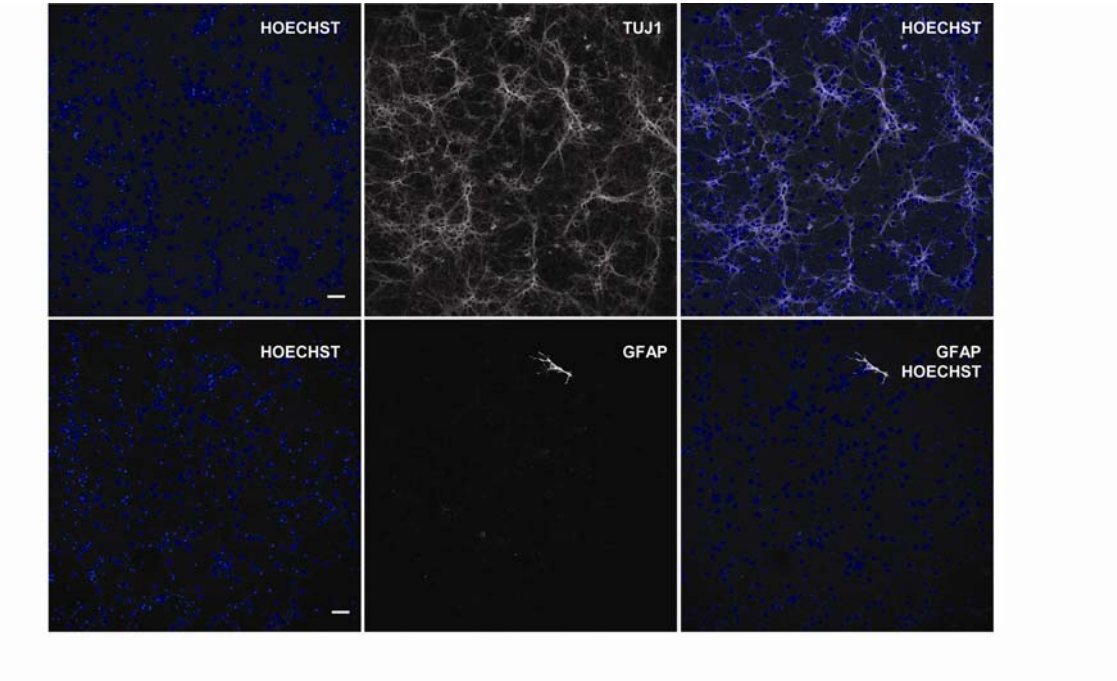
**Figure 4**



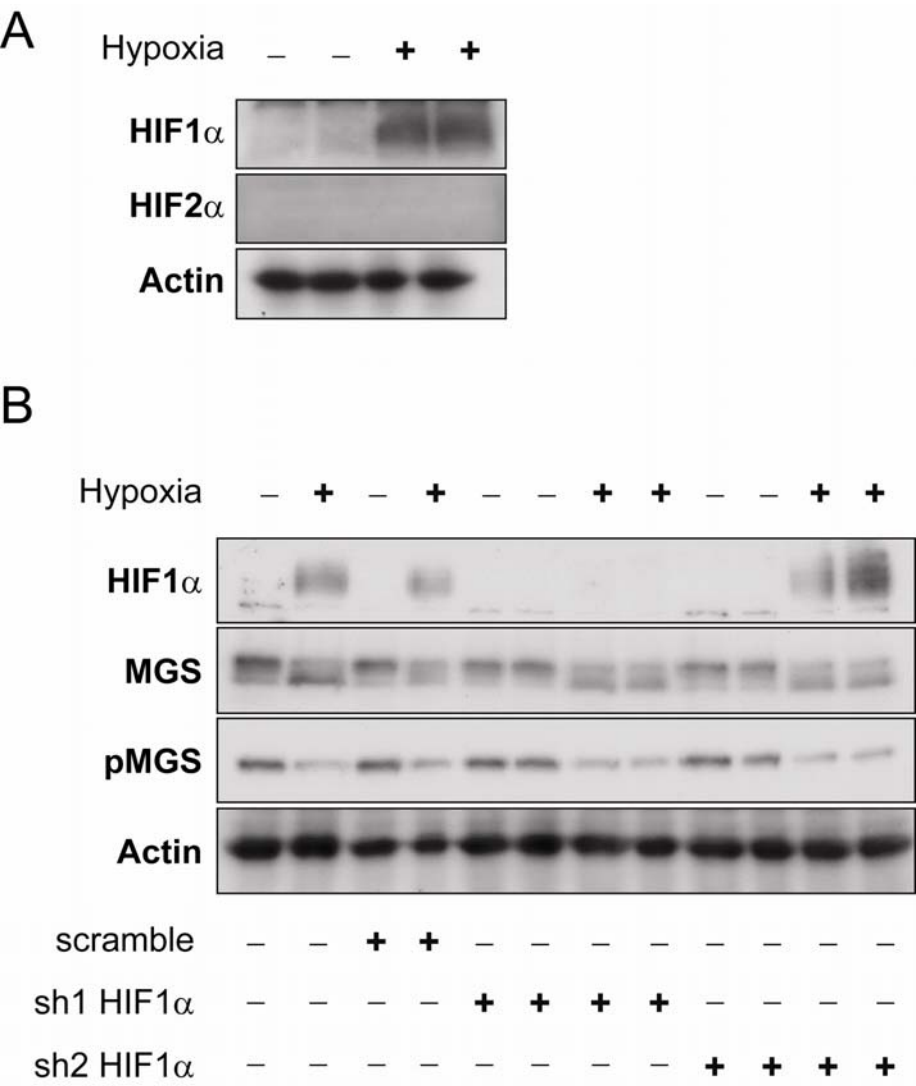
**Figure 5**



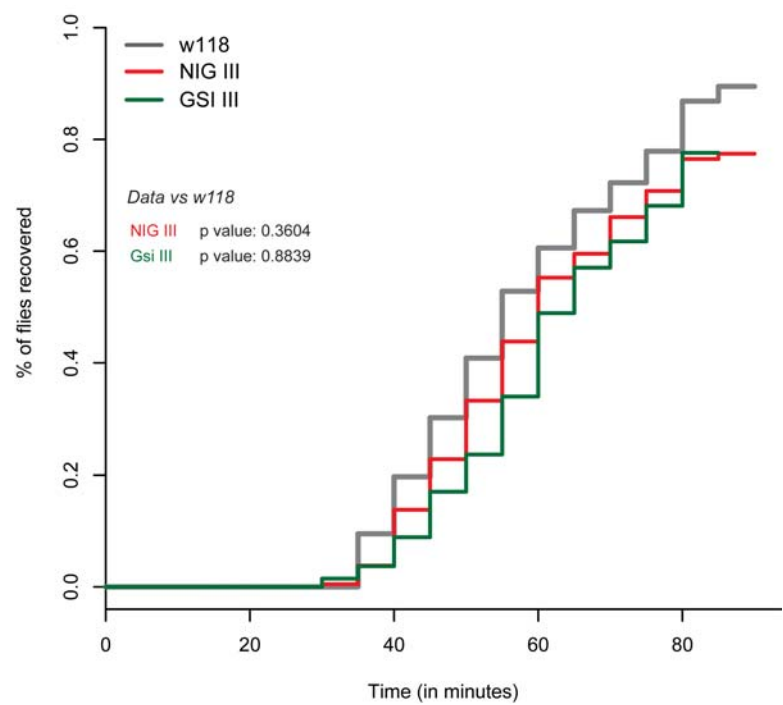
Supplementary 1



Supplementary 2



Supplementary 3





Number of pages: 16  
Total number of words in the Abstract: 142  
Total number of words: 4580  
Total number of figures: 4

## **Impairment in long-term memory formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking Glycogen Synthase in the brain**

**Jordi Duran<sup>1,2\*</sup>, Isabel Saez<sup>1,3\*</sup>, Agnès Gruart<sup>4</sup>, Joan J. Guinovart<sup>1,2,3</sup>, and José M. Delgado-García<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) Barcelona 08028, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona 08017, Spain

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain

<sup>4</sup>Division of Neurosciences, Pablo de Olavide University, Seville 41013, Spain

\*J.D. and I.S. contributed equally to this work

**Abbreviated title:** *Brain glycogen in memory and synaptic plasticity*

**Abbreviations:** AMPK, AMP Kinase; BGPh, brain Glycogen Phosphorylase; fEPSP, field excitatory postsynaptic potentials; GDE, Glycogen Debranching Enzyme; GYS1<sup>Nestin-KO</sup>, Glycogen Synthase knockout mouse; KO, knock-out; LGS, liver Glycogen Synthase; LTP, long-term potentiation; MGPh, muscle Glycogen Phosphorylase; MGS, muscle Glycogen Synthase; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; pGSK3  $\beta$ , phosphorylated (inactive)  $\beta$  Glycogen Synthase Kinase 3; GSK3  $\alpha/\beta$ , total  $\alpha/\beta$  Glycogen Synthase Kinase 3

**Correspondence should be addressed to:**

José M. Delgado-García, Division of Neurosciences, Pablo de Olavide University, Carretera Utrera, Km 1, Seville 41013, Spain. Email: [jmdelgar@upo.es](mailto:jmdelgar@upo.es)

**Abstract**

Glycogen is the only carbohydrate reserve of the brain but its overall contribution to brain functions remains unclear. Although it has traditionally been considered an emergency energetic reservoir, increasing evidence points to a role of glycogen in the normal activity of the brain. To address this long-standing question, we generated a brain-specific Glycogen Synthase knockout (GYS1<sup>Nestin-KO</sup>) mouse and studied the functional consequences of the lack of glycogen in the brain under alert behaving conditions. These animals showed a significant deficiency in the acquisition of an associative learning task and in the concomitant activity-dependent changes in hippocampal synaptic strength. Long-term potentiation (LTP) evoked in the hippocampal CA3-CA1 synapse was also decreased in behaving GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice. These results unequivocally demonstrate a key role of brain glycogen in the proper acquisition of new motor and cognitive abilities and in the underlying changes in synaptic strength.

**Key words:** brain glycogen; hippocampus; mice; operant conditioning; long-term potentiation

## Introduction

The role of glycogen in the brain has been traditionally associated with the preservation of neuronal function during energetically challenging states such as hypoxia, hypoglycemia, or seizures. Nevertheless, glycogenolysis also occurs in euglycemia during an increase in neuronal activity, indicating that brain glycogen also has a role in supporting neuronal function in non-pathological condition.<sup>1-4</sup> In this regard, glycogen concentration seems to be more conspicuous in areas of high synaptic density.<sup>5-6</sup>

It has been proposed that the importance of brain glycogen lies in the rapidity of its breakdown compared with the uptake of extracellular glucose. During resting periods, glycogen pool would be replenished for further uses.<sup>7</sup> This turnover could be crucial for learning and memory processes, where intense, energy-demanding increases in synaptic activity are required to induce the appropriate learning acquisition and storage mechanisms. Additionally, glycogen-derived pyruvate has been reported to be the preferred substrate for the *de novo* synthesis of glutamate.<sup>8-9</sup> Since glutamate-activated neurons are involved in learning consolidation,<sup>10</sup> the relevance of glycogen in memory acquisition could go beyond mere energetic supply. Accordingly, several reports have described the importance of glycogenolysis for memory processing.<sup>11,12</sup>

In order to unequivocally approach the study of the role of glycogen in the brain, here we generated a mouse model that lacks Glycogen Synthase specifically in the nervous system (GYS1<sup>Nestin-KO</sup>). We analyzed the learning capacity of these animals and checked for differences in the electrophysiological properties of the hippocampal CA3-CA1 synapse. We also characterized the levels of glycogen-related proteins in this model. Our results demonstrate the important contribution of brain glycogen to associative learning and to the concomitant changes in hippocampal synaptic strength, as well as to the experimental induction of LTP in hippocampal synapses.

## **Material and methods**

### **Generation of GYS1 conditional mice**

GYS1 knockout-first C57BL/6N cells were obtained from the International Knockout Mouse Consortium (IKMC). The cells were injected into C57BL/6J blastocysts, which were implanted in pseudo-pregnant C57BL/6J females for the generation of chimeric mice. One chimeric male positive for the disruption was mated with C57BL/6J females to test for germline transmission. Heterozygous F1 mice were crossed with mice expressing Flp Recombinase to eliminate the selection cassette and generate the conditional allele.

### **Animal studies**

Five-month-old male mice were used in these experiments. Experimental protocols were performed following European Union Council (2003/65/EU) and Spanish (BOE 252/34367-91, 2005) guidelines for the use of laboratory animals in chronic studies and in accordance with ARRIVE guidelines. All experimental protocols were also approved by the Ethics Committee of the Pablo de Olavide University.

### **Surgery**

Mice were anesthetized with 0.8-1.5% isoflurane, supplied from a calibrated Fluotec 5 (Fluotec-Ohmeda, Tewksbury, MA, USA) vaporizer, at a flow rate of 1–2 L/min oxygen (AstraZeneca, Madrid, Spain) and delivered by a mouse anesthesia mask (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Animals were implanted with bipolar stimulating electrodes in the right Schaffer collateral-commissural pathway of the dorsal hippocampus (2 mm lateral and 1.5 mm posterior to Bregma; depth from the brain surface, 1.0-1.5 mm)<sup>13</sup> and with a recording electrode in the ipsilateral CA1 area (1.2 mm lateral and 2.2 mm posterior to Bregma; depth from the brain surface, 1.0-1.5 mm).<sup>13</sup> These electrodes were made of 50- $\mu$ m, Teflon-coated tungsten wire (Advent Research Materials, Eynsham, UK). The recording electrode was implanted in the CA1 area using as a guide the field potential depth profile evoked by paired (40-ms interval) pulses presented to the ipsilateral Schaffer collateral pathway. The recording electrode was fixed at the site where a reliable monosynaptic ( $\leq 5$  ms) fEPSP was recorded. A bare silver wire was affixed to the skull as ground. Further details of these chronic preparations have been described elsewhere.<sup>14</sup>

### **Input/output curves, paired-pulse facilitation and LTP**

For input/output curves, mice were stimulated at the hippocampal CA3-CA1 synapse with paired pulses (40 ms of inter-pulse interval) of increasing intensity (0.02-0.4 mA). Each pair of pulses was repeated  $\geq 5$  times with time intervals  $\geq 30$  s. For paired-pulse facilitation we used pair of pulses of increasing intervals (10, 20, 40, 100, 200, and 500 ms) with intensity (in mA) fixed at  $\sim 40\%$  of the amount necessary to reach asymptotic values. LTP was evoked in behaving mice following procedures described previously.<sup>14</sup> Field EPSP baseline values were collected 15 min prior to LTP induction using single 100  $\mu$ s square, biphasic pulses. Pulse intensity was set at  $\sim 40\%$  of the amount required to evoke a maximum fEPSP response (0.15–0.25 mA). For LTP induction, animals were presented with a high-frequency stimulation session.

The high-frequency stimulation session consisted of five 200 Hz, 100 ms trains of pulses at a rate of 1/s repeated six times, at intervals of 1 min. Thus, a total of 600 pulses were presented during each session of high-frequency stimulation. In order to avoid evoking large population spikes and/or the appearance of electroencephalographic seizures, the stimulus intensity during the high-frequency stimulation was set at the same as that used for generating baseline recordings. After the high-frequency stimulation session, the same single stimuli were presented every 20 s for 30 min and for the followings six days.

### **Operant conditioning**

Training and testing were performed in Skinner box operant chambers. Before training, mice were handled daily for 7 days and food-deprived to 80% of their free-feeding weight. Training took place for 20 min on successive days, in which mice learnt to press a lever to receive pellets from a food tray using a fixed-ratio (1:1) schedule. Field EPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse were recorded during the training session. Stimuli were delivered at random (3 times/min), but for analysis only those presented when the animal was ready to press the lever were selected. A more complex conditioning task was carried out for 11 days using a light/dark protocol, in which only during the lighted period was there a pellet reward. In addition, lever presses carried out during the dark period restarted the dark protocol for additional time.<sup>15,16</sup>

### **Biochemical analyses**

Animals were anesthetized and sacrificed by decapitation. Brains were rapidly removed, frozen on liquid nitrogen and stored at -80° C until use. Total homogenates were analyzed for Western blotting, and the determination of GS activity and glycogen content as previously described.<sup>17</sup>

### **Data analysis**

Computed results were processed for statistical analysis using the IBM SPSS Statistics 18.0. Statistical significance of differences between groups was inferred by one-way ANOVA and ANOVA for repeated measures (data by groups), with a contrast analysis (Dunnett's post test) for a further study of significant differences. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Generation of a brain-specific GYS1 knockout

In a first experimental step, we generated a conditional GYS1 allele that can be converted to a knockout (KO) allele by the action of a Cre Recombinase, which removes several exons of the gene (Figure 1A). In order to obtain a brain-specific GYS1 KO, we bred our conditional strain with Nestin-Cre transgenic mice to generate GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice. The *nestin* promoter induces Cre recombinase expression in neuronal and glia cell precursors by embryonic day 11.<sup>18</sup> Homozygous conditional, non-Cre-expressing littermates were used as controls (Figure 1B).

Analyses of brain extracts by Western blot confirmed that GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice are devoid of muscle Glycogen Synthase (MGS; Figure 1C). To rule out the possibility of the induction of the liver isoform of Glycogen Synthase (LGS) to compensate for the absence of MGS, we analyzed LGS levels with a liver isoform-specific antibody, finding no expression. We also confirmed that our model is a brain-specific knockout, as MGS levels in the skeletal muscle were equivalent in control and GYS1<sup>Nestin-KO</sup> animals. As expected, Glycogen Synthase activity and glycogen levels were null in the brain extracts of GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice (Figure 1D, E). These results prove that MGS is the only enzyme that synthesizes glycogen in the brain.

### Analysis of the levels of proteins involved in glycogen metabolism in the GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mouse brain

To study the impact of the absence of glycogen on the proteins involved in its metabolism, we analyzed changes in their expression by Western blot (Figure 2). Glycogen Phosphorylase isoforms expressed in the brain — brain (BGPh) and muscle (MGPh) isoforms —, total  $\alpha/\beta$  and phosphorylated (inactive)  $\beta$  Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3  $\alpha/\beta$  and pGSK3  $\beta$ , respectively) were unchanged. Contrary, Glycogen Debranching Enzyme (GDE) levels were decreased and AMP Kinase (AMPK) increased in the GYS1<sup>Nestin-KO</sup> brain (Figure 2A). In the case of AMPK, the levels of the phosphorylated (active) form (pAMPK) were unchanged. Glycogenin Western blotting under normal conditions requires a previous treatment of the sample with amylase to digest the glycogen and thus free the protein so that it can be detected by the antibody.<sup>19</sup> In the case of GYS1<sup>Nestin-KO</sup> samples, however, glycogenin was detectable even without amylase treatment (Figure 2B).

### Differences in the electrophysiological properties of the CA3-CA1 synapse

To analyze the functional consequences of glycogen deficiency, we measured the response of hippocampal pyramidal CA1 neurons to paired pulses presented to the ipsilateral Schaffer collaterals in alert, behaving control and GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice (Figure 3A). For this purpose, we first recorded the responses to paired pulses of increasing intensity. Both groups presented similar increases in the slope of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) evoked by the first pulse. These increases were best fitted by sigmoid curves [ $r \geq 0.99$ ;  $P < 0.0001$ ], suggesting a normal functioning of the CA3-CA1 synapse in GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice. Nevertheless, KO mice presented a larger facilitation to the second pulse than control mice (Figure

3B). Paired-pulse facilitation was further analyzed at a wide range of inter-pulse intervals. Interestingly, GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice presented a significantly larger facilitation to paired pulses than control animals, especially at short inter-pulse intervals [ $F_{(5,10)} = 5.141$ ;  $P < 0.001$ ; Figure 3C].

We next studied the LTP capabilities of the two animal groups. LTP is widely considered to be the cellular basis of learning and memory.<sup>20</sup> After the high-frequency stimulation session, only the control group presented a significant LTP for the first recording day [ $F_{(44,264)} = 9.504$ ;  $P < 0.001$ ; Figure 3D]. GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice did not present any evident sign of LTP ( $P \geq 0.927$ ) and even they showed a non-significant ( $P \geq 0.879$ ) depotentiation phenomenon during the subsequent recording days (Figure 3D). In addition, LTP values collected from controls were significantly ( $P < 0.05$ , see asterisks in Figure 3D) larger and longer-lasting than those collected from GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice. To discard a change in the levels of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDR) which could explain these differences, we analyzed the subunit 1 of NMDR by Western Blot and found no significant ( $P > 0.05$ ) differences between the two groups. Thus, the deficit in LTP generation observed in GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice could be ascribed to the unavailability of brain glycogen.

### **Impairment in the acquisition of an instrumental conditioning task and in the associated changes in synaptic strength**

To further explore the role of brain glycogen, a highly demanding associative learning task (operant conditioning) was tested. Mice were trained in Skinner box modules to obtain a food pellet by pressing a lever located near the feeder (Figure 4A). In the first series of experiments, animals were rewarded with a food pellet every time the lever was pressed [fixed-ratio (1:1) schedule; Figure 4B, top diagram]. Control animals reached the selected criterion – to press the lever a minimum of 20 times/session for two successive 20-min sessions – earlier than GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice [ $F_{(6,72)} = 4.629$ ;  $P < 0.001$ ; Fig 3C]. The mean number of days needed (Figure 4D) and the percentage of mice reaching the selected criterion (Figure 4E) were also significantly different between groups. As already described, a proper functioning of hippocampal synaptic circuits is required for the acquisition of associative learning tasks.<sup>14,15</sup> Accordingly, the analysis of fEPSPs evoked at the hippocampal CA3-CA1 synapse during the learning process showed a significantly larger change in synaptic strength in controls when compared with values collected from GYS1<sup>Nestin-KO</sup> mice (Figure 4F).

In a second series of experiments, animals that had reached the criterion, for the fixed-ratio (1:1) schedule, within seven days were further trained in a more complex situation, in which they were rewarded only during the period in which a small light bulb was switched on (Figure 4B, bottom diagram). Pressing the lever during the dark period punished the animal with an additional delay in the reappearance of the lighted period. Again, control mice acquired this task faster than GYS1<sup>Nestin-KO</sup> animals, reaching significant [ $F_{(10,120)} = 5.438$ ;  $P < 0.01$ ] differences by the 10th and 11th training sessions (Figure 4G). In fact, GYS1<sup>Nestin-KO</sup> did not reach the selected criterion (see dotted line in Figure 4G).

## Discussion

Here we report for the first time on a mouse model lacking glycogen specifically in the brain. The use of a genetic model presents clear advantages over previous studies based on drug treatments, such as non-specificity or uncontrolled side effects. Additionally, the tissue specificity of the gene deletion, as shown by the unaltered levels of Glycogen Synthase in the skeletal muscle, has allowed us to selectively study the involvement of brain glycogen in learning and memory processes.

We first studied how the lack of glycogen regulates the proteins related to its metabolism. Only GDE and AMPK showed changes in their protein levels, thus suggesting that their regulation is directly dependent on the presence of the glycogen molecule. Interestingly, the levels of phosphorylated AMPK remained unchanged, thereby pointing to a cellular compensation mechanism to maintain AMPK activity constant. Glycogenin was detectable in *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> samples even without amylase treatment thereby further confirming the absence of glycogen. The difference in the mobility of glycogenin before and after amylase treatment may correspond to glycosyl units attached to the glycogenin protein by self-glycosylation.<sup>21</sup>

We next analyzed the functional consequences of the absence of brain glycogen. Importantly, we performed electrophysiological studies in alert, behaving animals, following procedures developed by some of us.<sup>14,15,22</sup> Our results show that paired-pulse facilitation, a well-characterized form of short-term plasticity related to short-term memory processes, is in fact enhanced in *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mice. Paired-pulse stimulation is frequently used as an indirect measurement of changes in the probability of neurotransmitter release at the presynaptic terminal.<sup>23-25</sup> It is assumed that any change in the response evoked by the 2nd stimulus in relation to the 1st is indicative of a presynaptic action, while changes evoked simultaneously by both pulses are indicative of a post-synaptic effect.<sup>26</sup> Our findings thus reflect a disturbance in the release of neurotransmitters at the presynaptic terminal in *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mice. As recently shown in alert behaving mice,<sup>27</sup> this type of short-term modulation of synaptic strength can play a homeostatic role in the proper functioning of hippocampal circuits.<sup>28</sup> In this regard, the absence of appropriated post-synaptic LTP responses, presented by *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mice, are compensated in those animals by an increase in short-term pre-synaptic plasticity, less dependent, apparently, on the immediate availability of glycogen. Indeed, previous reports indicate that glycogenolysis is not required for short-term memory processes.<sup>29</sup>

On the other hand, LTP has been proposed as the cellular mechanism underlying the acquisition of new motor and cognitive abilities.<sup>14,20,30</sup> Remarkably, *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mice did not show any significant LTP after the presentation of the high-frequency stimulation session. As LTP acquisition implies high energy consumption, these results suggest that the availability of glycogen as a rapid energy source is crucial to evoke this long-lasting change in synaptic strength. The importance of brain glycogen could rely on the rapidity of its breakdown compared with uptake and phosphorylation of glucose. Indeed, the first step of glycolysis is glucose phosphorylation by Hexokinase, which is one of the slowest enzymes of the glycolytic pathway. Brain glycogen, in contrast, is metabolized by Glycogen Phosphorylase, a fast enzyme,

generating glucose-6-phosphate. Thus, glycogen may provide supplemental fuel to support function when energy obtained from extracellular glucose is insufficient.<sup>7</sup>

Operant conditioning is a highly demanding associative learning task involving the participation of many cortical areas linked to spatial orientation, object recognition, coordinated motor responses, and cognitive processes relating ongoing behavior with its putative reward consequences. As already reported<sup>15,16</sup> and confirmed here, these analyses can be performed in mice when lever and feeder are adapted to their sizes. Results collected from the Skinner box show that the lack of brain glycogen results in a significant impairment in the learning process, as already suggested by the impairment in the experimental induction of LTP.

Overall, here we have demonstrated that the lack of Glycogen Synthase, and thus of glycogen in the brain, produces a significant deficit in learning capacity and in the concomitant activity-dependent changes in synaptic strength. These observations unequivocally demonstrate the key role of brain glycogen in the proper and timed acquisition of relatively difficult learning tasks. This is the first time that the contribution of glycogen to learning has been unambiguously proven by means of genetic tools in alert behaving conditions. These findings may have relevant implications for the treatment of selective learning- and memory-related disorders.

### **Acknowledgements**

The authors thank María Sánchez-Enciso and Natàlia Plana for their technical assistance. Thanks also go to Stephen Forrow for advice and Tanya Yates for correcting the English manuscript. This work was supported by grants from the Spanish MINECO (BFU2011-29089, BFU2011-29286 and BFU2011-30554) to AG, JMD-G and JJG, the *Junta de Andalucía* (BIO122, CVI 2487, and P07-CVI-02686) and the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 201714 (DEVANX) to AG and JMD-G, the *CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas* (ISCIII, *Ministerio de Ciencia e Innovación*), the Human Frontiers Science Program (RGP0027/2011) and the Marcelino Botín Foundation to JJG.

### **Disclosure/conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest

## References

1. Swanson RA (1992) Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S138-144.
2. Brown AM, Tekkok SB, Ransom BR (2003) Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol* 549:501-512.
3. Dienel GA, Ball KK, Cruz NF (2007) A glycogen phosphorylase inhibitor selectively enhances local rates of glucose utilization in brain during sensory stimulation of conscious rats: implications for glycogen turnover. *J Neurochem* 102:466-478.
4. Sickmann HM, Walls AB, Schousboe A, Bouman SD, Waagepetersen HS (2009) Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem* 109 Suppl 1:80-86.
5. Koizumi J, Shiraishi H (1970) Ultrastructural appearance of glycogen in the hypothalamus of the rabbit following chlorpromazine administration. *Exp Brain Res* 10:276-282.
6. Phelps CH (1972) Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res* 39:225-234.
7. Shulman RG, Hyder F, Rothman DL (2001) Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6417-6422.
8. Hertz L, O'Dowd BS, Ng KT, Gibbs ME (2003) Reciprocal changes in forebrain contents of glycogen and of glutamate/glutamine during early memory consolidation in the day-old chick. *Brain Res* 994:226-233.
9. Gibbs ME, Lloyd HG, Santa T, Hertz L (2007) Glycogen is a preferred glutamate precursor during learning in 1-day-old chick: biochemical and behavioral evidence. *J Neurosci Res* 85:3326-3333.
10. Schurr A, Miller JJ, Payne RS, Rigor BM (1999) An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J Neurosci* 19:34-39.
11. Gibbs ME, Anderson DG, Hertz L (2006) Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens. *Glia* 54:214-222.
12. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810-823.
13. Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
14. Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* 26:1077-1087.
15. Madroñal N, López-Aracil C, Rangel A, del Río JA, Delgado-García JM, Gruart A (2010) Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One* 5:e11130.
16. Jurado-Parras MT, Gruart A, Delgado-García JM (2012) Observational learning in mice can be prevented by medial prefrontal cortex stimulation and enhanced by nucleus accumbens stimulation. *Learn Mem* 19:99-106.
17. Valles-Ortega J, Duran J, Garcia-Rocha M, Bosch C, Saez I, Pujadas L, Serafin A, Canas X, Soriano E, Delgado-García JM, Gruart A, Guinovart JJ (2011) Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease. *EMBO Mol Med* 3: 1-15.
18. Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99-103.
19. Shearer J, Graham TE, Battram DS, Robinson DL, Richter EA, Wilson RJ, Bakovic M (2005) Glycogenin activity and mRNA expression in response to volitional exhaustion in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99:957-962.
20. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-1097.
21. Cao Y, Steinrauf LK, Roach PJ (1995) Mechanism of glycogenin self-glucosylation. *Arch Biochem Biophys* 319:293-298.
22. Gottlieb M, Leal-Campanario R, Campos-Esparza MR, Sánchez-Gomez MV, Alberdi E, Arranz A, Delgado-García JM, Gruart A, Matute C (2006) Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol Dis* 23:374-386.

23. Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.
24. Fernandez de Sevilla D, Cabezas C, de Prada AN, Sanchez-Jimenez A, Buno W (2002) Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 545:51-63.
25. Lauri SE, Palmer M, Segerstrale M, Vesikansa A, Taira T, Collingridge GL (2007) Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus. *Neuropharmacology* 52:1-11.
26. Thomson AM (2000) Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci* 23:305-312.
27. Madroñal N, Gruart A, Delgado-Garcia JM (2009) Differing presynaptic contributions to LTP and associative learning in behaving mice. *Front Behav Neurosci* 3:7; doi: 10.3389/neuro.08.007.2009.
28. Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107.
29. Hertz L, Gibbs ME (2009) What learning in day-old chickens can teach a neurochemist: focus on astrocyte metabolism. *J Neurochem* 109(Suppl 1):10-16.
30. Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

## Figure Legends

**Figure 1.** Generation of a brain-specific *GYS1* KO. **(A)** Schematic representation of the alleles. The excision of the selection cassette from the knockout allele generates a conditional allele that expresses GS normally. The subsequent excision of several exons from the conditional allele by a Cre Recombinase generates again a knockout allele. **(B)** Genotypes used in the study. Homozygous conditional, non-Cre-expressing littermates were used as controls of *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup>. **(C)** Western Blot of GS in total homogenates of brain and skeletal muscle using an antibody that recognizes specifically the muscle (MGS) or the liver isoform (LGS). Mouse liver extract (L) was used as a positive control for LGS. Actin was used as a loading control. **(D)** Total glycogen synthase activity in the presence of its allosteric activator Glucose 6-phosphate ( $P = 2.80 \times 10^{-7}$ ). **(E)** Glycogen levels ( $P = 0.007$ ) in brain extracts of control and *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mice. \*, statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

**Figure 2.** Changes in the expression of proteins involved in glycogen metabolism in the *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mouse brain. **(A)** MGS, brain and muscle isoforms of Glycogen Phosphorylase (BGPh and MGPh, respectively), GDE, AMPK, pAMPK, GSK3  $\alpha/\beta$  and pGSK3  $\beta$  were analyzed in total brain homogenates. **(B)** Glycogenin levels were analyzed in untreated and amylase-treated total brain extracts. Actin was used as a loading control.

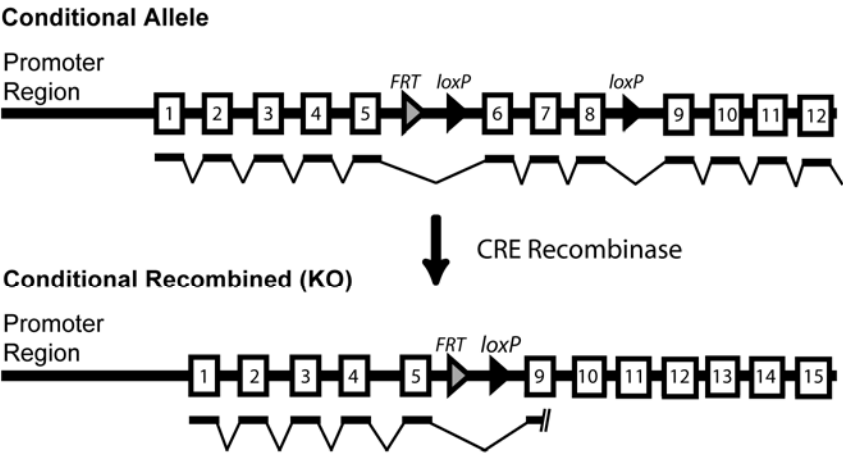
**Figure 3.** Electrophysiological changes of hippocampal synapses in *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> alert behaving mice. **(A)** Experimental design. Animals were chronically implanted with stimulating electrodes in the hippocampal Schaffer collaterals and with a recording electrode in the ipsilateral pyramidal CA1 area. An extra wire was attached to the bone as ground (DG, dentate gyrus; Sub., subiculum). **(B)** Input/output curves of fEPSPs evoked by paired pulses of increasing intensities. The best non-linear adjustments to the collected data are illustrated. **(C)** Paired-pulse facilitation analyses (mean  $\pm$  SEM slopes of the 2nd fEPSP expressed as a percentage of the 1st inter-pulse interval). Representative fEPSP paired traces (40 ms of inter-pulse interval) are shown on the right. **(D)** Time course of LTP evoked in the CA3-CA1 synapse following a high-frequency stimulation (HFS) session (mean  $\pm$  SEM fEPSP slopes given as a percentage of values collected during baseline recordings (100%)). Representative examples of fEPSPs collected at the indicated times are plotted at the top. \*, statistically significant ( $P < 0.05$ ) differences between the two groups.

**Figure 4.** Impaired performance of *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mice in an operant conditioning task. **(A)** Experimental set-up. Mice were trained in a Skinner box to press a lever to obtain a food pellet. **(B)** Two tasks of increasing difficulty were assayed. In task 1 [fixed-ratio (1:1)] mice received a food pellet each time they pressed the lever. In task 2 (Light/Dark) lever presses were rewarded only when a light bulb was switched on. Pressing the lever during the dark period punished the animal with an additional delay in the reappearance of the light period. **(C)** Lever presses in the first seven days of training of task 1. Dotted line corresponds to criterion. **(D)** Mean days required to reach the criterion. **(E)** Percentage of mice reaching the

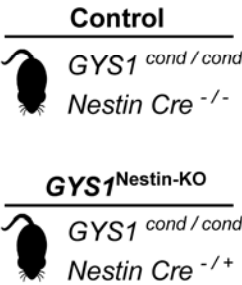
criterion during the training. **(F)** Evolution of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse during task 1 [mean  $\pm$  SEM fEPSP slopes given as a percentage of values collected before training (100%)]. **(G)** Performance of control and *GYS1*<sup>Nestin-KO</sup> mice during task 2. \*, statistically significant ( $P < 0.01$ ) differences between the two groups.

**Figure 1**

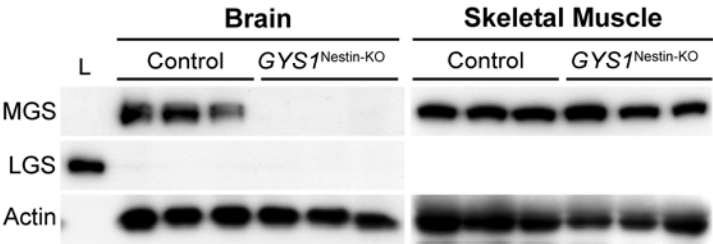
**A**



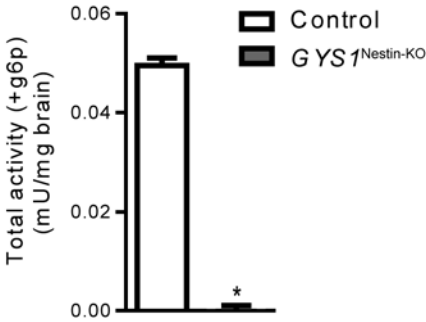
**B**



**C**



**D**



**E**

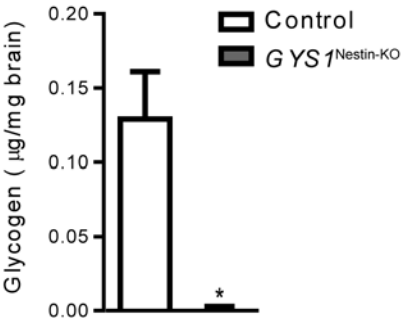
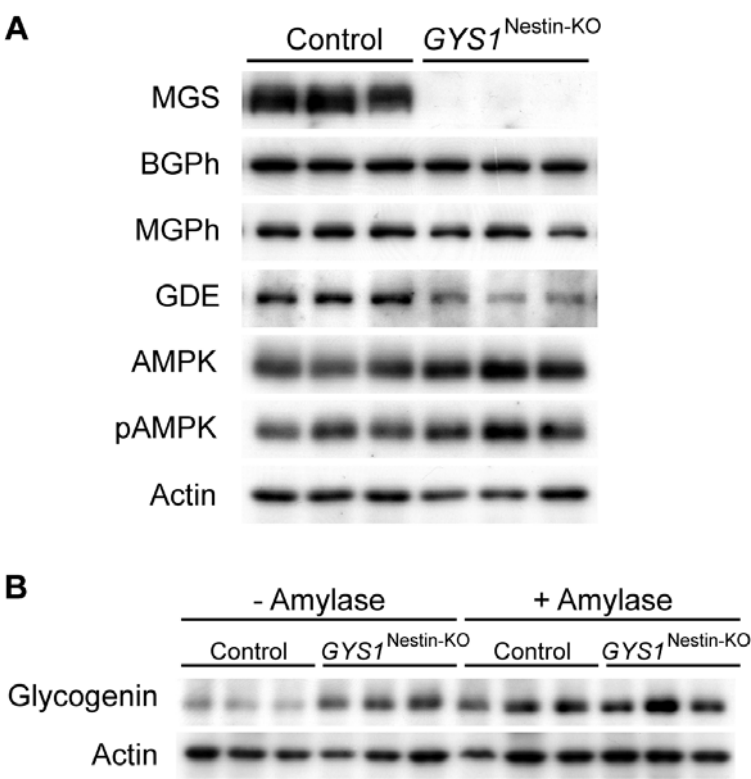
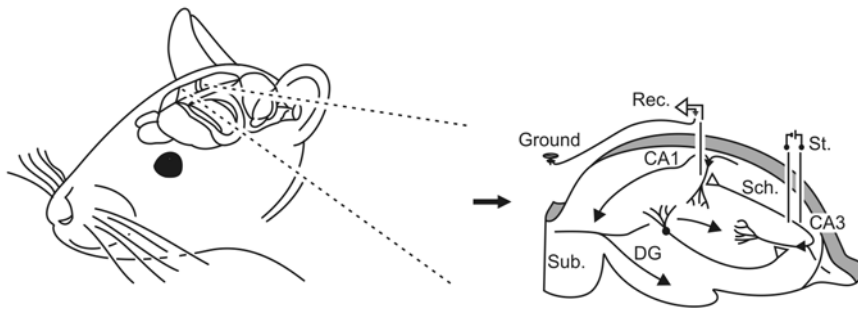


Figure 2

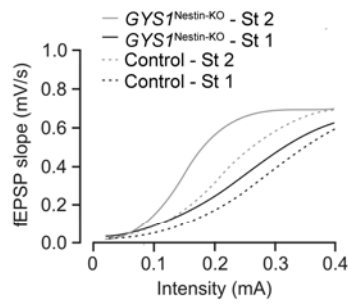


**Figure 3**

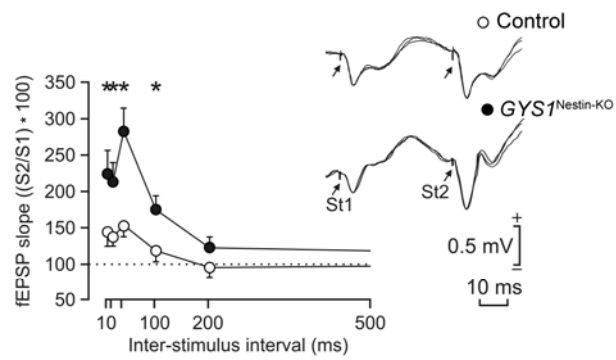
**A**



**B**



**C**



**D**

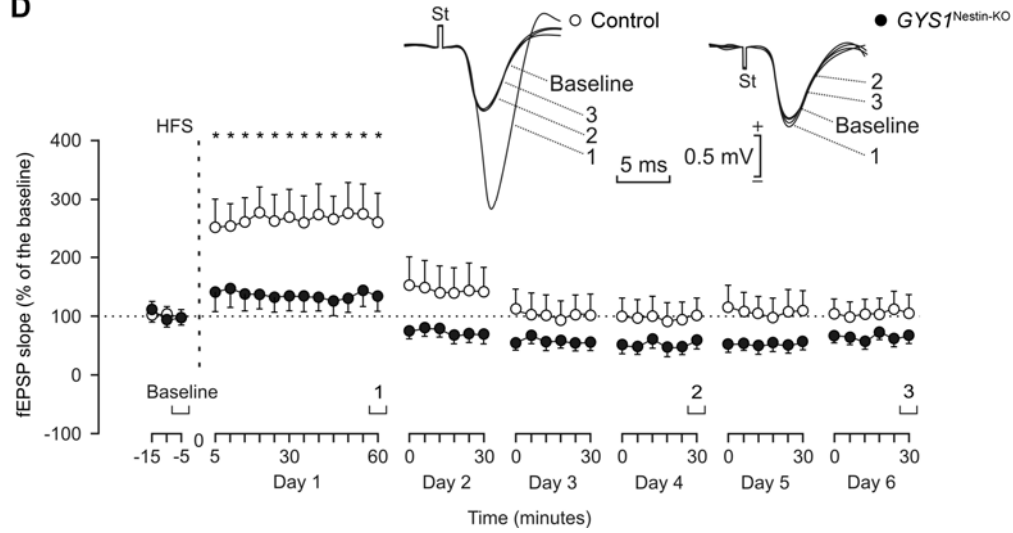
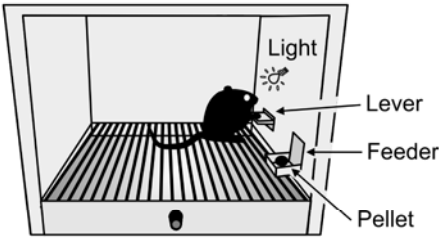


Figure 4

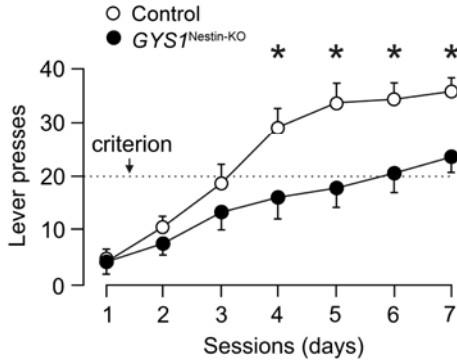
A



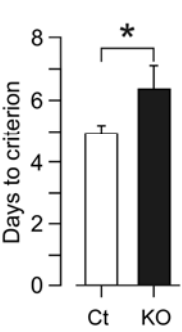
B

| Program       |                                                                                                                                                                        |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Task 1</b> |                                                                                                                                                                        |
| Ratio (1:1)   |                                                                                      |
| Time          | 20 min                                                                                                                                                                 |
| <b>Task 2</b> |                                                                                                                                                                        |
| Light/Dark    |   |
| Time          | 20 s      20 s ± 10 s                                                                                                                                                  |

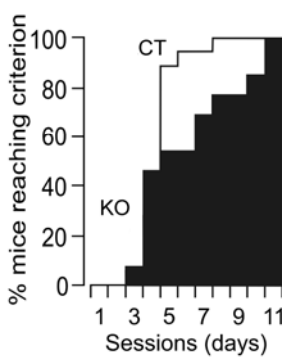
C



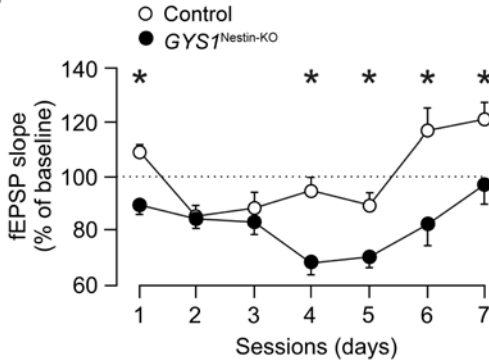
D



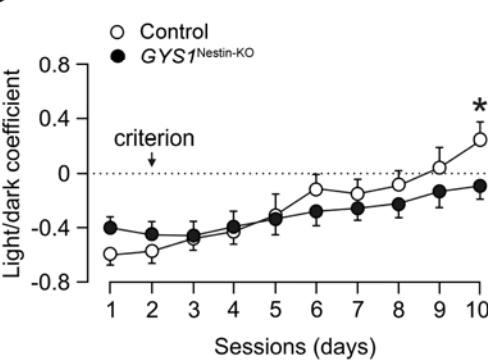
E



F



G





# Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease

Jordi Valles-Ortega<sup>1,2†</sup>, Jordi Duran<sup>1,3†</sup>, Mar Garcia-Rocha<sup>1</sup>, Carles Bosch<sup>1,4,5</sup>, Isabel Saez<sup>1,2</sup>, Lluís Pujadas<sup>1,4,5</sup>, Anna Serafin<sup>6</sup>, Xavier Cañas<sup>6</sup>, Eduardo Soriano<sup>1,4,5</sup>, José M. Delgado-García<sup>7</sup>, Agnès Gruart<sup>7</sup>, Joan J. Guinovart<sup>1,2,3\*</sup>

**Keywords:** glycogen synthase; glycogen; Lafora; malin; neurodegeneration

DOI 10.1002/emmm.201100174

Received June 20, 2011

Revised July 22, 2011

Accepted July 29, 2011

Lafora disease (LD) is caused by mutations in either the laforin or malin gene. The hallmark of the disease is the accumulation of polyglucosan inclusions called Lafora Bodies (LBs). Malin knockout (KO) mice present polyglucosan accumulations in several brain areas, as do patients of LD. These structures are abundant in the cerebellum and hippocampus. Here, we report a large increase in glycogen synthase (GS) in these mice, in which the enzyme accumulates in LBs. Our study focused on the hippocampus where, under physiological conditions, astrocytes and parvalbumin-positive (PV<sup>+</sup>) interneurons expressed GS and malin. Although LBs have been described only in neurons, we found this polyglucosan accumulation in the astrocytes of the KO mice. They also had LBs in the soma and some processes of PV<sup>+</sup> interneurons. This phenomenon was accompanied by the progressive loss of these neuronal cells and, importantly, neurophysiological alterations potentially related to impairment of hippocampal function. Our results emphasize the relevance of the laforin–malin complex in the control of glycogen metabolism and highlight altered glycogen accumulation as a key contributor to neurodegeneration in LD.

## INTRODUCTION

Glycogen is the principal storage form of glucose in animal and human cells. It is mainly produced in the liver and muscles, and glycogen levels in the brain are low compared to these two tissues. In the brain, this polysaccharide is stored in astrocytes, while most neurons do not accumulate it under normal conditions (Cataldo & Broadwell, 1986; Wender et al, 2000).

Glycogen is produced by glycogen synthase (GS), the only enzyme able to synthesize glucose polymers in mammals, and degraded by glycogen phosphorylase (GP). Mammals express two isoforms of GS encoded by *GYS1* and *GYS2*. The latter encodes the liver isoform (LGS) and its expression is restricted to the liver, while the former encodes the muscle isoform (MGS) and is widely expressed excluding the liver. MGS is regulated by phosphorylation at nine serine residues located in the amino- and carboxy-terminal domains of the enzyme. Phosphorylation by

(1) Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) Barcelona, Spain  
(2) Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain  
(3) Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain  
(4) Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain  
(5) Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain  
(6) Laboratory Animal Applied Research Platform, Barcelona Science Park, Barcelona, Spain  
(7) Division of Neurosciences, Pablo de Olavide University, Seville, Spain  
**\*Corresponding author:** Tel: +34 93 403 71 11; Fax: +34 93 403 71 14; E-mail: guinovart@irbbarcelona.org

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

several kinases, including GSK3, induces the inactivation of the enzyme, while dephosphorylation causes its activation (Skurat et al, 1994). GS is also allosterically activated by glucose-6-phosphate (G6P) in the brain (Goldberg & O'Toole, 1969) and in other tissues (Bouskila et al, 2010; Villar-Palasi & Guinovart, 1997). High levels of G6P fully activate GS even when the enzyme is phosphorylated.

In the brain, MGS is fully functional in astrocytes; neurons also express this isoform but it is kept in an inactive state under normal conditions. Both the muscle (MGP) and the brain (BGP) isoforms of GP are expressed in brain. Interestingly, astrocytes express both MGP and BGP while most neurons do not express GP (Pfeiffer-Guglielmi et al, 2003; Vilchez et al, 2007). Despite the apparent lack of glycogen metabolism in these cells, in some diseases poorly branched and insoluble glycogen, the so-called polyglucosan bodies (PGBs), accumulate in neurons [Adult Polyglucosan Body Disease (APBD, OMIM263570), Andersen Disease (GSD IV, OMIM232500) and Lafora Disease (LD; EPM2, OMIM254780)].

Lafora disease (LD) typically manifests during adolescence with generalized tonic-clonic seizures, myoclonus, absences, drop attacks or partial visual seizures. As the disease progresses, afflicted individuals suffer a rapidly progressing dementia with apraxia, aphasia, and visual loss, leading to a vegetative state and death usually in the first decade from the onset of the initial symptoms. The hallmark of LD is the presence of large inclusions of PGBs, the so-called Lafora bodies (LBs), in the somas and processes of neurons in the brain and in other tissues such as muscle and heart (Cavanagh, 1999). The mechanism by which this abnormal glycogen accumulates remains unclear. LD is inherited as an autosomal recessive disorder and has been associated with mutations in two genes: *EPM2A*, which encodes laforin, a dual-specificity protein phosphatase with a functional carbohydrate-binding domain; and *EPM2B*, which encodes malin, an E3 ubiquitin ligase. Malin ubiquitinates and promotes the degradation of laforin (Gentry et al, 2005). Individuals with mutations in *EPM2A* or *EPM2B* are neurologically and histologically indistinguishable. In spite of the long recognized aberrant accumulation of glycogen in LD, a direct link between glycogen metabolism and this neurodegenerative disease has remained elusive for decades and is still a matter of controversy.

The role of the laforin phosphatase activity in the etiopathology of LD has been widely debated. Laforin has been reported to dephosphorylate, and thus activate, glycogen synthase kinase 3 (GSK3) (Lohi et al, 2005). GSK3 activation inhibits glycogen synthesis by GS phosphorylation. Laforin has also been described to release the phosphate incorporated into glycogen by GS during its synthesis (Tagliabracci et al, 2008, 2011, 2007). So mutations in laforin would cause the overactivation of glycogen synthesis and increased phosphate content, which would alter glycogen structure, making it more prone to LB formation. Nevertheless, these hypotheses based only on the phosphatase activity of laforin fail to explain how malin deficiency causes LD.

We previously demonstrated that the laforin-malin complex blocks glycogen accumulation in cultured neurons by inducing the proteasome-dependent degradation of MGS and protein

targeting to glycogen (PTG), a protein phosphatase-1 regulatory subunit responsible for the activation of MGS by dephosphorylation (Vilchez et al, 2007). In addition, PTG overexpression in cultured neurons induces the accumulation of poorly branched glycogen and cell death. Thus, we proposed that altered glycogen metabolism caused by either laforin or malin deficiency underlies LB formation and neurodegeneration in LD. Laforin disruption in mice is described to cause neurodegeneration, myoclonus epilepsy and impaired behavioural response together with LB formation (Ganesh et al, 2002) and increased levels of MGS protein are found in the brain of this model (Tagliabracci et al, 2008).

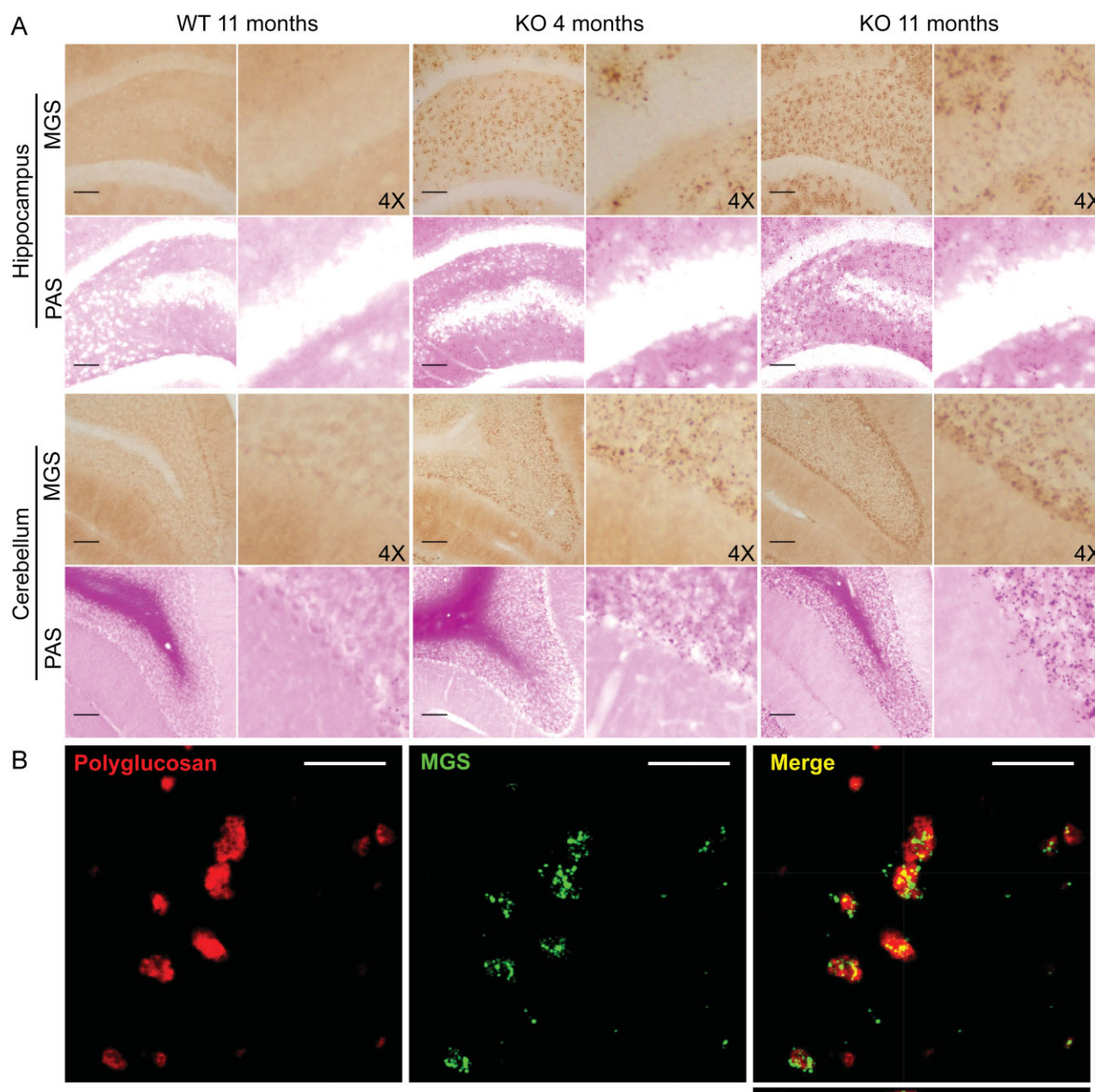
Reports on 3-month-old (DePaoli-Roach et al, 2010) and 6-month-old (Turnbull et al, 2010) mouse models of malin deficiency have recently been published. Neither describes neurological alterations. Here, we have extended the study of malin-deficient mice to 11 months. At this age, they presented neurodegeneration, increased synaptic excitability, and propensity to suffer myoclonic seizures together with increased levels of MGS in the brain. Our study analyses the hippocampal cell type-specific progression of LB appearance and it is the first to report the early presence of LBs in astroglial cells. We describe the expression of MGS and malin in a particular subset of interneurons (PV<sup>+</sup> cells), the later appearance of LB in these cells, and their degeneration and progressive loss. In addition, we report on the hippocampal functional impairment of the malin KO animals.

## RESULTS

### Malin KO mice accumulate poorly branched glycogen in LBs

We bred malin KO mice up to about 1 year of age. These animals accumulated LBs, the hallmark of LD. LBs were present in several areas of the brain, being most abundant in the hippocampus and cerebellum (Fig 1A). No comparable structures in corresponding regions of control littermate animals were found. LB accumulation was not exclusive to the brain, as they were also detected in some fibres of skeletal muscle and heart (Supporting Information Fig 1). The inclusions increased in number and size with age, as can be seen by comparing 4- and 11-month-old mice (Figs 1A and 7B). Moreover, in the older mice, LBs were detected in regions of the brain that were unaffected at 4 months (Fig 1A). This result is consistent with the accumulative nature of LD.

LBs are insoluble inclusions characterized by poorly branched glycogen-like polymers (Chan et al, 2005; Delgado-Escueta, 2007; Ganesh et al, 2006). We measured glycogen content in whole brain homogenates of 11-month-old malin KO animals, where the presence of LBs was most prominent. These brains showed a 2.5-fold increase in glycogen content (Fig 2A). In addition, low speed centrifugation was performed to analyse the distribution of this polysaccharide between the soluble and insoluble fractions. The increment in glycogen detected corresponded to that present in the insoluble fraction while no significant changes were found in the soluble fraction.



**Figure 1. Histological localization of LBs in malin KO mouse brains.** LBs are MGS-positive.

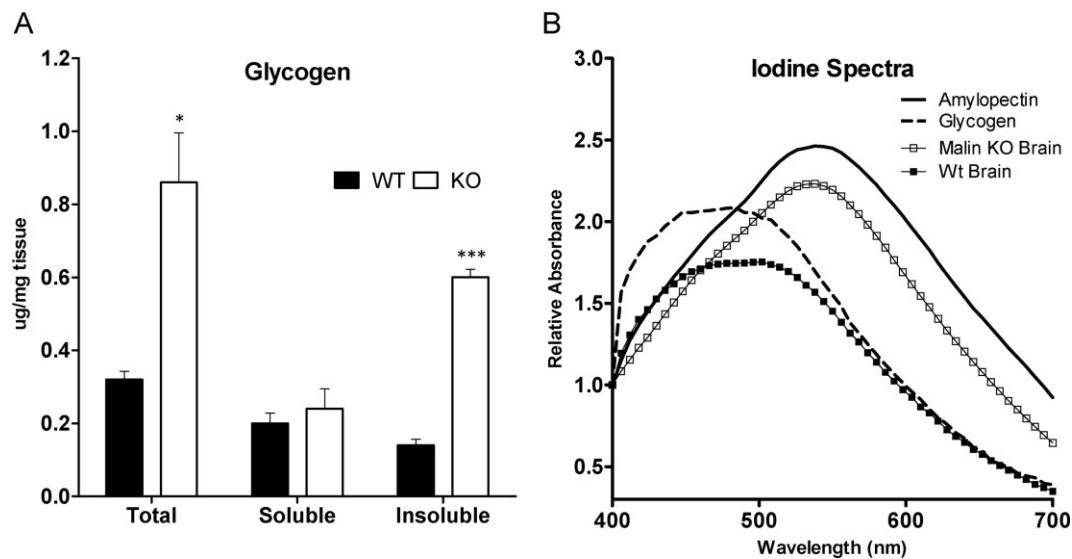
**A.** Periodic acid-Schiff staining (PAS) and immunostaining with an antibody against muscle glycogen synthase (MGS) are shown for the hippocampus and cerebellum of 4- and 11-month-old malin KO and 11-month-old WT littermate controls. Scale bar = 100 μm, 4X = 4-fold magnification.

**B.** Representative orthogonal confocal sections of LBs showing co-localization (yellow) of polyglucosan (red) and MGS (green) in malin KO brains. Scale bar = 10 μm.

The degree of glycogen branching in KO brains was measured by recording the visible absorption spectrum of purified glycogen in the presence of iodine. The lower the branching of the glucose polymer, the greater the displacement of its absorption maximum to longer wavelengths (Krisman, 1962). Glycogen isolated from a pool of KO brains was clearly less branched (peak at 537 nm) than that from control brains (peak at 492 nm) (Fig 2B).

#### Malin KO mice accumulate MGS in LBs

Malin has been reported to be involved in the proteasomal clearance of laforin (Gentry et al, 2005) and MGS (Vilchez et al, 2007). Therefore, we analysed the MGS content and distribution in brain sections from WT and malin KO mice. For this purpose, we used 4- and 11-month-old animals to evaluate the progression with age. The polyglucosan inclusions were immunostained for MGS (Fig 1B), thereby indicating that LBs



**Figure 2. Analysis of glycogen in malin KO mouse brains.** Glycogen is increased and accumulated in the pellet. Brain extracts from 11-month-old wild-type (WT) and malin knock-out (KO) mice were analysed. Total homogenates and the soluble and insoluble fractions resulting from low speed centrifugation were used for the biochemical analysis.

**A.** Glycogen content. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.001$ . WT ( $n = 6$ ), KO ( $n = 6$ ).

**B.** Iodine spectra of glycogen purified from total brain homogenates. Amylopectin from corn and glycogen from mouse liver are shown for reference.

contain the GS protein and its catalytic product (Fig 1). Western blot analysis showed highly increased MGS in total homogenate from malin KO brains compared to controls. The levels of this protein were increased in the insoluble fraction, thus strengthening the results obtained from histochemistry. As polyglucosan inclusions apparently increased in number and size with age, we also analysed the levels of other glycogen-binding proteins as laforin, glycogenin—the priming enzyme for glycogen synthesis—and GP. The levels of laforin (Fig 3A), glycogen phosphorylase muscle (MGP) and brain (BGP) isoforms, and glycogenin (Supporting Information Fig 3) were also found to be increased and accumulated in the insoluble fraction. Interestingly, MGP levels were also increased in the soluble fraction where MGS, laforin, and BGP levels remained unchanged.

Analysis of the GS phosphorylation state using specific antibodies for the N-terminal and C-terminal phosphorylation sites showed that, while the enzyme in the soluble fraction did not show changes between KO and WT mice, the enzyme present in the insoluble fraction was less phosphorylated in KO mice compared to WT in Serine residues 7 and 10 (Fig 3A and B) and 640 (Fig 3A and C), corresponding to a more active form of GS.

We also measured GS enzymatic activity in total homogenates and in the soluble and insoluble fractions. GS activity in the presence of G6P (Fig 3D) is usually taken as a measure of total GS. Surprisingly, despite the large increase in GS protein levels seen by Western blot analysis, no significant differences in total GS activity were found by activity measurements. This result indicated that MGS protein accumulated in LBs does not show activity even in presence of its allosteric activator (G6P) in the conditions assayed. The  $\pm$  G6P activity ratio, an indicator of

the activation state of the enzyme, was also unchanged in all fractions (Fig 3E).

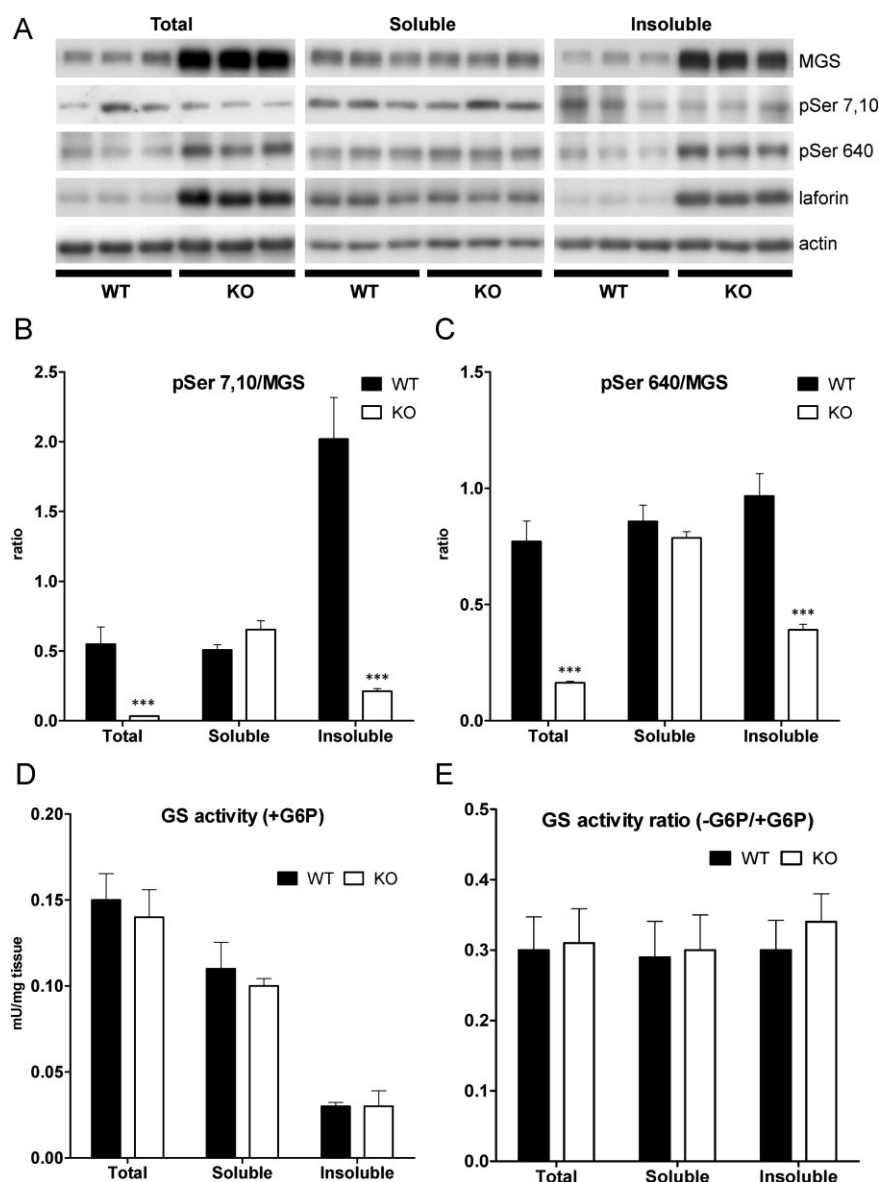
#### Cell-type specific progression of LB appearance

The histological study of mouse brains with antibodies against MGS showed that, in addition to astrocytes, PV<sup>+</sup> interneurons of the hippocampus also express MGS (Fig 4A). These cells can be found in the DG, CA1-2 and CA3 (not shown).

In the KO mice, the only exon of *EPM2B* is substituted by a selection cassette containing the  $\beta$ gal gene (Supporting Information Fig 2). Consequently, malin heterozygous mice express  $\beta$ gal under the control of the endogenous promoter of *EPM2B*. To overcome the lack of an antibody recognizing the endogenous malin protein, we used  $\beta$ gal as a reporter of malin expression in these animals.  $\beta$ gal immunodetection showed that, among other cells, some astrocytes and all PV<sup>+</sup> interneurons express malin in the hippocampus, one of the most affected regions of the malin KO brain (Fig 4B).

While 4-month-old KO brains showed mainly astrocyte-associated LB accumulation (Figs 5 and 6A), 11-month-old counterparts showed LBs in astrocytes (Figs 5 and 6A) and in the cell bodies of neurons (Fig 5). Neuronal LBs were very conspicuous in the neuronal somata of hippocampal PV<sup>+</sup> interneurons and were occasionally found in their dendritic processes (Fig 6B).

To substantiate the above findings, we performed an electron microscopy study on hippocampal tissue from 11-month-old KO mice. Astrocytes often displayed LBs in their cytoplasm (Fig 6C c1 and c2), in agreement with the light microscopy observations (Fig 6A). We focused our attention on the dendritic



**Figure 3. Analysis of MGS in malin KO mouse brains.** MGS protein is increased and accumulated in the insoluble fraction. Brain extracts from 11-month-old wild-type (WT) and malin knock-out (KO) mice were analysed. Total homogenates and the soluble and insoluble fractions resulting from low speed centrifugation were used for the biochemical analysis.

**A.** Western blotting for MGS, GS phosphoserine 7 and 10 (pSer 7,10), GS phosphoserine 640 (pSer 640) and laforin. Actin was used as loading control.

**B,C.** GS phosphorylation state. Densitometries from Western blot analysis are expressed as ratio of the signals from the enzyme phosphorylated at specific sites to total protein.

**D.** Glycogen synthase (GS) activity measured in the presence of G6P.

**E.** GS activity ratio (-G6P/+G6P). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

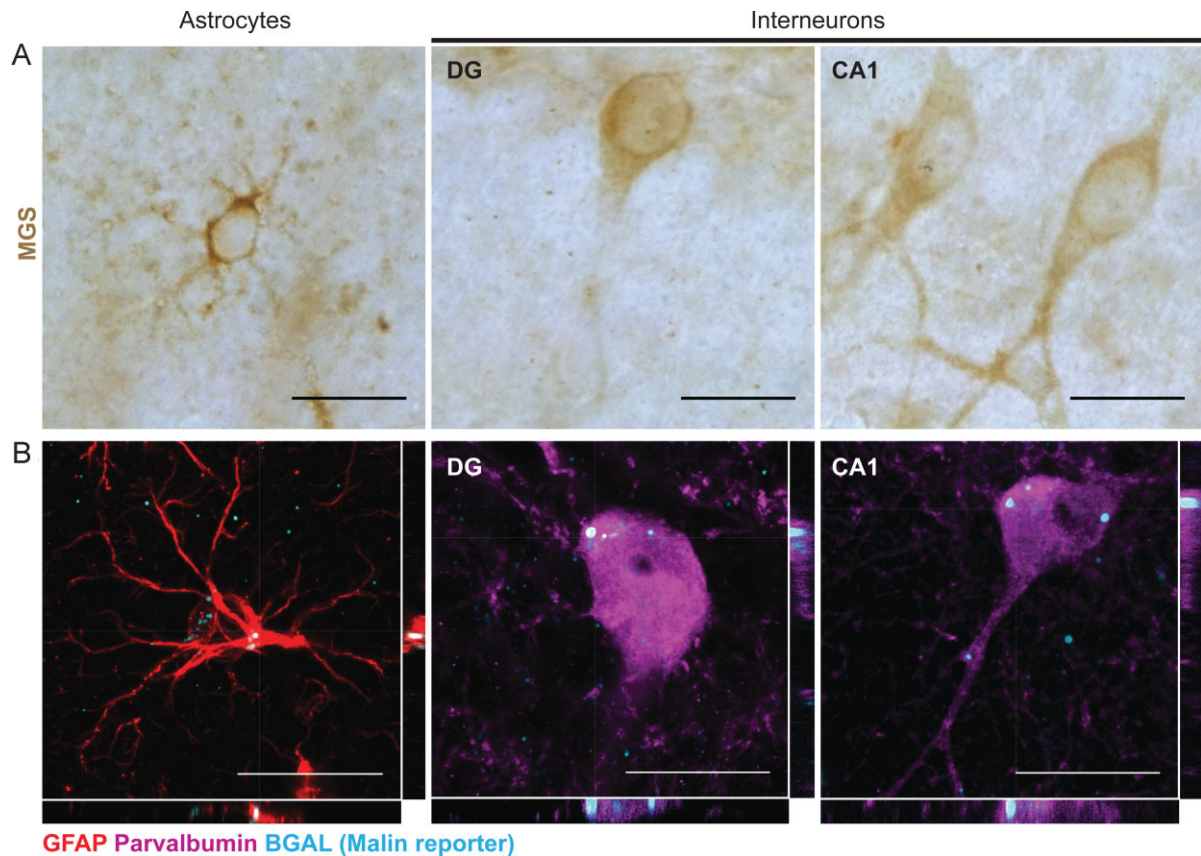
\*\*\* $p < 0.001$ . WT ( $n = 6$ ), KO ( $n = 6$ ).

profiles of the CA1 and DG. Dendrites were identified by the large number of microtubules organized in bundles and by the presence of synaptic contacts on their surface (Fig 6C a2) or on dendritic spines arising from them (Fig 6C b2). We found dendrites filled by large LBs, which distorted their size and fine structure (Fig 6C a1, a2, b1 and b2). In some cases, glycogen granules were identifiable at the periphery of these LBs. In addition, we frequently observed dark, electron-dense cells displaying the typical fine structural features of microglial cells, which engulfed large numbers of LBs (Fig 6C d). We thus concluded that LBs accumulate in glial cells and in neurons.

#### Degeneration of PV<sup>+</sup> interneurons in the malin KO hippocampus

To study the effect of LB accumulation on PV<sup>+</sup> interneurons, we counted the number of these neurons in the hippocampus at 4

and 11 months of age. We found a marked reduction in the number of PV<sup>+</sup> neurons in the hippocampus of 11-month-old KO mice; a decrease that was not detected at 4 months of age (Fig 7A). Decreased immunolabelling of PV<sup>+</sup> dendrites was also observed, which may suggest an impairment of dendritic arbors (Fig 7B). Since the induction of polyglucosan accumulation causes neuronal death by apoptosis in primary cultures (Vilchez et al, 2007), we analysed whether the net neuronal loss caused by malin deficiency correlated with increased rates of apoptosis. Although no clear neuronal apoptotic features were found by TUNEL, Caspase-3 activation or FluoroJadeB staining (not shown), 11-month-old KO hippocampi showed a clear increase in GFAP<sup>+</sup> cells (Supporting Information Fig 4). This gliosis has been reported to be associated to neuronal loss in other model of LD (Turnbull et al, 2011) and it is in concordance with the observed loss of PV<sup>+</sup> interneurons in malin KO hippocampi.



**Figure 4. Hippocampal interneurons and astrocytes express MGS and malin.** Hippocampal astrocytes and interneurons from dentate gyrus (DG) and CA1 regions of WT (A) and malin heterozygous (B) hippocampi of same-aged mice are shown.

A. Immunostaining with an antibody against MGS (brown).

B. Representative orthogonal confocal sections showing immunostaining with antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) (red), parvalbumin (PV) (magenta) and βgal (cyan). Scale bar = 20 μm.

#### Behavioural alterations in malin KO mice

Malin KO mice developed normally and were fertile. They displayed normal gait and showed no significant differences to WT mice in the Rotarod test or in the Beam walking test. They did not present any sign of cerebellar ataxia (data not shown). Exploratory behaviour of the KO mice was evaluated in an Open Field Test (Supporting Information Fig 5). At 11 months of age, these animals were hyperactive and showed an increase in exploratory behaviour. Significant differences were found in the time spent in the centre of the arena, the distance run and the number of rearings. These results indicate that KO mice have reduced anxiety.

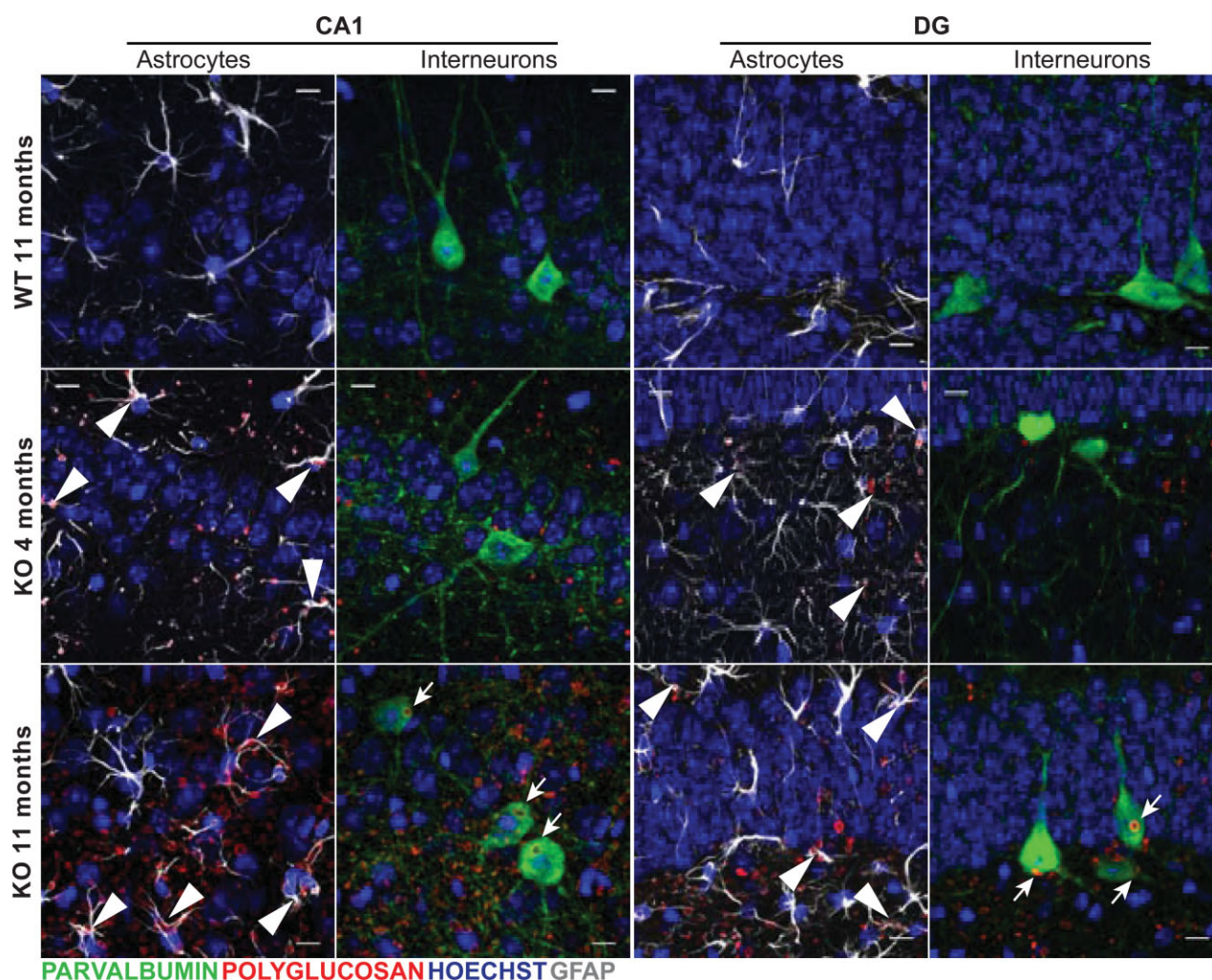
Operant conditioning is an excellent learning test to determine associative learning capabilities of alert behaving mice, as well as other cognitive and motor abilities (Madronal et al, 2010). Collected results indicate that both WT and KO mice acquired a fixed-ratio (1:1) schedule (i.e. to press the lever one time to obtain a food pellet as reward) in the same number of sessions (WT,  $5.2 \pm 0.3$  days; KO,  $4.7 \pm 0.2$  days,  $p = 0.282$ , Student's *t*-test). From the 6th–10th sessions, both groups of animals obtained a similar number of pellets

per session (WT,  $23.2 \pm 2.1$ ; KO,  $22.1 \pm 2.6$ ,  $p = 0.152$ , Student's *t*-test; not illustrated). In accordance, learning capabilities of KO mice were similar to that presented by their littermate controls.

#### Functional properties of hippocampal CA3-CA1 synapses in alert behaving WT and KO mice

Available *in vivo* recording techniques allow the study of hippocampal synapses in awake mice (Gruart et al, 2006; Madronal et al, 2009). Both WT and transgenic KO mice presented increases in the slope of fEPSP evoked at the CA1 area following the presentation of paired pulses (40 ms of inter-pulse interval) of increasing intensity at the ipsilateral Schaffer collaterals (Fig 8A). Nevertheless, KO mice presented significantly larger fEPSP amplitudes than WT animals at high stimulus intensities ( $>0.2$  mA), suggesting an enhanced synaptic excitability.

We also looked for facilitation at the CA3-CA1 synapse. It is known that the synaptic facilitation evoked by the presentation of a pair of pulses is a typical presynaptic short-term plastic property of the hippocampal CA3-CA1 synapse, which has



**Figure 5. Age-associated progression of LB formation in the malin KO hippocampus.** Confocal images are shown for DG and CA1 hippocampal regions of 4- and 11-month-old malin KO mice and 11-month-old WT littermate controls. Antibodies were used against parvalbumin (green), polyglucosan (red) and GFAP (white). Hoechst (blue) was used for nuclear staining. 4-month-old malin KO mice show mainly astrocyte-associated polyglucosan accumulation (arrowheads). 11-month-old malin KO animals show both astrocyte-associated (arrowheads) and interneuronal intracellular (arrows) accumulation. Control mice do not show comparable polyglucosan accumulation. Scale bar = 10  $\mu$ m.

been related to the process of neurotransmitter release (Zucker & Regehr, 2002). But, as illustrated in Fig 8B, no significant differences between the two groups were observed at any of the selected intervals. In accordance, it can be suggested that short-term plastic processes are not affected in malin KO animals.

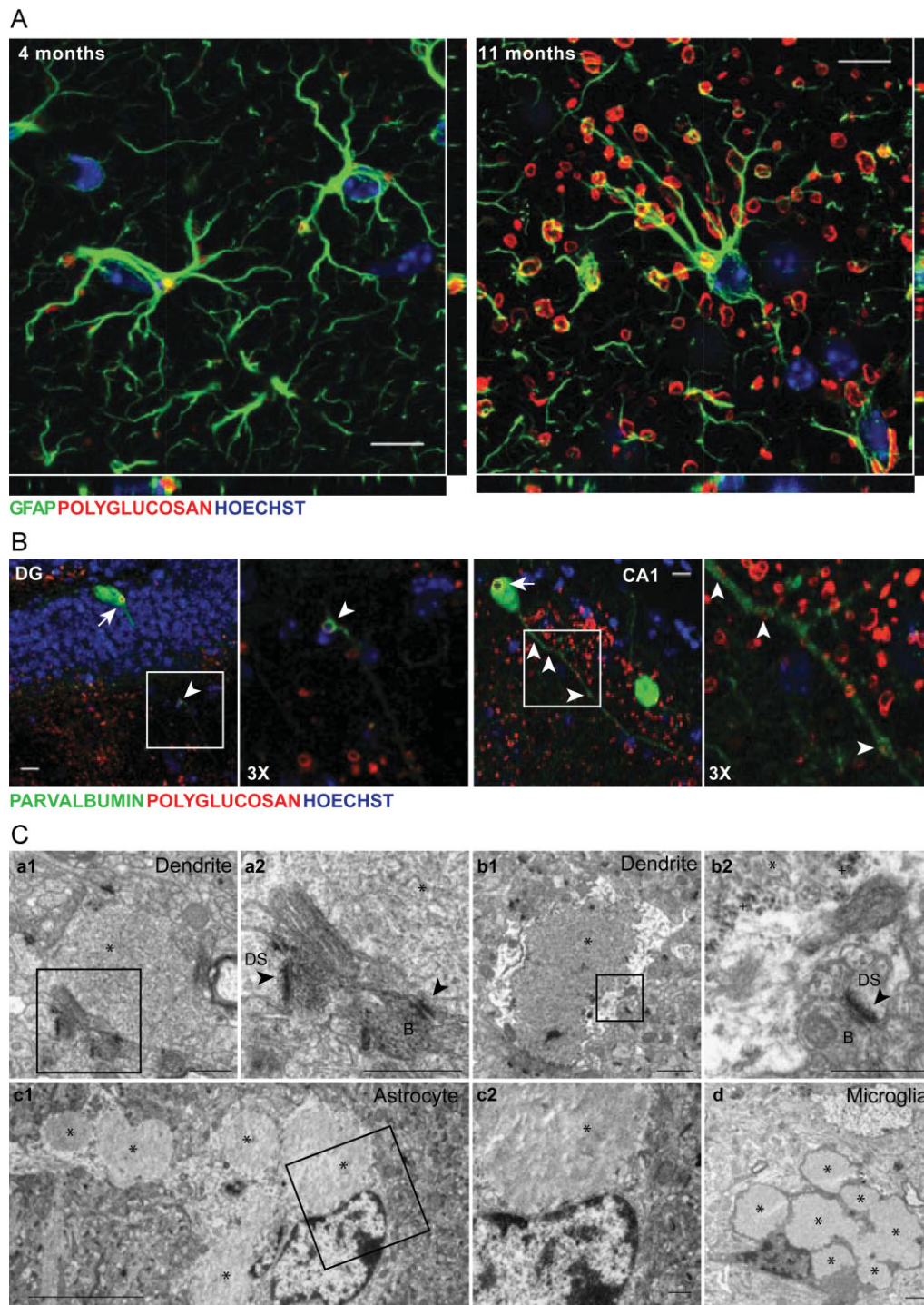
#### Comparison of long-term potentiation evoked in alert behaving WT and malin KO mice

For the long-term potentiation (LTP) study, and in order to obtain a baseline, WT and KO mice were stimulated every 20 s for  $\geq 15$  min at Schaffer collaterals (Fig 8C). When a stable baseline was obtained, mice were presented with the HFS protocol (see Materials and Methods section). After HFS, the same single stimulus used to generate the baseline records was

presented at the initial rate (3/min) for another 60 min. Recording sessions were repeated up to 5 days later for 30 min each. Both groups presented a significant LTP, but with some differences between them. Indeed, the LTP response presented by KO mice was significantly larger than that presented by controls for more than 24 h. Thus, it can be proposed that KO mice present larger and longer-lasting LTPs than their respective littermate controls, a fact that could be ascribed to their enhanced synaptic excitability, but that is not translated into an increased ability for associative learning tasks.

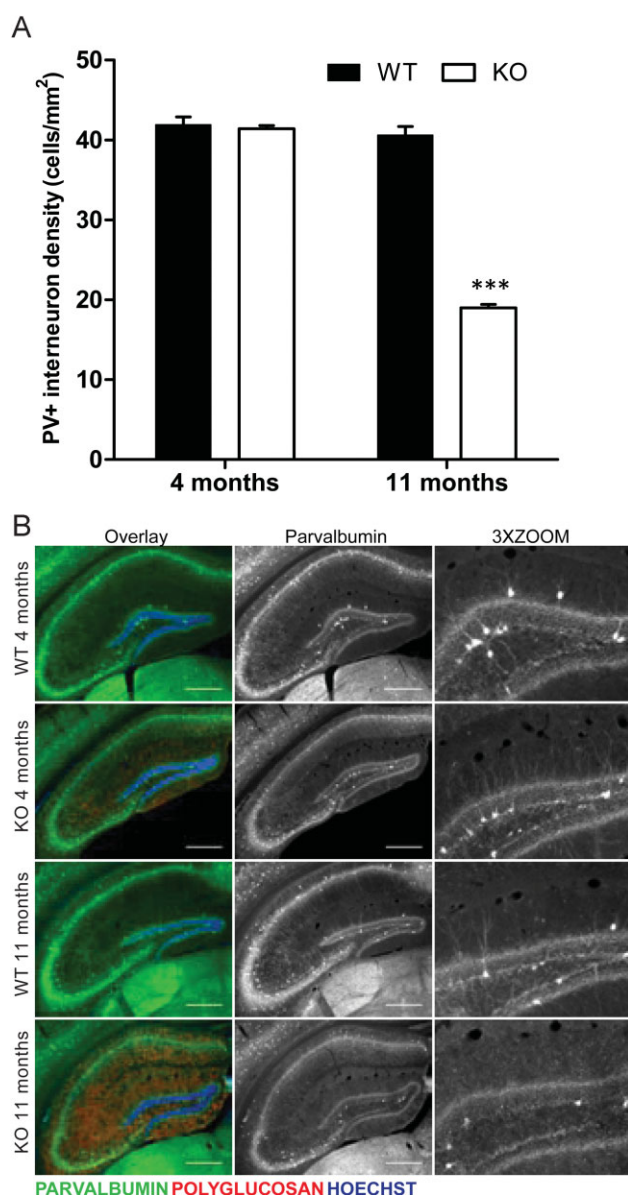
#### Effects of kainic acid injection in malin KO mice

The C57BL6 strains are seizure-resistant in comparison to other mouse genetic backgrounds (McLin & Steward, 2006) and as



**Figure 6. Localization of LBs in hippocampal astroglia, microglia and neurons.** Representative images from 4-month-old (A) and 11-month-old (A–C) malin KO hippocampus.

- A.** Orthogonal confocal sections are shown for astrocytes containing polyglucosan accumulation in the hippocampus of 4- and 11-month-old KO mice. Antibodies were used against GFAP (green) and polyglucosan (red). Hoechst (blue) was used for nuclear staining. Scale bar = 10  $\mu$ m.
- B.** Confocal images are shown for DG and CA1 hippocampal regions. Antibodies were used against parvalbumin (green) and polyglucosan (red). Hoechst (blue) was used for nuclear staining. Polyglucosan accumulation can be observed within the somas (white arrows) and some processes (white arrowheads) of PV<sup>+</sup> interneurons. Scale bar = 10  $\mu$ m. 3X = 3-fold magnification.
- C.** Electron microscopy images are shown for CA1. Micrographs depict the presence of LBs and glycogen granules in dendrites (a1, a2, b1, b2). LBs were also found in astrocytes (c1, c2). Microglial cells with some engulfed LBs were observed (d). \*, Lafora Body; +, glycogen granule; black arrowhead: postsynaptic density; B: synaptic bouton; DS: dendritic spine. a2, b2 and c2 are magnifications of the boxes in a1, b1 and c1. Scale bars are 5  $\mu$ m in c1 and 0.5  $\mu$ m in a1, a2, b1, b2, c2 and d.



**Figure 7. Malin KO mice show degeneration of PV<sup>+</sup> interneurons in the hippocampus.** Immunofluorescence analyses are shown for hippocampus of 4- and 11-month-old malin KO mice and WT littermate controls. Antibodies were used against parvalbumin (green) and polyglucosan (red). Hoechst (blue) was used for nuclear staining.

**A.** Density of hippocampal PV<sup>+</sup> somas. 11-month-old malin KO mice show a 50% loss of PV<sup>+</sup> interneurons while no difference is observed in 4-month-old malin KO animals when compared with controls. Scale bar = 400  $\mu$ m. 3X ZOOM = 3-fold magnification. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$ .

**B.** Representative images of hippocampus sections are shown as overlay of the three channels (Overlay) and the split of parvalbumin channel in greyscale (Parvalbumin). A clear decrease in the processes branching from PV<sup>+</sup> interneurons can be observed in the 11-month-old malin KO hippocampus.

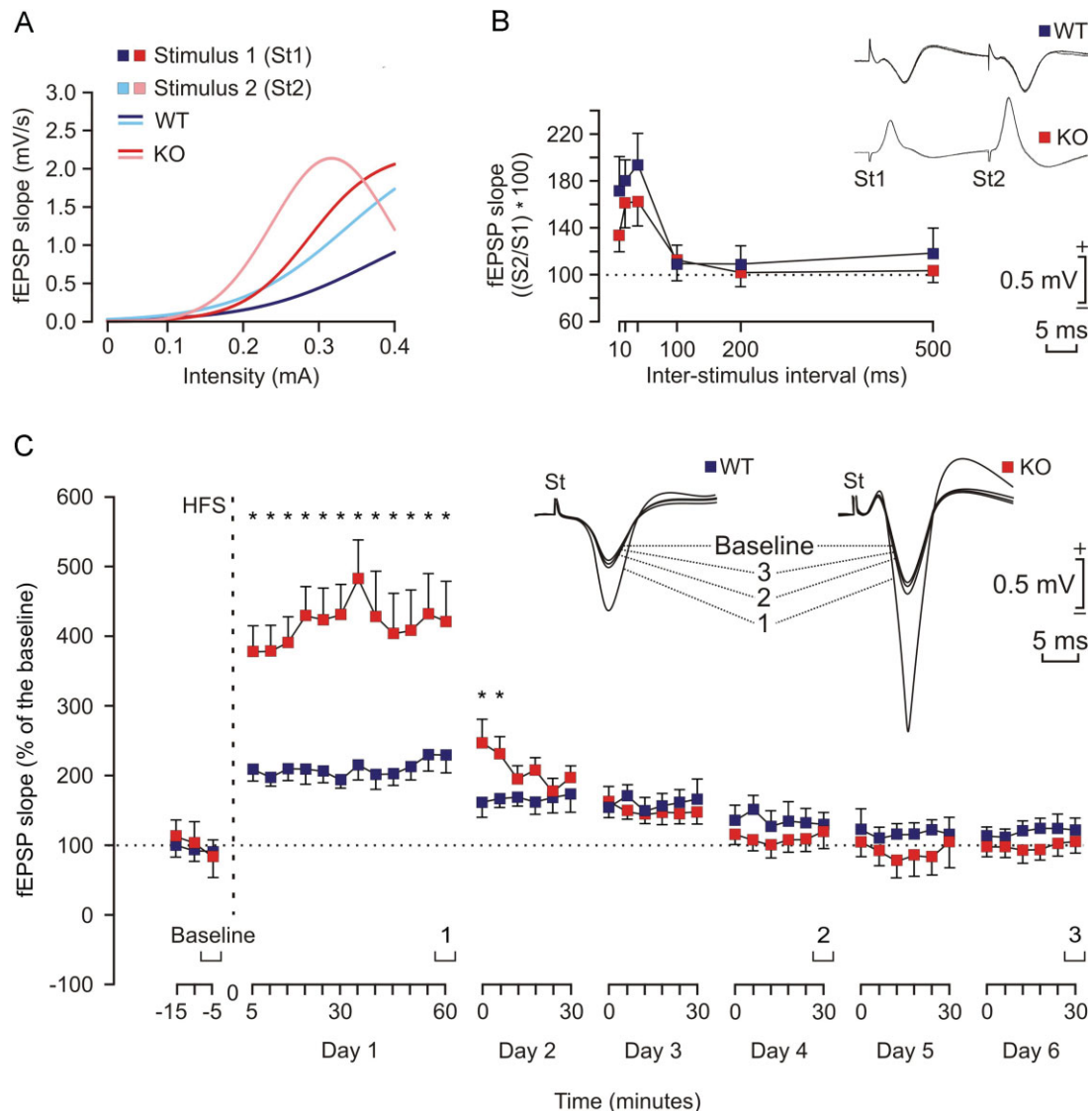
## DISCUSSION

Here, we generated malin KO mice as an animal model of LD. We used this model to address fundamental questions regarding the role of malin in the control of glycogen metabolism and the impact of its demise at the histological, biochemical and behavioural level. In relation to recent publications on the same subject, we have extended the characterization of the model up to 11 months of age, a point at which the neurological consequences of the defect are already clearly visible. Our results point out the importance of the regulation of MGS by laforin and malin and highlight a key role of glycogen metabolism in the etiopathology of LD.

The KO animals showed LBs in several brain regions, these bodies being most conspicuous in the cerebellum and hippocampus. Glycogen content in the brains of these animals more than doubled that of the WT. This increase was accounted for solely by the polysaccharide present in the insoluble fraction. This observation thus supports the notion that the increase corresponds to the polyglucosan content of LBs. However, LBs contained not only polyglucosan but also MGS, the enzyme responsible for its synthesis. The accumulation of LBs occurs even with increased levels of soluble GP. These results can be understood as a response to polyglucosan accumulation and suggest that the aberrant glycogen synthesized in malin KO brains is resistant to GP degradation. In addition, in concordance with the apparent increase in the number of LBs, we also found increased levels of glycogenin in the insoluble fraction of KO brains, suggesting that this enzyme is also required for the initiation of polyglucosan synthesis.

It has been reported that phosphate is introduced into glycogen by catalytic error of GS and removed from it by the phosphatase activity of laforin. The hyperphosphorylation of glycogen would lead to a reduction of its solubility, this feature being the underlying determinant of LD according to recent publications (Tagliabracci et al, 2008, 2011; Turnbull et al, 2010). In the malin KO mice, although an increase of total laforin levels has been reported, a decrease in soluble laforin has been suggested to be responsible for the formation of LBs (DePaoli-Roach et al, 2010). Our data demonstrate that although laforin was augmented in the insoluble fraction, it remained unchanged

indicated, malin KO were generated on a C57BL6 background. We investigated the susceptibility of both WT and KO mice to a single i.p. injection of kainic acid. As illustrated in Fig 9A, all injected KO mice presented spontaneous hippocampal seizures, accompanied on occasions (2 out of 6) by myoclonus. In contrast, no WT animal displayed clonic hippocampal seizures. Interestingly, the presence of seizures significantly reduced the amplitude and slope of fEPSPs evoked at the CA3-CA1 synapse (Fig 9B). Train stimulation of Schaffer collaterals evoked long-lasting after-discharges in KO, but not in WT, mice (Fig 9C). Finally, the presence of spontaneous clonic seizures and/or of experimentally evoked after-discharges reduced significantly the theta rhythm normally present in the hippocampus of awake mice (Fig 9D). In short, malin KO animals presented a propensity to generate hippocampal seizures not noticed in controls, following a single injection of kainic acid.



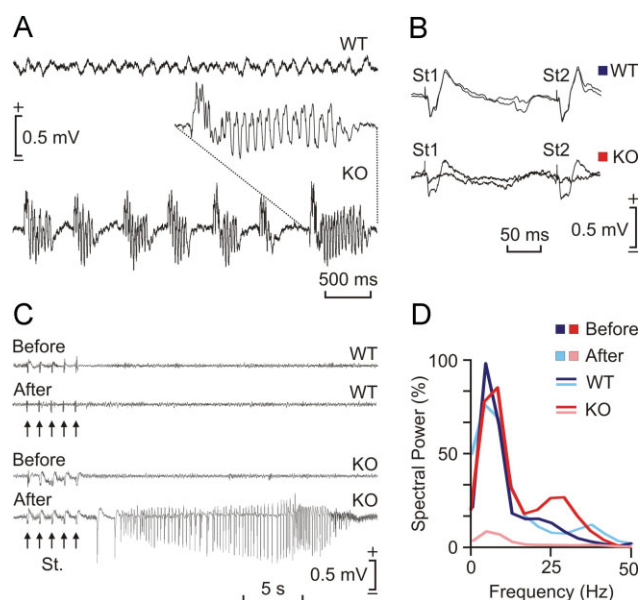
**Figure 8. Electrophysiological properties of hippocampal synapses in WT and KO alert behaving mice.**

- A.** Input/output curves of fEPSPs evoked at the CA1 area by paired (40 ms of interval) pulses presented to Schaffer collaterals at increasing intensities (in mA) in WT (1st pulse, dark blue; 2nd pulse, light blue) and KO (1st pulse, dark red; 2nd pulse, light red) mice ( $n = 4$  animals/group). The best nonlinear adjustments ( $r \geq 0.99$ ;  $p \leq 0.001$ ) to the collected data are illustrated. KO mice presented significantly larger ( $p < 0.01$ ) input/output curves than WT animals.
- B.** There were no significant differences in paired-pulse facilitation between WT (blue) and KO (red) mice. The data shown are mean  $\pm$  SEM slopes of the 2nd fEPSP expressed as a percentage of the 1st for six (10, 20, 40, 100, 200, 500) inter-pulse intervals. Some fEPSP paired traces (20 ms of inter-pulse interval) collected from representative WT and KO mice are illustrated.
- C.** The two graphs illustrate the time course of LTP evoked in the CA1 area (fEPSP mean  $\pm$  SEM) following high frequency stimulation HFS for WT (blue) and KO (red) mice. The HFS was presented after 15 min of baseline recordings, at the time marked by the dashed line. LTP evolution was followed for up to 6 days. The fEPSP is given as a percentage of the baseline (100%) slope. Although the two groups presented a significant increase (ANOVA, two-tailed) in fEPSP slope following HFS when compared with baseline records, values collected from the KO group were significantly ( $p < 0.001$ ) larger than those collected from WT mice at the indicated times.

in the soluble fraction. Therefore, a decrease in the amount of soluble laforin cannot be invoked as the cause of LB accumulation in our model.

In agreement with the impressive accumulation of MGS observed by immunostaining, Western blot analysis of malin KO brain extracts showed that total MGS was dramatically increased and accumulated in the insoluble fraction. We found

that the enzyme in the LBs was less phosphorylated and therefore expected to be more active. However, we did not detect increased GS activity even in the presence of G6P. This imbalance between total protein amounts and activity has previously been reported for the other model of LD, the laforin KO (Tagliabracci et al, 2008). These results could be explained by GS being unable to exert its activity under the assay



**Figure 9. Effects of kainic acid injection in malin KO mice.**

- A.** Representative hippocampal EEG recordings carried out in a WT (top) and in a KO mice 30 min after kainic acid injection (8 mg/kg, i.p.). Note the presence of repetitive clonic seizures in the KO animal. The inset shows an enlargement of a typical seizure.
- B.** Representative hippocampal CA3-CA1 fEPSPs collected from a WT and a KO animal before and after kainic acid injection. Note that the presence of clonic seizures reduced significantly the amplitude of the evoked fEPSP in the KO mouse.
- C.** Differential effects of train stimulation (St.: five 200 Hz, 100 ms trains of pulses at a rate of 1/s) of WT and KO mice before and after kainic acid injection. Note the long-lasting seizure evoked in the KO animal when stimulated following kainic acid injection.
- D.** Spectral analysis of hippocampal EEG recordings collected from WT and KO mice before (WT, dark red; KO, dark blue) and after (WT, light red; KO, light blue) kainic injection. Note that the presence of repetitive seizures cancel out the normal theta (4–8 Hz) present in hippocampal EEG in behaving mice.

conditions because it is trapped in the LBs. Alternatively, GS accumulated in the LBs could be truly inactivated through structural changes, aggregation or unknown posttranslational modifications that prevented it from undergoing the allosteric activation induced by an excess of G6P. To the best of our knowledge, LD models are the only examples in which accumulations of this abnormal MGS have been described. So the mechanism by which the activity of this enzyme is impaired could be a unique characteristic of the disease and opens new questions on the regulation of glycogen metabolism.

The MGS accumulation observed in malin KO brains (11 months) is also comparable to that described for laforin KO brains at the same age (9–12 months) (Tagliabracchi et al, 2008). Recent work (Turnbull et al, 2011) shows that PTG depletion prevents LB formation and the epileptic phenotype of laforin KO mice. Taken together, these observations reinforce the notion that the malin–laforin complex is involved in the degradation of PTG and MGS (Vilchez et al, 2007).

Although the presence of LBs in glial cells of patients was a matter of debate at the beginning of the 20th century (del Río-Hortega, 1925; Lafora, 1913), to the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate astroglial LBs. This finding solves a long established paradox in LD. Research into this disease has been focused on neurons and the presence of LBs in these cells is considered the hallmark of LD. However, the presence of aberrant glycogen depositions in neurons but not in astrocytes is paradoxical as astrocytes, but not neurons, are considered to be the glycogenic cells in the brain. The immunohistological studies of the hippocampus, one of the most affected zones in the malin KO brains, showed that astrocytes and PV<sup>+</sup> interneurons express MGS and malin and that both types of cells accumulate LBs when malin is knocked out. This finding supports the idea that LBs are formed as a result of the deregulation of glycogen machinery. Interestingly, polyglucosan accumulation appeared first in astrocytes. The chronology of the appearance of LBs correlates with the

degenerative character of LD as the increase in polyglucosan deposits in PV<sup>+</sup> somas coincided with loss of these interneurons. These observations are in agreement with previous results from our group suggesting that neurons are much more sensitive than astrocytes to cell death induced by glycogen overaccumulation (Vilchez et al, 2007).

Hippocampal PV<sup>+</sup> cells are inhibitory interneurons. They contribute in the generation of synchronous population discharge patterns and their impairment is thought to be involved in epileptogenesis and seizure activity (Magloczky & Freund, 2005). In fact, a decrease in their number occurs in some cases of epilepsy (Castro et al, 2011; Dinocourt et al, 2003), Alzheimer's disease (Brady & Mufson, 1997; Takahashi et al, 2010), Creutzfeldt-Jakob disease (Guentchev et al, 1997), schizophrenia (Nullmeier et al, 2011; Zhang & Reynolds, 2002), and other disorders such as Ammon's horn sclerosis (Zhu et al, 1997) and dementia with Lewis bodies (Bernstein et al, 2011). Our results suggest that malin KO mice undergo late-onset degeneration of PV<sup>+</sup> interneurons, which correlates with intracellular LB formation. Therefore, although the loss of PV immunoreactivity cannot be ruled out as it has been also described in some cases of epileptic hippocampus (Arellano et al, 2004; Sloviter, 1991; Wittner et al, 2005), the enhanced synaptic excitability and the propensity to myoclonic seizures that we observed in these animals could be attributed to the loss of hippocampal PV<sup>+</sup> interneurons. The induction of glycogen accumulation in neuron primary cultures causes death by apoptosis (Vilchez et al, 2007). Thus, the loss of interneurons could be attributed to the accumulation of this polysaccharide. Given that we did not detect this neurodegeneration when LBs were extra-neuronal (4 months), we propose that the neuronal accumulation of MGS protein and its synthetic product polyglucosan is crucial for the progression of LD.

In spite of the severe neurodegeneration found in the malin KO mice, apoptotic neurons were not found in our preparations. The same observation has been made in the brain of laforin KO mice, other model of LD (Ganesh et al, 2002). The study of neurodegenerative diseases like Alzheimer's, Huntington's and Amyotrophic Lateral Sclerosis has shown that it is very difficult to detect apoptosis *in vivo* (Mattson, 2000). This is because

apoptosis usually occurs quite rapidly (within hours), thus hindering the detection of cells showing classic features of this process in a neurodegenerative event that takes months.

Taken together, our results provide important insights into the molecular basis of LD. First, they confirm *in vivo* the role of malin in regulating MGS and glycogen accumulation. Second, they provide the first evidence of LB presence in astroglial cells. And finally, they link the expression of malin and MGS with a particular subset of neurons, the formation of LBs in these cells, their progressive loss, and the neurological decline associated with LD. We propose that the failure of MGS regulation is a key point for the progression of LD, thus making MGS a possible target for the treatment of this devastating disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and reagents

Amyloglucosidase,  $\alpha$ -amylase (from human saliva) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) were from Sigma-Aldrich. Antibodies against MGS (from Cell Signalling and Epitomics), pSer640-GS (from Cell Signalling), pSer7,10-GS (from KinaseSource), glycogenin (from Abnova), actin (from Sigma), glial fibrillary acidic protein (GFAP, from Millipore and Dako), parvalbumin (from Swant),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ gal, from Promega), polyglucosan (from Kamiya) and laforin (a gift from Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba) were used in this study. Antibodies to GP isoforms were produced by Eurogentec. Guinea Pigs were immunized against a synthetic peptide corresponding to the C-terminus (amino acids 826–841) of muscle glycogen phosphorylase (MGP). Chickens were immunized against a synthetic peptide corresponding to the C-terminus (amino acids 826–842) of mouse brain glycogen phosphorylase (BGP) (Vilchez et al, 2007).

### Generation of EPM2B KO mice

EPM2B-disrupted ES C57BL/6N (10571D-E2) cells were obtained from the Knockout Mouse Project Repository (KOMP), University of California, Davis, CA. In these cells, the complete EPM2B coding region plus 391 nucleotides of the 3'-untranslated region are replaced with a cassette containing the LacZ and Neo<sup>R</sup> genes. LacZ is fused in-frame at the EPM2B ATG (Supporting Information Fig 2A). After confirmation of targeting by PCR analyses (Supporting Information Fig 2B), the cells were injected into C57BL/6J blastocysts, and these were then implanted in the uterus of pseudo-pregnant C57BL/6J females for the generation of chimeric mice. One chimeric male positive for the disruption was mated with C57BL/6J females to test for germline transmission. Heterozygous F1 mice were intercrossed to generate the animals used in this study. WT, heterozygous and homozygous null mice were identified by PCR genotyping using oligonucleotide primer pairs for both the 5'-end and the 3'-end of the EPM2B-disrupted region (Supporting Information Fig 2B). Further confirmation of the disruption was obtained by RT-PCR of EPM2B mRNA (Supporting Information Fig 2C).

### Animal studies

All procedures were approved by the Barcelona Science Park's Animal Experimentation Committee and were carried out in accordance with

the European Community Council Directive and National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals. Mice were allowed free access to a standard chow diet and water and maintained on a 12-h/12-h light/dark cycle under specific pathogen-free conditions in the Animal Research Center at the Barcelona Science Park. After weaning at 3 weeks of age, tail clippings were taken for genotyping by PCR.

### Behavioural and electrophysiological tests

Methodological information regarding the open field test, the operant conditioning procedures, the input/output curves, the electroencephalographic (EEG) recordings and the kainate injection and recording of seizure activities can be found in Supporting Information Methods.

### Sample preparation, homogenation and fractionation for biochemical analysis

The animals used for biochemical analysis were anesthetized and sacrificed by decapitation. Heads were directly froze on liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Tissue samples were added to 10 volumes of ice-cold homogenization buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM KF, 15 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoethanol, 0.6 M sucrose, 25 nM okadaic acid, 1 mM sodium orthovanadate, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin, 1 mM benzamidine and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. They were then homogenized (Polytron) at  $4^{\circ}\text{C}$ . For sample fractionation, homogenates were centrifuged at  $13000 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Sediments were resuspended with the same volume as supernatant of the corresponding buffer. Total homogenates, supernatants and sediments were recovered for GS activity, Western blotting and glycogen determination. Insoluble fractions were treated with amylase 110 U/ml for 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$  to analyse glycogenin by Western blotting.

### Glycogen synthase activity determination

Glycogen synthase activity was measured in total homogenates, supernatants and sediments in the presence of 4.4 mM UDP-glucose and absence or presence of 6.6 mM G6P, representing active or total activity, respectively, as previously described (Thomas et al, 1968).

### Glycogen analysis

Total homogenates, supernatants and sediments were boiled in 30% KOH for 15 min and glycogen was determined by an amyloglucosidase-based assay as described in Chan and Exton (Chan & Exton, 1976). To assess glycogen branching, we used the method described by Krisman (Krisman, 1962).

### Histology

Animals were anesthetized and perfused transcardiacally with phosphate buffered saline (PBS) containing 4% of paraformaldehyde. Brains were removed, postfixed with PBS-4% paraformaldehyde, cryoprotected with PBS-30% sucrose and frozen. To obtain tissue sections, brains were sectioned coronally at  $30 \mu\text{m}$ , distributed in 10 series, and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  in PBS-30% glycerol-30% ethylene glycol for free-floating processing. In the case of animals used in electrophysiological experiments, selected sections

## The paper explained

### PROBLEM:

Lafora disease (LD) is a fatal progressive epilepsy caused by mutations in either *EPM2A*, which encodes laforin, or *EMP2B*, which encodes malin. At the beginning of the 20th century, more than 80 years before the discovery of the genes causing this disease, the presence of abnormal glycogen inclusions (later referred to as LBs) in neurons of the patients was described as the hallmark of the disease. However, the mechanism behind the formation of abnormal glycogen in LD is still a matter of debate, as is the link between LB formation and neurodegeneration. We approached these questions by studying malin-deficient mice.

### RESULTS:

Our work is centred on the hippocampus, one of the most affected areas of the brain in LD. Here, we describe the expression of GS—the only enzyme able to produce glycogen in mammals—and malin in astrocytes and interneurons, and we analyse the progressive appearance of LBs in these cells in the malin-deficient mouse. We found a dramatic increase in GS in the brain

of this animal model. The enzyme accumulated on LBs in an insoluble non-active form. Here, we have found a link between the late formation of LBs in a particular subset of interneurons, their degeneration and the characteristic neuropathology associated with LD. Furthermore, this is the first study to report the presence of LBs in astrocytes.

### IMPACT:

Our findings provide new insights into the etiology of LD. Although glycogen is stored normally in astrocytes, evidence of LBs in these cells has never been reported. The detection of LBs in glial cells widens our vision by showing that the formation of aberrant glycogen is not limited to neurons. We highlight the high susceptibility of neurons, a cell type that does not normally store glycogen, to cell death induced by the accumulation of this polysaccharide and conclude that the malin/laforin complex is crucial for GS regulation and glycogen accumulation. We propose that GS is a potential target for the treatment of LD.

including the dorsal hippocampus were mounted on gelatinized glass slides and stained using the Nissl technique with 0.1% toluidine blue, to determine the location of stimulating and recording electrodes.

### Electron microscopy

Animals were perfused with 2% glutaraldehyde–2% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer. After post-fixation in the same solution overnight, tissue slices were transferred to 2% osmium tetroxide, stained with 2% uranyl acetate, dehydrated and finally embedded in Araldite. Ultrathin sections from medial hippocampal samples were collected on formvar-coated slot grids and stained with lead citrate. Electron micrographs were taken using a Tecnai Spirit transmission electron microscope.

### Immunocytochemistry

For immunodetection of antigens, sections were washed in PBS and PBS–0.1% Triton X-100, blocked for 2 h at RT with PBS containing 10% of normal goat serum (NGS), 0.2% of gelatin, and F(ab')<sub>2</sub> fragment anti-mouse IgG when required. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C with PBS–5% NGS. For immunohistochemistry, dye-labelled secondary antibodies and Hoechst 33342 were incubated for 2 h at RT in PBS–5% NGS, mounted in Mowiol and stored at –20°C. Confocal images were taken with a Leica SP5 microscope. For immunohistochemistry, sequential incubation with biotinylated secondary antibodies and streptavidin–HRP was performed in PBS–5% NGS. Bound antibodies were visualized by reaction using 0.03% diaminobenzidine and 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and sections were dehydrated and mounted (Eukitt). For PAS staining, selected brain sections were oxidized with 5% periodic acid for 10 min, stained with Schiff reagent for 30 min, dehydrated and mounted (Eukitt).

### Cell counting

For quantification in the hippocampus, the number of parvalbumin-positive (PV<sup>+</sup>) cells was counted every 10th section for each animal; data were normalized to the area counted in 30-μm-thick sections (n=8–10 sections per animal, 3 animals per group). Areas measured for quantification were determined using ImageJ software.

### Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was determined by unpaired Student's *t*-test using GraphPad Prism software (version 5; GraphPad Software, Inc.). Statistical significance was assumed at *p* ≤ 0.05.

### Author contributions

JVO participated in the design and coordination of the study, carried out the histological analyses of brains, the quantification of PV<sup>+</sup> interneurons, and the glycogen branching assay and drafted the manuscript; JD conceived the study, participated in its design and coordination, generated, bred and genotyped the mice, carried out the histological analyses of muscle and heart, performed the behavioural studies and helped to draft the manuscript; MGR carried out the biochemical studies; CB performed the electron microscopy study; JMDG and AG performed the operant conditioning test and the electrophysiological studies; IS helped to analyse the mice; LP helped to study the brain MGS expression; AS helped to perform the histological analyses; XC and ES participated in the coordination of the study; JJG directed the study. All the authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors thank Anna Adrover, Emma Veza, Montserrat Climent and Natàlia Plana (IRB Barcelona), Marisa Larramona (Barcelona Science Park) and María Sánchez-Enciso (Pablo de Olavide University) for their technical assistance. Thanks also go to Stephen Forrow (IRB Barcelona Mouse Mutant Core Facility) and Julian Colombelli, Lúcia Bardia and Anna Lladó (IRB Barcelona Advanced Digital Microscopy Core Facility) and Carmen López (University of Barcelona Electron Microscopy Unit) for advice, Joaquim Calbó and Florencia Tevy for critical review and to Tanya Yates for correcting the English version of the manuscript. This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Innovación, Spain [grant numbers BFU2008-00769, BFU2008-03390/BMC, and BFU2008-00899], the Instituto de Salud Carlos III [PhD fellowship number FI06/00375] to [JV], the Torres Quevedo programme [PTQ-08-03-07880] to [AS] and a grant from the Fundación Marcelino Botín and the CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación).

Supporting information is available at EMBO Molecular Medicine online.

The authors declare that they have no conflict of interest.

## For more information

OMIM Lafora Disease:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/254780>

Genes:

Malin:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/378884>

Laforin:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7957>

MGS:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2997>

## References

- Arellano JI, Munoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J (2004) Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 127: 45-64
- Bernstein HG, Johnson M, Perry RH, LeBeau FE, Dobrowolny H, Bogerts B, Perry EK (2011) Partial loss of parvalbumin-containing hippocampal interneurons in dementia with Lewy bodies. *Neuropathology* 31: 1-10
- Bouskila M, Hunter RW, Ibrahim AF, Delattre L, Pegg M, van Diepen JA, Voshol PJ, Jensen J, Sakamoto K (2010) Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metab* 12: 456-466
- Brady DR, Mufson EJ (1997) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer's diseased brain. *Neuroscience* 80: 1113-1125
- Castro OW, Furtado MA, Tilelli CQ, Fernandes A, Pajolla GP, Garcia-Cairasco N (2011) Comparative neuroanatomical and temporal characterization of Fluoro-Jade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res* 1374: 43-55
- Cataldo AM, Broadwell RD (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol* 15: 511-524
- Cavanagh JB (1999) Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 265-295
- Chan TM, Exton JH (1976) A rapid method for the determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes. *Anal Biochem* 71: 96-105
- Chan EM, Andrade DM, Franceschetti S, Minassian B (2005) Progressive myoclonus epilepsies: EPM1, EPM2A, EPM2B. *Adv Neurol* 95: 47-57
- del Río-Hortega P (1925) Papel de la microglía en la formación de los cuerpos amiláceos del tejido nervioso. *Boletín Sociedad Española Historia Natural* 25: 127-141
- Delgado-Escueta AV (2007) Advances in lafora progressive myoclonus epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7: 428-433
- DePaoli-Roach AA, Tagliabracci VS, Segvich DM, Meyer CM, Irimia JM, Roach PJ (2010) Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin. *J Biol Chem* 285: 25372-25381
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Esclapez M (2003) Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459: 407-425
- Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Sakamoto T, Avila MR, Machado-Salas J, Hoshii Y, Akagi T, Gomi H, Suzuki T, Amano K *et al* (2002) Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum Mol Genet* 11: 1251-1262
- Ganesh S, Puri R, Singh S, Mittal S, Dubey D (2006) Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *J Hum Genet* 51: 1-8
- Gentry MS, Worby CA, Dixon JE (2005) Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8501-8506
- Goldberg ND, O'Toole AC (1969) The properties of glycogen synthetase and regulation of glycogen biosynthesis in rat brain. *J Biol Chem* 244: 3053-3061
- Gruart A, Munoz MD, Delgado-Garcia JM (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* 26: 1077-1087
- Guentchev M, Hainfellner JA, Trabattoni GR, Budka H (1997) Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 1119-1124
- Krisman CR (1962) A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem* 4: 17-23
- Lafora GR (1913) Nuevas investigaciones sobre los cuerpos amiláceos del interior de las células nerviosas. *Trab Lab Investi Biológ Univ Madrid* 11: 29-42
- Lohi H, Ianzano L, Zhao XC, Chan EM, Turnbull J, Scherer SW, Ackerley CA, Minassian BA (2005) Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet* 14: 2727-2736
- Madronal N, Gruart A, Delgado-Garcia JM (2009) Differing presynaptic contributions to LTP and associative learning in behaving mice. *Front Behav Neurosci* 3: 7
- Madronal N, Lopez-Aracil C, Rangel A, del Río JA, Delgado-Garcia JM, Gruart A (2010) Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One* 5: e11130
- Magloczky Z, Freund TF (2005) Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci* 28: 334-340
- Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 120-129
- McLlin JP, Steward O (2006) Comparison of seizure phenotype and neurodegeneration induced by systemic kainic acid in inbred, outbred, and hybrid mouse strains. *Eur J Neurosci* 24: 2191-2202

- Nullmeier S, Panther P, Dobrowolny H, Frotscher M, Zhao S, Schwegler H, Wolf R (2011) Region-specific alteration of GABAergic markers in the brain of heterozygous reeler mice. *Eur J Neurosci* 33: 689-698
- Pfeiffer-Guglielmi B, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B (2003) Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem* 85: 73-81
- Skurat AV, Wang Y, Roach PJ (1994) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J Biol Chem* 269: 25534-25542
- Sloviter RS (1991) Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1: 41-66
- Tagliabracci VS, Turnbull J, Wang W, Girard JM, Zhao X, Skurat AV, Delgado-Escueta AV, Minassian BA, Depaoli-Roach AA, Roach PJ (2007) Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19262-19266
- Tagliabracci VS, Girard JM, Segvich D, Meyer C, Turnbull J, Zhao X, Minassian BA, Depaoli-Roach AA, Roach PJ (2008) Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease. *J Biol Chem* 283: 33816-33825
- Tagliabracci VS, Heiss C, Karthik C, Contreras CJ, Glushka J, Ishihara M, Azadi P, Hurley TD, Depaoli-Roach AA, Roach PJ (2011) Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease. *Cell Metab* 13: 274-282
- Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BP, Van Der Kolk N, Perl DP, Bouras C, Steinbusch HW, Schmitz C, Hof PR, Dickstein DL (2010) Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 214: 145-160
- Thomas JA, Schlender KK, Lerner J (1968) A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal Biochem* 25: 486-499
- Turnbull J, Wang P, Girard JM, Ruggieri A, Wang TJ, Draginov AG, Kameka AP, Pencea N, Zhao X, Ackerley CA et al (2010) Glycogen hyperphosphorylation underlies lafora body formation. *Ann Neurol* 68: 925-933
- Turnbull J, Depaoli-Roach AA, Zhao X, Cortez MA, Pencea N, Tiberia E, Piliguan M, Roach PJ, Wang P, Ackerley CA et al (2011) PTG depletion removes Lafora bodies and rescues the fatal epilepsy of Lafora disease. *PLoS Genet* 7: e1002037
- Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Valles J, Garcia-Fojeda B, Criado-Garcia O, Fernandez-Sanchez E, Medrano-Fernandez I, Dominguez J et al (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* 10: 1407-1413
- Villar-Palasi C, Guinovart JJ (1997) The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB J* 11: 544-558
- Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, Ransom BR (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J Neurosci* 20: 6804-6810
- Wittner L, Eross L, Czirjak S, Halasz P, Freund TF, Magloczky Z (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain* 128: 138-152
- Zhang ZJ, Reynolds GP (2002) A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res* 55: 1-10
- Zhu ZQ, Armstrong DL, Hamilton WJ, Grossman RG (1997) Disproportionate loss of CA4 parvalbumin-immunoreactive interneurons in patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 988-998
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64: 355-405



Review

## A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data

Maria Vinaixa<sup>1,2,3,\*</sup>, Sara Samino<sup>1,3</sup>, Isabel Saez<sup>4,5</sup>, Jordi Duran<sup>2,4</sup>, Joan J. Guinovart<sup>2,4,5</sup> and Oscar Yanes<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Metabolomics Platform, Campus Sescelades, Edifici N2, Rovira i Virgili University, Tarragona 43007, Spain; E-Mail: sara.samino@urv.cat (S.S.)

<sup>2</sup> Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Passeig Bonanova 69, Barcelona 08017, Spain; E-Mails: jordi.duran@irbbarcelona.org (J.D.); guinovart@irbbarcelona.org (J.J.G.);

<sup>3</sup> Institut d'Investigació Biomèdica Pere Virgili (IISPV), C/Sant Llorenç, 21, Reus 43201, Spain,

<sup>4</sup> Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona 08028, Spain; E-Mail: isabel.saez@irbbarcelona.org (I.S.)

<sup>5</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain

\* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: maria.vinaixa@urv.cat (M.V.); oscar.yanes@urv.cat (O.Y.); Tel.: +34-977-770958, (M.V).

Received: 2 August 2012; in revised form: 2 October 2012 / Accepted: 10 October 2012 /

Published: 18 October 2012

---

**Abstract:** Several metabolomic software programs provide methods for peak picking, retention time alignment and quantification of metabolite features in LC/MS-based metabolomics. Statistical analysis, however, is needed in order to discover those features significantly altered between samples. By comparing the retention time and MS/MS data of a model compound to that from the altered feature of interest in the research sample, metabolites can be then unequivocally identified. This paper reports on a comprehensive overview of a workflow for statistical analysis to rank relevant metabolite features that will be selected for further MS/MS experiments. We focus on univariate data analysis applied in parallel on all detected features. Characteristics and challenges of this analysis are discussed and illustrated using four different real LC/MS untargeted metabolomic datasets. We demonstrate the influence of considering or violating mathematical assumptions on which univariate statistical test rely, using high-dimensional LC/MS datasets. Issues in data analysis such as determination of sample size, analytical variation, assumption of normality

and homocedasticity, or correction for multiple testing are discussed and illustrated in the context of our four untargeted LC/MS working examples.

**Keywords:** univariate; metabolomics; mass spectrometry

---

## 1. Introduction

The comprehensive detection and quantification of metabolites in biological systems, coined as ‘metabolomics’, offers a new approach to interrogate mechanistic biochemistry related to natural processes such as health and disease. Recent developments in mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) have been crucial to facilitate the global analysis of metabolites. The examination of metabolites, however, commonly follows two strategies: (i) targeted metabolomics, driven by a specific biochemical question or hypothesis in which a set of metabolites related to one or more pathways are defined, or (ii) untargeted metabolomics: driven by an unbiased approach (*i.e.*, non-hypothesis) in which as many metabolites as possible are measured and compared between samples [1]. The latter is comprehensive in scope and outputs complex data sets, particularly by using LC/MS-based methods. Thousands of so called metabolite features (*i.e.*, peaks corresponding to individual ions with a unique mass-to-charge ratio and a unique retention time or mzRT features from now on) can be routinely detected in biological samples. In addition, each mzRT feature in the dataset is associated with an intensity value (or area under the peak), which indicates its relative abundance in the sample. Overall, this complexity imposes the implementation of metabolomic softwares such as XCMS [2], MZmine [3] or Metalign [4] that can provide automatic methods for peak picking, retention time alignment to correct experimental drifts in instrumentation, and relative quantification. As a result, the identification of mzRT features that are differentially altered between sample groups has become a relatively automated process. However, the identification and quantization of a “metabolite feature” does not necessary translate into a metabolite entity. LC/MS metabolomic data presents high redundancy because of the recurrent detection of adducts (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>3</sub>, etc), isotopes, or doubly charged ions that greatly inflate the number of detected peaks. Several recently launched open-source algorithms such as CAMERA [5] or AStream [6], and commercially available software such as Mass Hunter (Agilent Technologies) or Sieve (Thermo Scientific), are capable of filtering redundancy by annotating isotopes and adduct peaks, and the resulting accurate compound mass (*i.e.*, molecular ion) can be searched in metabolite databases such as METLIN, HMDB or KEGG. Database matching represents only a putative metabolite assignment that must be confirmed by comparing the retention time and/or MS/MS data of a model pure compound to that from the feature of interest in the research sample. These additional analyses are time consuming and represent the rate-limiting step of the untargeted metabolomic workflow. Consequently, it is essential to prioritize the list of mzRT features from the raw data that will be subsequently identified by RT and/or MS/MS comparison. Relevant mzRT features for MS/MS identification are typically selected based on statistics criteria, either by multivariate data analysis or multiple independent univariate tests.

The intrinsic nature of biological processes and LC/MS-derived datasets is undoubtedly multivariate since it involves observation and analysis of more than one variable at a time. Consequently, the

majority of metabolomics studies make use of multivariate models to report their main findings. Despite the conferred utility, powerfulness and versatility of multivariate models, their performance might be fraught by the high-dimensionality of such datasets due to the so-called ‘curse of dimensionality’ problem. Curse of dimensionality arises when datasets contain too much sparse data in terms of the number of input variables. This causes, in a given sample size, a maximum number of variables above which the performance of our multivariate model will degrade rather than improve. Hence, attempting to make the model conform too closely to this data (*i.e.*, considering too many variables in our multivariate model) can introduce substantial errors and reduce its predictive power (*i.e.*, overfitting). Therefore, using multivariate models require intensive validation work. Overall, multivariate data analysis is far from the scope of this paper and excellent reviews on multivariate tools for metabolomics can be found elsewhere [7,8]. On the other hand, data analysis can also be approached from a univariate perspective using traditional statistical methods that consider only one variable at a time [9]. The implementation of multivariate and univariate data analysis is not mutually exclusive and in fact, we strongly recommend their combined use to maximize the extraction of relevant information from metabolomic datasets [10,11]. Univariate methods are sometimes used in combination with multivariate models as a filter to retain those potentially “information-rich” mzRT features [12]. Then, the number of mzRT features considered in the multivariate model is significantly reduced down to those showing statistical significance in previous univariate tests (e.g.,  $p$ -value < 0.05). On the other hand, there are multiple reported metabolomics works using univariate tests applied in parallel across all the detected mzRT features to report their main findings. It should be note that this approach overlooks correlations within mzRT features and therefore information about correlated trends is not retained. In addition, applying multiple univariate tests in parallel to multivariate datasets involves the acceptance of mathematical pre-requisites and certain consequences such as the particular distributions of variables (e.g., normality) and increased risk of false positive results, respectively. Many researchers often ignore these issues when analyzing untargeted metabolomic datasets using univariate methods, which eventually can compromise their results.

This paper aims to investigate the impact of univariate statistical issues on LC/MS-based metabolomic experiments, particularly in small, focused studies (e.g., small clinical trials or animal studies). To this end, here we explore the nature of four real and independent datasets, evaluate the challenges and limitations of executing multiple univariate tests and illustrate available shortcuts. Note that we do not aim at writing a conventional statistical paper. Instead, our goal is to offer a practical guide with resources to overcome the challenges of multiple univariate analysis for untargeted metabolomic data. All methods described in this paper are based on scripts programmed either in MATLAB™ (Mathworks, Natick, MA) or R [13].

## 2. Properties of LC-MS Untargeted Datasets: High-Dimensional and Multicollinear

Basic information about the four real untargeted metabolomics LC-MS-based working examples is summarized in Table 1. These examples do not resemble ideal datasets described in basic statistical textbooks, and illustrates the challenges of real-life metabolomic experiments. Working examples constitute retinas, serum and neuronal cell cultures under different experimental conditions (e.g., KO vs. WT; normoxia vs. hypoxia; treated vs. untreated) analyzed by LC-qTOF MS. Data were processed

using the XCMS software to detect and align features, and thousands of features were generated from these biological samples. Each mzRT feature corresponds to a detected ion with a unique mass-to-charge ratio, retention time and raw intensity (or area). For example, each sample in example #3 exists in a space defined by 9877 variables or mzRT features. The four examples illustrate the high-dimensionality of untargeted LC-MS datasets in which the number of features or variables largely exceeds the number of samples. The rather limited number of individuals or samples per group is a common trait of metabolomic studies devoted to understand cellular metabolism [14-16]. When working with animal models of disease, for instance, this limitation is typically imposed by ethical and economical restrictions.

**Table 1.** Summary of working examples obtained from LC-MS untargeted metabolomic experiments. Further experimental details and methods can be obtained from references. (KO=Knock-Out; WT=Wild-Type).

|            | Biofluid/Tissue        | Sample groups | # samples /group | # XCMS variables | System      | Reference        |
|------------|------------------------|---------------|------------------|------------------|-------------|------------------|
| Example #1 | Retina                 | KO            | 11               | 4581             | LC/ESI-QTOF | [17]             |
|            |                        | WT            | 11               |                  |             |                  |
| Example #2 | Retina                 | Hypoxia       | 12               | 8146             | LC/ESI-QTOF | [16]             |
|            |                        | Normoxia      | 13               |                  |             |                  |
| Example #3 | Serum                  | Untreated     | 12               | 9877             | LC/ESI-TOF  | [18]             |
|            |                        | Treated       | 12               |                  |             |                  |
| Example #4 | Neuronal cell cultures | KO            | 15               | 8221             | LC/ESI-QTOF | unpublished data |
|            |                        | WT            | 11               |                  |             |                  |

Additionally, a second attribute of untargeted LC-MS metabolomic datasets is that they enclose multiple correlations among mzRT features (*i.e.*, multicollinearity) [19]. Each metabolite produces more than one mzRT feature that result from isotopic distributions, potential adducts, and in-source fragmentation. Moreover, the evident biochemical interrelation among metabolites may also contribute to the multicollinearity. Namely, many metabolites participate in inter-connected enzymatic reactions and pathways (e.g., substrate and product; cofactors) and regulate enzymatic reactions (e.g., feed-back inhibition). Altogether, untargeted LC-MS metabolomics datasets are highly-dimensional and multicorrelated.

### 3. Sample Size Calculation in LC-MS Untargeted Metabolomics Studies

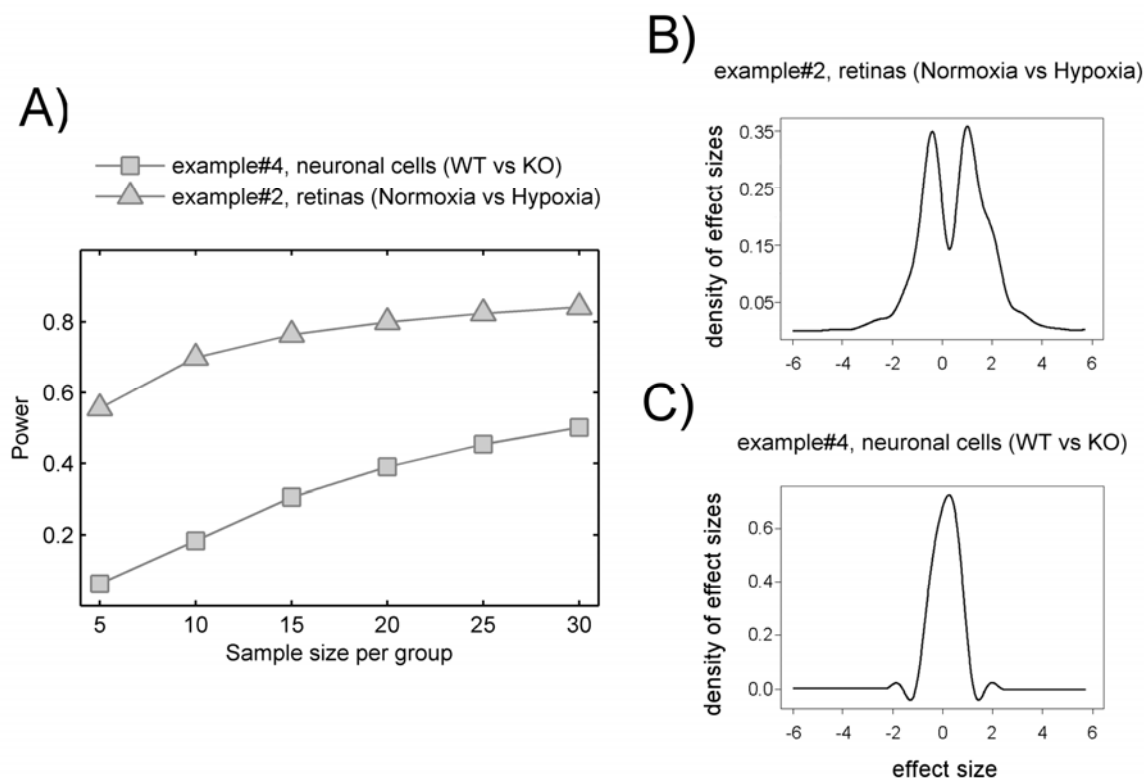
The number of subjects per group (*i.e.*, sample size) is an important aspect to be determined during the experimental design of the study. A low sample size may lead to a lack of precision, which may fail to provide reliable clues about the biological question under investigation. In contrast, an unnecessarily high sample size may lead to a waste of resources for minimal information gain. Thus it is not surprising that funding agencies require power/sample size calculations in their grant proposals. However, choosing the appropriate sample size for high-throughput approaches involving multivariate

data is complicated. According to Hendriks *et al.* [8], there is currently nothing available for *a priori* sample size estimation of highly collinear multivariate data.

Traditional univariate sample size determination is based in the concept of power analysis. Power, or the sensitivity of the test, is defined as  $1-\beta$ , being  $\beta$  the chance of a false negative or Type II error in hypothesis testing. A Type II error is produced when a variable is claimed to not be significant when in fact it is. Therefore, power can be defined as the probability of a statistical test to allow detection of significant differences above a certain confidence. Classical power analysis to determine minimum sample size for a given variable (*i.e.*, metabolite) requires the estimation of population means and standard deviations and effect sizes. However, for high-dimensional data such estimates need to be redefined. Average power is used instead of power, significance level needs to take multiple testing into account and both effect sizes and variances take multiple values. Ferreira *et al.* [20,21] extended the concept of power analysis to high-dimensional data using univariate approaches in combination with multiple testing corrections. They used the entire set of test statistics from microarray pilot data to estimate the effect size distribution, power and minimal sample size. This method have been recently generalized and adapted by van Iterson *et al.* [22] as a part of the BioConductor package SSPA. Recall that using this method, data is treated as a set of multiple univariate responses and correlations between variables are ignored. On the other hand, this method was designed to guide experimental design decisions based on previously acquired pilot data. However, how realistic is to perform a pilot untargeted metabolomics study to determine minimum sample size? In practice, ethical and economical restrictions mainly determine the number of samples (*i.e.*, animals) for each group.

Although we recognize the limitations and controversy of post-hoc power analysis, for illustrative purposes we used SSPA to estimate effect sizes and perform power calculations of our untargeted metabolomics data. Figure 1A show a comparison of example #2 and example #4 estimated power values considering up to 30 samples per group. Considering example #2, a 70% power to detect hypoxia-induced metabolic differences was obtained with 10 retinas per groups. This power was associated with a markedly bimodal density of effects sizes (Figure 1B) indicating significant hypoxia-induced metabolic variation. The density of effects sizes describes the effects observed in the data. Usually, a bimodal density is observed when the studied effect induces significant differences. In contrast, even considering up to 30 samples per group we end-up with low power to detect KO-induced differences in example#4 (Figure 1C). This indicates that KO-induced effects are scarcely reflected in our metabolomics data as represented by its unimodal densities of effects sizes. Accordingly, we would estimate a minimum of ten samples per group ( $n = 10$ ) as the easiest way to boost the statistical power of univariate statistical tests when true metabolic differences exist between two groups (e.g., example #2 comparing normoxia vs. hypoxia). This post-hoc calculation of the statistical power and sample size could be taken as a rough estimation for follow-up validation studies using triple quadrupole (QQQ) instrumentation.

**Figure 1.** (A) Power curves for example #2 ( $\Delta$ ) and example #4 ( $\square$ ) with sample size on the x-axis and estimated power using 5% FDR on the y-axis. Estimated densities of effect sizes for example #4 (B) and example #2 (C) with the standardized effect size on x-axis and estimated densities on the y-axis. Bimodal densities as in example #2 reflect more pronounced effects.



#### 4. Handling Analytical Variation

The first issue that must be resolved before considering any univariate statistical test on LC/MS untargeted metabolomic data is analytical variation. Most common sources of analytical variation in LC-MS experiments are due to sample preparation, instrumental drifts caused by chromatographic columns and MS detectors, and errors caused in data processing [23].

The ideal method to examine analytical variation is to analyze quality control (QC) samples, which will provide robust quality assurance of each detected *m/z*RT feature [24]. To this end, QC samples should be prepared by pooling aliquots of each individual sample and analyze them periodically throughout the sample work list. The performance of the analytical platform for each detected *m/z*RT feature in real samples can be assessed by calculating the relative standard deviation of these features on pooled samples ( $CV_{QC}$ ) according to formula Equation (1), where  $S$  and  $\bar{X}$  are respectively the standard deviation and the mean of each individual feature detected across the QC samples:

$$CV_{QC}(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Likewise, the relative standard deviation of these features on study samples ( $CV_T$ ) can be defined according to formula Equation (2), where  $S$  and  $\bar{X}$  are the standard deviation and mean respectively calculated for each  $mzRT$  feature across all study samples in the dataset.

$$CV_T(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (2)$$

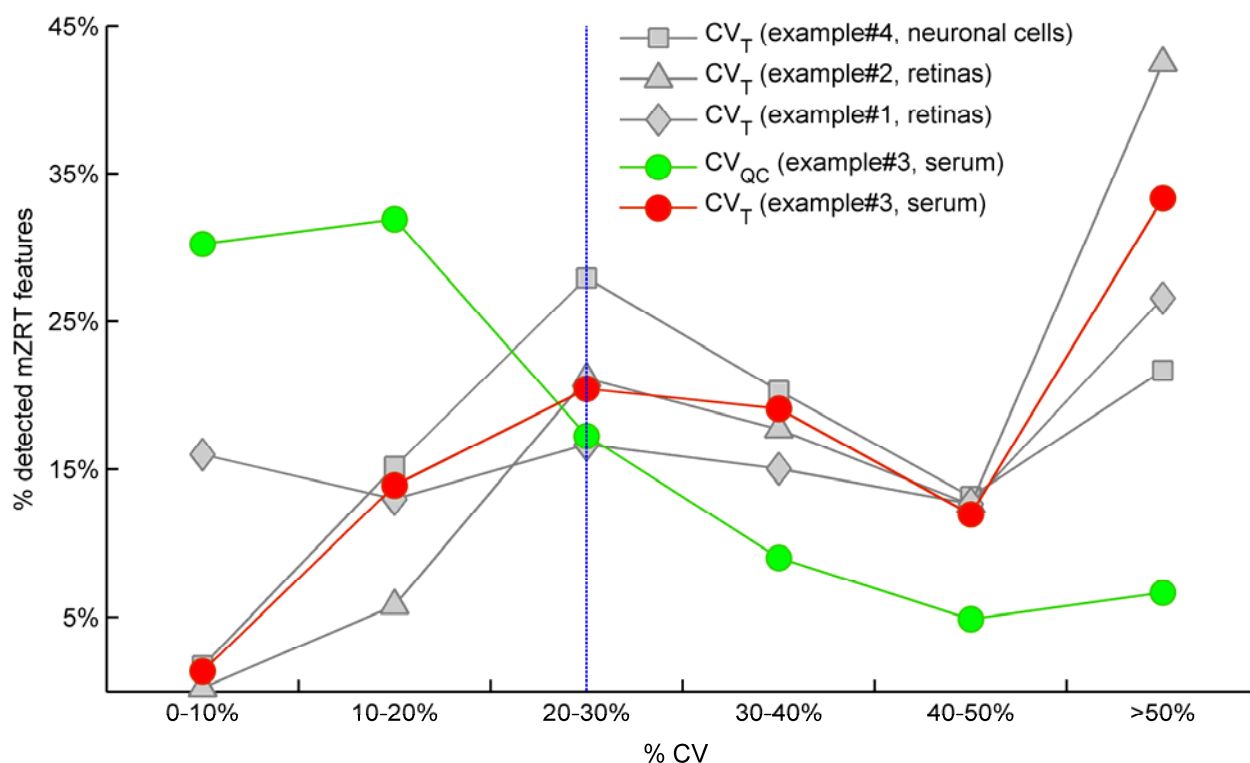
The variation of QC samples around their mean ( $CV_{QC}$ ) is expected to be low since they are replicates of the same pooled samples. Therefore Dunn *et al.* [24] have established a quality criteria by which any peak that presents a  $CV_{QC} > 20\%$  is removed from the dataset and thus ignored in subsequent univariate data analyses. Red and green spots in Figure 2 illustrate the  $CV_T$  and  $CV_{QC}$  frequencies distributions respectively for example #3 in which QC samples were measured. As expected, the highest percentage of  $mzRT$  features detected across QC samples present the lowest variation in terms of  $CV_{QC}$  (green line). Conversely, the highest percentage of the  $mzRT$  features detected across the study samples holds the highest variation in terms of  $CV_T$  (red line). Notice that the intersection of red and green lines is produced around the threshold proposed by Dunn *et al.* [24]. Additionally, other studies performed on cerebrospinal fluid, serum or liver QC extracts also reported around 20% of CV on experimental replicates [25,26].

On the other hand, it is common that the nature of some biological samples and their limited availability complicates the analysis of QC samples. This was the case of mouse retinas in examples #1 and #2. Under these circumstances, there are not consensus standard criteria on how to handle analytical variation. We partially circumvent this issue using the following argument: Provided that the total variation of a metabolite feature ( $CV_T$ ) can be expressed as a sum of biological variation ( $CV_B$ ) and analytical variation ( $CV_A$ ) according to Equation (3), computed  $CV_T$  should be at minimum larger than 20% (the most accepted analytical variation threshold) for a metabolite feature to comprise biological variation.

$$CV_T^2 = CV_A^2 + CV_B^2 \quad (3)$$

Therefore, when QC samples are not available we propose as rule of thumb to discard those features showing  $CV_T < 20\%$  since biological variation is below analytical variation threshold. Figure 2 shows the frequency distribution of  $CV_T$  for working examples #1,2 and #4 where QC samples were not available. According to our criteria, those  $mzRT$  features to the left of the threshold will hold more analytical than biological variation and should be conveniently removed from further statistical analysis. This surely results in a too broad criterion since it assumes that the analytical variation of all metabolites is similar, which is of course not accurate given that instrumental drifts do not affect all metabolites evenly. It should be beard in mind, however, that tightly regulated metabolites presenting low variation such as glucose will likely be missed according to a 20%  $CV_T$  cut-off criterion. Of mention, example #2 and example #4 show the higher and lower percentage of  $mzRT$  features with more than 50%  $CV_T$  respectively. Therefore, there is more intrinsic variation in example #2 than in example#4. Whether such variation relates to the phenomena under study remain to be ascertained using hypothesis testing.

**Figure 2.** Comparison for our four working examples of the mzRT relative standard deviation (CV) frequency distributions calculated either across all the samples ( $CV_T$ ) or across QC samples ( $CV_{QC}$ ). Grey spots represent  $CV_T$  for examples #1( $\diamond$ ), #2 ( $\Delta$ ) and #4 ( $\square$ ) respectively. Green and red circles represent  $CV_{QC}$  and  $CV_T$  respectively for example #3. Blue line represents 20%  $CV_T$  cut-off threshold established when QC samples are not available.



## 5. Hypothesis Testing

Untargeted metabolomics studies focused in this paper are aimed at the discovery of those metabolites that are varied between two populations (*i.e.*, KO vs WT in examples #1 and 4 or treated vs untreated in example #3). In this sort of studies, random sample data from the populations to be compared are obtained in form of mzRT features dataset. Then, we calculate a statistic value (usually *mean* or *median*) and use statistical inference to determine whether the observed differences in the median or mean of the two populations are due to the phenomena under study or to randomness. Statistical inference is the process of drawing statements or conclusions about a populations based on sample data in a way that the risk of error of such conclusions is specified. These conclusions are based on probabilities arisen from evidences given by sample data [27].

To characterize those varied mzRT features, data sets are usually specified via hypothesis testing. Conventionally, we first postulate a null difference between the means/median of metabolic features detected in the populations under study by setting a *null hypothesis* ( $H_0$ ). Then, we specify the probability threshold for this null hypothesis to be rejected when in fact it is true. This threshold of probability called  $\alpha$  is frequently set-up at 5% and it can be thought as the probability of a false positive result or *Type I error*. Then, we use hypothesis testing to calculate the probability (*p-value*) of null

hypothesis rejection. Whenever this p-value is bellow to this pre-defined threshold of probability ( $\alpha$ ), we reject the null hypothesis. On the other hand, when calculated p-values are larger than  $\alpha$  we do not have enough evidence to reject this hypothesis and we fail to reject it. Note that null hypothesis can never be proven, instead null hypothesis is either rejected or failed to reject. Conceptually, the failure to reject the null hypothesis (failure to find difference between the means) does not directly translate in to accept or prove it (showing that there is no difference in reality).

A wide variety of univariate statistical tests to compare mean or medians are available. For a non-statistician it can be daunting to figure out which one is most appropriate to implement with an untargeted metabolomic design and dataset. Helpful guidelines in basic statistics books can be consulted [27,28]. As summarized in Table 2, two important considerations should be taken in to account when deciding for a particular test. First one is the experimental design and second one data distribution.

**Table 2.** Best suited statistical tests for datasets following normal distribution or far from the normal curve according to their experimental design.

| Experimental design                    | Normal distribution                    | Far from normal-curve |
|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
|                                        | Compare Means                          | Compare Medians       |
| Compare two unpaired groups            | Unpaired t-test                        | Mann-Whitney          |
| Compare two paired groups              | Paired t-test                          | Wilcoxon signed-rank  |
| Compare more than two unmatched groups | One-way ANOVA with multiple comparison | Kruskal-Wallis        |
| Compare more than two matched groups   | Repeated-measures ANOVA                | Friedman              |

Experimental design will depend on experimental conditions considered when the metabolomics study is designed. Once the experimental design is fixed, population distribution determines the type of the test. Depending on this distribution, there are essentially two families of tests: parametric and non-parametric. Parametric tests are based on the assumption that data are sampled from a Gaussian or normal distribution. Tests that do not make assumptions about the population distribution are referred as to non-parametric tests. Selection of parametric or non-parametric tests is not as clear-cut as might be a priori though. Next section deals with the calculations necessary to guide such decision and exemplifies these calculations with our four working examples.

## 6. Deciding between Parametric or Non-Parametric Tests

### 6.1. Normality, Homogeneity of Variances and Independence Assumptions

Deciding between parametric and non-parametric tests should be based on three assumptions that should be checked: normality, homogeneity of variances (*i.e.*, homocedasticity) and independence. Nevertheless, some of these assumptions rely on very theoretical mathematical constructs hardly ever met by real-life datasets obtained from metabolomics experiments.

Normality is assumed in parametric statistical tests such as t-test or ANOVA. Normal distributed populations are those presenting classical bell-shape curves to illustrate their probability density function. The frequency distribution of a normal population is a symmetric histogram with most of the

frequency counts bunched in the middle and equally likely positive and negative deviations from this central value. The frequencies of these deviations fall off quickly as we move further away from this central point corresponding to the mean. Data sampled from normal populations can be fully characterized by just two parameters: the mean ( $\mu$ ) and the standard deviation ( $\sigma$ ). Normality assumption can be evaluated either statistically or graphically. We propose two tests to statistically evaluate normality: Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov, the former better behaved in the case of small samples sizes (*i.e.*,  $N < 50$ ) [27]. It is worth recalling that the term normal just applies to the entire population and not to the sample data. Hence, none of these tests would answer whether our dataset is normal or not. Their derived p-values must be interpreted as the probability of the data to be sampled from a normal distribution. On the other hand, testing normality is a matter of paradox: for small samples sizes normality tests lack from power to detect non-normal distributions and as sample size increases normality becomes less troublesome thanks to the Central Limit Theorem. Since parametric tests are robust again mild violations of normality (and equality of variances as well), the practice of preliminary testing these two assumptions has been regarded as setting out in a rowing boat in order to test whether it is safe to launch an ocean liner [29]. Additionally, normality tests can be complemented with descriptive statistics such as Skewness and Kurtosis. On the other hand, graphical methods such as histograms, probability plots or Q-Q plots might result also helpful as tools to evaluate normality. Their use, however, is rather limited at exploratory stage of LC-MS untargeted metabolomic data since it is unfeasible to examine each one of these plots for each m/zRT feature detected.

Another of the assumptions of a parametric test is that the within-group variances of the groups are all the same (exhibit homoscedasticity or homogeneity of variances). If the variances are different from each other (exhibit heteroscedasticity), the probability of obtaining a "significant" result even though the null hypothesis is true may be greater than the desired alpha level. There are both graphical and statistical methods for evaluating homoscedasticity. The graphical method is the so-called boxplot but again, its use is rather limited because the impossibility to evaluate each one of them separately. The statistical methods are Levene's and Bartlett tests, the former the less sensitive to departures from normality. In both cases, the null hypothesis states that the group variances are equal. Resulting p-value  $< 0.05$  indicate that the obtained differences in sample variances are unlikely to have occurred based on random sampling. Thus, the null hypothesis of equal variances is rejected and it is concluded that there is a difference between the population variances.

The third assumption refers to independence. Two events are independent when the occurrence of one event makes it neither more nor less probable that the other occurs. In our metabolomic context, the knowledge of the value of one sample entering the study provides no clue about the value of another sample to be drawn.

## *6.2. Parametric and Non-Parametric Tests. Does It Really Matters in LC-MS Untargeted Metabolomics Data?*

Overall, the strength of violation of the three assumptions will determine the application of a parametric or non-parametric test. It should be noted that parametric tests are more powerful than non-parametric tests, *i.e.*, the use of a non-parametric test might miss a statistically significant

difference that a parametric test would find. However, when dealing with non-normal populations, unequal variances, and unequal small sample sizes, a non-parametric test would perform better. This is the worst-case scenario for a parametric test to be non-robust. Although we recognize main weakness of normality testing, by way of example we have calculated the percentage of features that meet normality and homocedasticity assumptions in our four working examples (**Table 3**)

**Table 3.** mzRT features percentages in which normality, homocedasticity or both assumptions are met.  $H_0$  (Shapiro-Wilk's test)= Data are sampled from a Gaussian distribution.  $H_0$  (Levene's test)=Variances are equal. Percentages represent those features in which there were not enough evidences to reject  $H_0$  at conventional  $\alpha=0.05$  relative to the total number of features retained after handling analytical variation.

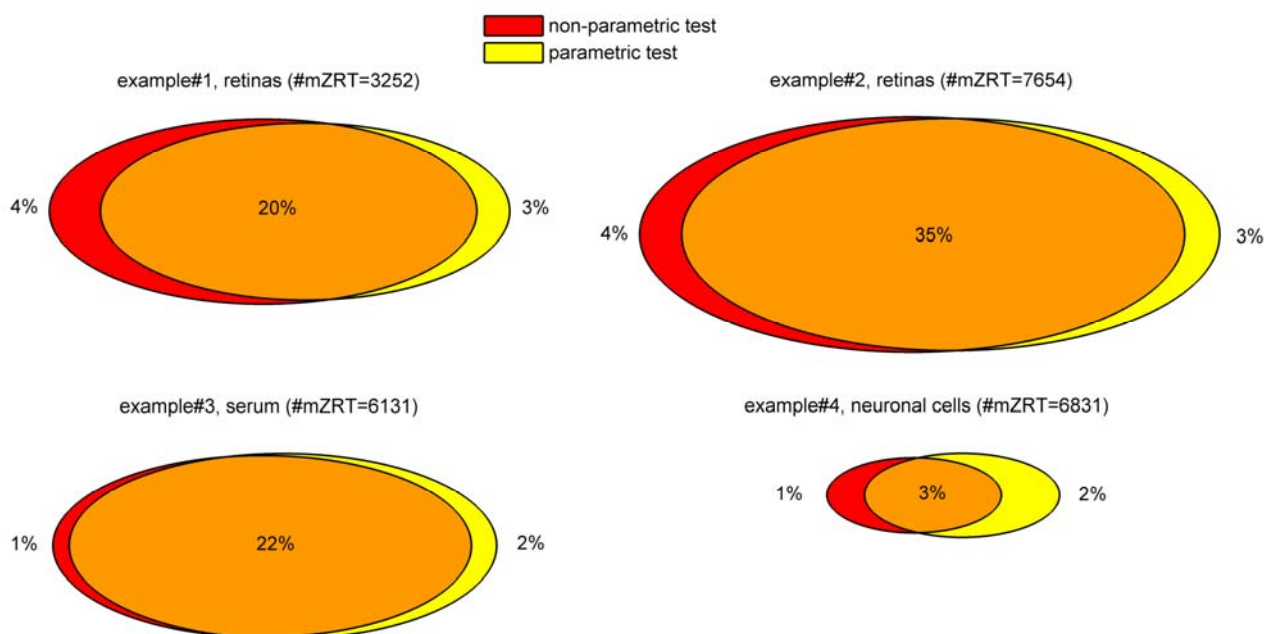
|                             | # mzRT     | Groups    | Normality<br>(Shapiro-Wilk's test) | Homocedasticity<br>(Levene's test) | Normality &<br>Homocedasticity |
|-----------------------------|------------|-----------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Example<br>(Retinas)        | #1<br>3252 | KO        | 66%                                | 93%                                | 60%                            |
|                             |            | WT        | 60%                                |                                    | 54%                            |
| Example<br>(Retinas)        | #2<br>7654 | Normoxia  | 65%                                | 77%                                | 48%                            |
|                             |            | Hypoxia   | 79%                                |                                    | 60%                            |
| Example<br>(Serum)          | #3<br>6131 | Untreated | 85%                                | 90%                                | 76%                            |
|                             |            | Treated   | 88%                                |                                    | 78%                            |
| Example<br>(Neuronal cells) | #4<br>6831 | KO        | 72%                                | 91%                                | 64%                            |
|                             |            | WT        | 82%                                |                                    | 73%                            |

According to Table 3 and considering the four examples on average, 65% of detected features meet normality and equality of variances assumptions. Therefore the use of a parametric test would be acceptable in 65% of the cases. Using a parametric test on the entire dataset would result in lack of robustness and consequent inaccurate p-values for the remaining 35% of features that do not meet parametric test assumptions. Alternatively, considering the use of a non-parametric would turn in loss of statistical power for those 65% of features. Alternatively we would transform those non-normally distributed data to normal or near to normal, for example taking logarithms when data come from a lognormal distribution. Nevertheless, data transformation should be handled carefully since it might hamper the interpretation of the results.

To evaluate the consequences of using parametric or non-parametric tests in our datasets, we performed both types of tests and compare their outcomes. The Venn diagrams in Figure 3 show the percentage of features resulting in significantly different means/medians using parametric and non-parametric tests for the four working examples. Both tests share most of the significantly varying features and just a minor percentage of the total were specifically detected using either parametric or non-parametric tests. In general terms, analysis on the four working examples show a residual discrepancy between parametric or non-parametric test in terms of their outlined significant features. Although from these results we can not extrapolate a general methodology to choose between parametric and non-parametric tests, we recommend testing normality and equality of variances

assumptions prior hypothesis testing to gain deeper insights in population distributions. Then, performing both parametric and non-parametric tests and to compare their outcomes prevailing parametric test outcomes for further calculations. Notice that if parametric and non-parametric tests result in high discrepancy we should check for outliers in our dataset.

**Figure 3.** Venn-Diagrams of the mzRT features showing statistical significance using either parametric or non-parametric tests. Venn-Diagrams' areas are proportional to the percentage of the significantly varied features out of the number of total features retained after handling analytical variation (indicated in parenthesis). The Mann-Whitney test (examples #1, 2 and 4) or Wilcoxon signed rank (example #3) tests were used for non-parametric groups median comparisons. Unpaired (examples #1, 2 and 4) or paired (example #3) t-tests were used for parametric groups mean comparisons.



## 7. Using Multiple Related Tests that Cumulate the p-Value: The Multiple Testing Problem and the False Discovery Rate

### 7.1. The Multiple Testing Problem

In untargeted LC-MS-based metabolomics studies, the number of univariate-paralleled test equates to the number of mzRT features detected. As showed in our working examples, this number usually ranges in the thousands (it largely depends on experimental conditions). As the number of hypotheses tests increases, so as too does the probability of wrongly rejecting a null hypothesis because of random chance and therefore a substantial number of false positives (Type I error) might occur. This accumulation of false positives is termed the multiple testing problem and is a general property of a confidence-based statistical test when applied across multiple features. From a metabolomics research standpoint, Type I errors are particularly undesirable. A substantial amount of work and resources based on MS/MS confirmation experiment can be stimulated in favor of a false finding. In the worst

case, a follow-up validation study on a false positive finding would not replicate the original work with consequent waste of resources and time. In such situations the chance for false positive rates must be carefully handled. Otherwise false findings may seriously affect the outcome of this type of studies [30]. Therefore, retrieved p-values from multiple tests performed in parallel across the detected mzRT features should be corrected. This is to re-calculate those probabilities obtained from a statistical test which is repeated multiple times. We are going to discuss two possible ways of handling multiple testing problem: the Bonferroni and the FDR (False discovery Rate) corrections.

### 7.2. Bonferroni Correction

The family wise error (FWER) is defined as the probability of yielding one or more false positives out of all hypotheses tested. This error remains the most accepted parameter for ascribing significance levels to statistical test [31,32]. In multiple testing, if  $k$  independent comparison are performed FWER is increased at the rate of  $1-(1-\alpha)^k$ ; where  $k$  is the number of hypothesis tests performed and  $\alpha$  is the pre-defined threshold of probability in each individual test. Therefore, to maintain a prescribed FWER (*i.e.* 0.05) in an analysis involving multiple tests, the  $\alpha$  assumed in each independent test must be more stringent than FWER. Bonferroni correction is the standard approach to control FWER by specifying what  $\alpha$  values should be considered in each individual test using the Equation 4:

$$\alpha = \text{FWER}/k \quad (4)$$

Considering our working example #1, 3252 mzRT features were retained after handling analytical variation. According to Bonferroni correction we should set a corrected  $\alpha=0.05/3252=1.054 \times 10^{-5}$  for each individual test to accept an overall FWER of 0.05. Hence, in each individual test, only those features with p-values  $\leq 1.54 \times 10^{-5}$  would be declared to be statistically significant. Assuming this correction, the probability of yielding one or more false positives out of all 3252 hypotheses tested would be  $\text{FWER} = 1-(1-1.54 \times 10^{-5})^{3252} = 0.0488$ . Notice that this probability is much lower than the one obtained if no correction was applied:  $\text{FWER} = 1-(1-0.05)^{4581} \approx 1$ . Bonferroni correction represents a substantial increase of the stringency of our testing leading to just 75 metabolite features out of the initially 3252 prescribing a FWER = 0.05.

Bonferroni correction keep a strict control on making one or more Type I error (false positive) at expenses of Type II errors (false negative). However, false negative findings might cause to overlook metabolites of potential interest and they also affect the outcomes of an untargeted metabolomics study. Other approaches to multiple testing correction such as the FDR (False Discovery Rate) claims for a striking balance between the concern about making too many false discoveries and the concern about missing the discovery of a real difference [33]. Next section deals on FDR correction and its interpretation.

### 7.3. The FDR Multiple Testing Correction

The FDR compute the number of false positives out of the significantly varied metabolic features, *i.e.*, the rate of significant features being false. This is different from the Bonferroni correction which focuses on the control on all falsely rejected hypotheses. In other fields such as microarray data experiments, the Bonferroni correction has been found to be too conservative and its use has led to

many missed features of interest [33]. It has been argued that controlling the rate of allowed false findings using FDR do not represent a serious problem in the context of an exploratory research when further confirmatory studies are undertaken [31-33]. In addition, it has been demonstrated that controlling the FDR at the screening stage of the research carries a benefit for the next research stages [34]. Nevertheless, some authors in the field of metabolomics advocate that although being the most conservative, a Bonferroni analysis is both conceptually easier to understand and numerically easier to implement [35].

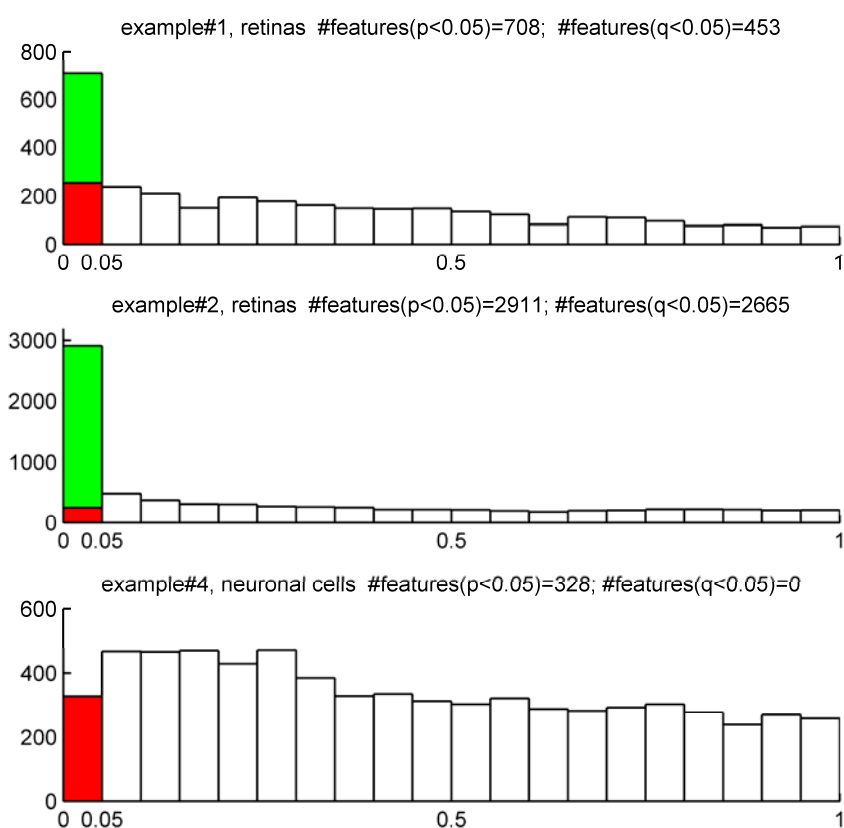
FDR correction calculates a p-corrected value or q-value for each tested metabolic feature. This q-value is a function of the p-values and the distribution of the entire set of p-values from the family of tests being considered [31]. For each feature, its associated q-value can be thought as the expected proportion of false positives considered when such feature is declared to be significantly varied. Hence, a metabolic feature having a q-value of 0.05 implies that 5% of metabolic features showing p-values as small as such feature are false positives. A useful consideration is that a p-value of 0.05 implies that 5% of all tests will result in false positives and a q-value of 0.05 means that 5% out of the significant tests will result in false positives.

A useful plot to evaluate the proportions of false positives is a frequency histogram illustrating the distribution of p-values obtained from paralleled tests across all mzRT features in a dataset. Figure 4 illustrates such histograms for examples #1, #2 and #4. Those mzRT features with significant changes in their relative abundance will show small p-values and therefore the histogram will be skewed towards 0 (examples #1 and 2). On the contrary, metabolic features showing no change in their relative abundances will show a uniform random flattened frequency distribution (example #4). The green bar represents those metabolic features declared to be significant in the t-test binary group comparison for each example ( $p < 0.05$ ). The actual FDR calculated proportion of such features resulting in false positives correspond to the red bar (q-values  $> 0.05$ ).

According to Figure 4, t-test comparison of KO and WT groups in example#1 lead to 708 significantly changed metabolic features out of 3252. By setting our  $\alpha$  threshold to 5% we accepted 163 features to be false positives. This represents 23% out of the 708 features significantly varied. Notice that after FDR correction we obtained 453 mzRT features with q-values below 5% of false positives acceptance threshold. This means that 5% out of this 453 mzRT features (*i.e.*, 23) are expected to be false positives. An acceptance of 5% chance of false positives results in a better situation than the one derived if no correction was applied (meaning 23% chance of false positives). Recall that in this same example, Bonferroni correction lead to consider just 75 features with an adjusted threshold  $p\text{-value} < 1.54 \times 10^{-5}$ . Bonferroni provides the strongest control of the false positives and therefore a high confidence in the selected metabolic features. However, an important advantage of FDR approach is that it allows the researcher to select the error rate that they would assume in their subsequent studies. On the other hand, Figure 4 show that a t-test comparison of WT and KO groups on example#4 outlined 328 features all of them resulting in false positives after FDR correction. This indicates that all this significant outcomes derived from chance and no real effect was underlying on this example. Accordingly if no correction for multiple testing were considered we would have done subsequent MS/MS identification experiments on features that represent false positives. This would have been a pointless task with consequent waste of time and resources. To avoid situations like this, we would recommend correcting for multiple testing when dealing with multiple univariate analysis of

untargeted LC-MS datasets. Then, focus on those metabolites with lower FDR derived q-values for further MS/MS identification experiments. In addition, we would like to comment that whenever a follow-up targeted validation study was going to be attempted, we would recommend considering those metabolites showing statistical significance after strict Bonferroni correction.

**Figure 4.** Frequency histogram showing the distribution of p-values typically expected from t-tests binary groups' comparison in examples #1, 2 and 4. Green bar represent the total number of features declared to be significant assuming 5% false positives in a t-test comparison of the two groups. Red bar represent the FDR- estimated number of features being considered false positives out of the features declared significant in the t-test. The number of total significant features retained after FDR correction ( $q < 0.05$ ) is also indicated.



## 8. The Fold Change Criteria

A common practice to identify mzRT features of relevance within a dataset is to rank these features according to their fold change (FC). FC can be thought of as the magnitude of difference between the two populations under study. For each mzRT feature, a FC value is computed according to equation 5 in which  $\bar{X}$  represents the average raw intensities across “case” group and  $\bar{Y}$  represents the average raw intensities across “control” group. Whenever the raw intensities of the “control” group are larger than in the “case” group, this ratio should be inverted and sign should be conveniently changed to indicate a decrease of the case group relative to the control. Of mention, in paired-data designs, fold change should be calculated as the average of each individual fold change across all sample pairs.

$$FC_{mZRT} = \frac{\bar{X}}{\bar{Y}}, \bar{X} > \bar{Y}; FC_{mZRT} = -\frac{\bar{Y}}{\bar{X}} \quad \bar{X} < \bar{Y} \quad (5)$$

In formal statistical terms, a mZRT feature is claim to be varied among two conditions when its relative intensity values change systematically between these two condition regardless on how small this change is. However, significance does not contain information about the magnitude of this change. For a metabolomics standpoint, a metabolic feature is considered to be relevant only when this change result in a worthwhile amount. Hence, significantly varied mZRT are ranked according to their FC value. Subsequent MS/MS chemical structural identification experiments are performed on those metabolic features resulting above a minimum FC cutoff value. It has been demonstrated that a 2-FC cutoff for metabolomics studies using human plasma or CSF minimizes the effects of biological variation inherent in a healthy control group [26]. However, this cutoff value is set rather arbitrarily and based on similar FC cutoff values routinely applied in gene chip experiments.

## 9. Univariate LC-MS Untargeted Analysis Workflow

The typical univariate data analysis flow diagram for untargeted LC-MS metabolomics experiments is summarized in Figure 5. The ultimate goal is to constraint the number of initially detected mZRT features to an amenable number for further MS/MS identification experiments. Only those mZRT features showing both statistically significant changes with delimited chance for false positives in their relative intensity and a minimum FC are going to be retained. Steps 1-5 are below summarized:

STEP1: Use quality control check to get rid-out of those mZRT features that do not contain biological information. Ideally QC samples should be measured. Then, compute  $CV_{QC}$  and proceed to retain only those metabolic features presenting  $CV_{QC} < 20\%$ . If QC samples are not available, an alternative procedure is to compute  $CV_T$  and retain those mZRT with  $CV_T > 20\%$ .

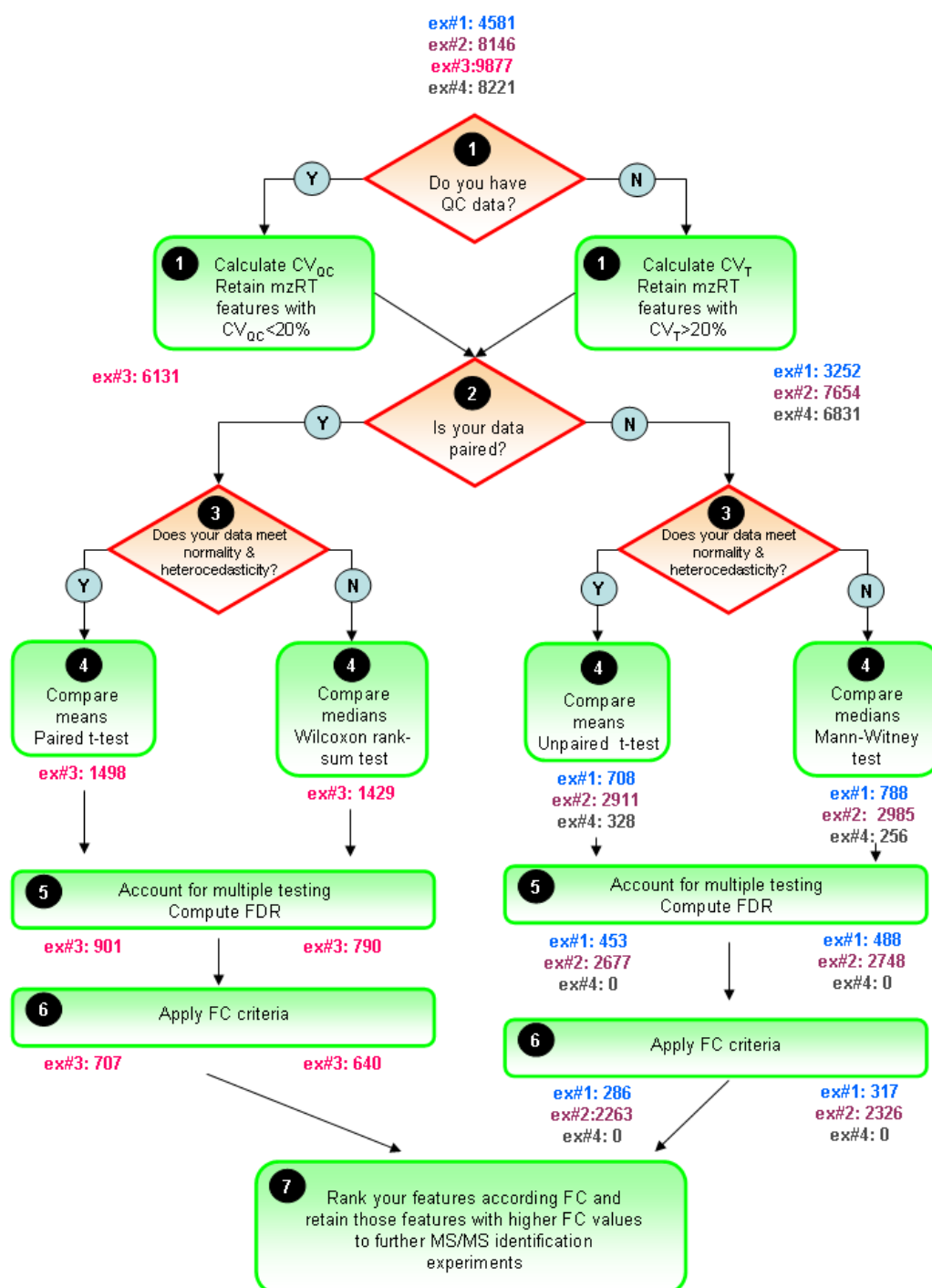
STEP2: Mind the experimental design to select the best suited statistical test to apply. Check whether your data is paired or not, *i.e.*, whether your groups are related such as in our example#3 (individuals prior to treatment are uniquely matched to the same individual after the treatment). Afterwards, check normality and equality of variances assumptions. Be aware that performances of the normality tests might be hampered by low samples sizes dataset commonly found in LC-MS untargeted metabolomics studies. Despite this, working on such tests might be useful to gain some insights in to the data distribution.

STEP 3: Compare mean or medians of your dataset performing statistical inference and trying to apply statistical tests thoughtfully instead of mechanically. Try to be aware of the tests weaknesses when applying it. Once we have taken the decision on whether using parametric or non-parametric tests, it is important to stick on the same approach through the rest of the data analysis procedure. This is to plot our results in the form of medians instead of means whenever we choose to use a non-parametric statistical test.

STEP4: Account for multiple testing. Report the number of positive false findings after FDR correction. Plot histograms of p-values frequency distribution to get an overview of whether a dataset contains significant differences. Decide a FDR threshold to accept. A general consensus is to accept

5% of FDR level but there is nothing special about this value and each researcher might justify their assumed FDR value, which should be fixed before data is collected.

**Figure 5.** General flow chart for univariate data analysis of untargeted LC-MS-based metabolomics data. Different colors for the four working examples indicate the initial number and the retained number of mzRT features in each step. FDR and FC value are fixed at 5% level 1.5-cutoff values respectively.



STEP5: Compute mean or median FC depending on the test used to perform statistical inference. Fix a cutoff FC value. From our in-house experience we recommend an arbitrary 1.5-FC cutoff value

meaning a minimum of 50% of variation in the two groups compared. Rank your significant list of features according the FC value. Retain those significant features with higher FC values for MS/MS experiments and follow-up validation studies.

Following steps 1-5 described above, those metabolites identified using MS/MS experiments for example #2 are summarized in Table 4. Of mention all metabolites identified meet the statistical criteria described above regardless of using either parametric or non-parametric tests. Notice the small number of properly identified metabolites as compared to the high number of features surviving statistical criteria. It is important to mention that in the best optimistic case the number of metabolite identifications showing MS/MS confirmation use to be in the tens after a formal untargeted metabolomics experiment. Conversely, in case of putative identifications based on exact masses, the number of metabolites reported is much higher. However, recall that such metabolites are just putatively identified. Considering that replication experiments are necessary to undeniably ascertain the role of the metabolites found to be relevant in the untargeted study, a strict identification of the metabolites is essential. In this sense, our work-flow data analysis represents the first step for a successful identification of those metabolites.

**Table 4.** Statistics summary of those metabolites identified using MS/MS experiments in working example #2. Unpaired t-test and Mann-Whitney test were used for parametric and non-parametric hypoxic and normoxic retinas comparison respectively. Correction for multiple testing was performed assuming 5% FDR.

|                                                | Parametric Test        |                        |           | Non-parametric         |                        |                |
|------------------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------|------------------------|------------------------|----------------|
|                                                | p-value                | q- value               | FC (mean) | p-value                | q-value                | FC<br>(median) |
| <b>Hexadecenoylcarnitine</b>                   | $3.31 \times 10^{-13}$ | $1.05 \times 10^{-10}$ | 5.0       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>4.9</b>     |
| <b>Acetylcarnitine-</b>                        |                        |                        |           |                        |                        |                |
| <b>derivative</b>                              | $1.10 \times 10^{-13}$ | $5.02 \times 10^{-11}$ | 7.2       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>7.5</b>     |
| <b>Tetradecenoylcarnitine</b>                  | $1.29 \times 10^{-13}$ | $5.29 \times 10^{-11}$ | 8.8       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>8.8</b>     |
| <b>Decanoylcarnitine</b>                       | $7.79 \times 10^{-11}$ | $1.03 \times 10^{-08}$ | 5.7       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>5.6</b>     |
| <b>Laurylcarnitine</b>                         | $8.48 \times 10^{-11}$ | $1.06 \times 10^{-08}$ | 9.2       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>8.7</b>     |
| <b>7-ketocholesterol</b>                       | $4.00 \times 10^{-09}$ | $1.92 \times 10^{-07}$ | 3.1       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>3.3</b>     |
| <b>5,6<math>\beta</math>-epoxy-cholesterol</b> | $2.12 \times 10^{-08}$ | $6.61 \times 10^{-07}$ | 5.1       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>7.0</b>     |
| <b>7<math>\alpha</math>-hydroxycholesterol</b> | $3.88 \times 10^{-08}$ | $1.07 \times 10^{-06}$ | 4.1       | $2.49 \times 10^{-05}$ | $3.18 \times 10^{-04}$ | <b>4.5</b>     |
| <b>All-trans-Retinal</b>                       | $1.26 \times 10^{-05}$ | $9.24 \times 10^{-05}$ | -3.0      | $4.01 \times 10^{-05}$ | $3.98 \times 10^{-04}$ | <b>-2.8</b>    |
| <b>Octanoylcarnitine</b>                       | $9.21 \times 10^{-05}$ | $4.28 \times 10^{-04}$ | 5.5       | $5.09 \times 10^{-03}$ | $1.14 \times 10^{-02}$ | <b>17.2</b>    |

## Acknowledgments

CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM) is an initiative of Instituto de Investigación Carlos III (ISCIII, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness). We gratefully acknowledge financial support from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Grant SAF 2011-30578 (to OY).

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References and Notes

1. Patti, G.J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2012**, *13*, 263–269.
2. Smith, C.A.; Want, E.J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 779–787.
3. Katajamaa, M.; Oresic, M. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics* **2005**, *6*, 179.
4. Lommen, A. MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3079–3086.
5. Kuhl, C.; Tautenhahn, R.; Böttcher, C.; Larson, T.R.; Neumann, S. CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. *Anal. Chem.* **2011**, *84*, 283–289.
6. Alonso, A.; Julia, A.; Beltran, A.; Vinaixa, M.; Diaz, M.; Ibanez, L.; Correig, X.; Marsal, S. AStream: an R package for annotating LC/MS metabolomic data. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1339–1340.
7. Kristian Hovde, L. Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *Trac-Trend. Anal. Chem.* **2011**, *30*, 827–841.
8. Hendriks, M.M.W.B.; Eeuwijk, F.A.v.; Jellema, R.H.; Westerhuis, J.A.; Reijmers, T.H.; Hoefsloot, H.C.J.; Smilde, A.K. Data-processing strategies for metabolomics studies. *Trac-Trend. Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1685–1698.
9. Kalogeropoulou, A. Pre-processing and analysis of high-dimensional plant metabolomics data. Master Thesis, University of East Anglia, Norwich, UK, 2011.
10. Goodacre, R.; Broadhurst, D.; Smilde, A.; Kristal, B.; Baker, J.; Beger, R.; Bessant, C.; Connor, S.; Capuani, G.; Craig, A.; et al. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics* **2007**, *3*, 231–241.
11. Karp, N.A.; Griffin, J.L.; Lilley, K.S. Application of partial least squares discriminant analysis to two-dimensional difference gel studies in expression proteomics. *Proteomics* **2005**, *5*, 81–90.
12. Kenny, L.C.; Broadhurst, D.I.; Dunn, W.; Brown, M.; North, R.A.; McCowan, L.; Roberts, C.; Cooper, G.J.S.; Kell, D.B.; Baker, P.N.; et al. Robust Early Pregnancy Prediction of Later Preeclampsia Using Metabolomic Biomarkers. *Hypertension* **2010**, *56*, 741–749.
13. R Development Core Team. 2009 R: A language and environment for statistical computing. Available online: <http://www.R-project.org>, accessed on 17 October 2012.
14. Patti, G.J.; Yanes, O.; Shriver, L.P.; Courade, J.P.; Tautenhahn, R.; Manchester, M.; Siuzdak, G. Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 232–234.

15. Yanes, O.; Clark, J.; Wong, D.M.; Patti, G.J.; Sanchez-Ruiz, A.; Benton, H.P.; Trauger, S.A.; Despons, C.; Ding, S.; Siuzdak, G. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 411–417.
16. Marchetti, V.; Yanes, O.; Aguilar, E.; Wang, M.; Friedlander, D.; Moreno, S.; Storm, K.; Zhan, M.; Naccache, S.; Nemerow, G.; et al. Differential macrophage polarization promotes tissue remodeling and repair in a model of ischemic retinopathy. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 76.
17. Dorrell, M.I.; Aguilar, E.; Jacobson, R.; Yanes, O.; Gariano, R.; Heckenlively, J.; Banin, E.; Ramirez, G.A.; Gasmi, M.; Bird, A.; et al. Antioxidant or neurotrophic factor treatment preserves function in a mouse model of neovascularization-associated oxidative stress. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 611–623.
18. Vinaixa, M.; Rodriguez, M.A.; Samino, S.; Díaz, M.; Beltran, A.; Mallol, R.; Bladé, C.; Ibañez, L.; Correig, X.; Yanes, O. Metabolomics Reveals Reduction of Metabolic Oxidation in Women with Polycystic Ovary Syndrome after Pioglitazone-Flutamide-Metformin Polytherapy. *PloS One* **2011**, *6*, e29052.
19. Grainger, D.J. Megavariate Statistics meets High Data-density Analytical Methods: The Future of Medical Diagnostics? *IRTL Rev. I* **2003**, 1–6.
20. Ferreira, J.A.; Zwinderman, A. Approximate sample size calculations with microarray data: an illustration. *Stat Appl. Genet. Mol. Biol.* **2006**, *5*, Article25.
21. Ferreira, J.A.; Zwinderman, A.H. Approximate Power and Sample Size Calculations with the Benjamini-Hochberg Method. *Int. J. Biostat.* **2006**, *2*.
22. van Iterson, M.; 't Hoen, P.; Pedotti, P.; Hooiveld, G.; den Dunnen, J.; van Ommen, G.; Boer, J.; Menezes, R. Relative power and sample size analysis on gene expression profiling data. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 439.
23. van der Kloet, F.M.; Bobeldijk, I.; Verheij, E.R.; Jellema, R.H. Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. *J. Proteome. Res.* **2009**, *8*, 5132–5141.
24. Dunn, W.B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J.D.; Halsall, A.; Haselden, J.N.; et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Prot.* **2011**, *6*, 1060–1083.
25. Masson, P.; Alves, A.C.; Ebbels, T.M.D.; Nicholson, J.K.; Want, E.J. Optimization and Evaluation of Metabolite Extraction Protocols for Untargeted Metabolic Profiling of Liver Samples by UPLC-MS. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7779–7786.
26. Crews, B.; Wikoff, W.R.; Patti, G.J.; Woo, H.-K.; Kalisiak, E.; Heideker, J.; Siuzdak, G. Variability Analysis of Human Plasma and Cerebral Spinal Fluid Reveals Statistical Significance of Changes in Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8538–8544.
27. Riffenburgh, R.H. *Statistics in Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006.
28. Motulsky, H. *Intuitive Biostatistics*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1995.
29. Box, G.E.P. Non-Normality and Tests on Variances. *Biometrika* **1953**, *40*, 318–335.
30. Ioannidis, J.P.A. Why Most Published Research Findings Are False. *PLoS Med.* **2005**, *2*, e124.
31. Storey, J.D.; Tibshirani, R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9440–9445.

32. Storey, J.D. A direct approach to false discovery rates. *J. Roy. Stat. Soc. B Met.* **2002**, *64*, 479–498.
33. Benjamini, Y.; Drai, D.; Elmer, G.; Kafkafi, N.; Golani, I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain. Res.* **2001**, *125*, 279–284.
34. Benjamini, Y.; Yekutieli, D. Quantitative Trait Loci Analysis Using the False Discovery Rate. *Genetics* **2005**, *171*, 783–790.
35. Broadhurst, D.; Kell, D. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* **2006**, *2*, 171–196.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

