

Determinants de la unió a glicogen i translocació de la glicogen sintasa

Carlos Martínez Pons

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) 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) 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) 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.



FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

DETERMINANTS DE LA UNIÓ A GLICOGEN I TRANSLOCACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA

CARLOS MARTÍNEZ PONS
Barcelona, setembre de 2011

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de doctorat de Biotecnologia

Bienni 2004/2006

**DETERMINANTS DE LA UNIÓ A GLICOGEN I TRANSLOCACIÓ
DE LA GLICOGEN SINTASA**

Memòria presentada per **Carlos Martínez Pons** per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

El Director de la tesi

L'interessat

Joan J. Guinovart Cirera

Carlos Martínez Pons

CARLOS MARTÍNEZ PONS
Barcelona, setembre de 2011

Infantile love follows the principle: 'I love because I am loved.' Mature love follows the principle: 'I am loved because I love.' Immature love says: 'I love you because I need you.' Mature love says: 'I need you because I love you.'

Erich Fromm – The Art of Loving

The history of science is replete with instances of faith in reason and visions of truth. Copernicus, Kepler, Galileo, and Newton were all imbued with an unshakable faith in reason. For this Bruno was burned at the stake and Spinoza suffered excommunication. At every step from the conception of a rational vision to the formulation of a theory, *faith* is necessary: faith in the vision as a rationally valid aim to pursue, faith in the hypothesis as a likely and plausible proposition, and faith in the final theory, at least until a general consensus about its validity has been reached. This faith is rooted in one's own experience, in the confidence in one's power of thought, observation, and judgement. While irrational faith is the acceptance of something as true only *because* an authority or the majority say so, rational faith is rooted in an independent conviction based upon one's own productive observing and thinking, *in spite* of the majority's opinion.

Erich Fromm – The Art of Loving

- *Manolo, quant val sa Pantera Rosa?*
- *Lo mateix que es Bony.*

Isaac i Manolo. Bar Can Manolo.

A mon pare i mo mare

Haver portat a terme aquesta tesi hagués estat impossible sense l'ajuda de tota la gent amb qui he compartit aquesta experiència. Ells m'han donat suport científic i emocional. Hem compartit infinites hores al laboratori i hem aconseguit que sigui com una segona llar. Per això vull recordar-los en aquestes pàgines i agrair-los aquests anys plegats.

Primer de tot vull agrair al Joan Guinovart, el director d'aquesta tesi, l'oportunitat brindada, la confiança dipositada en mi, el seu suport continu i la seva guia durant aquesta tesi. També estic molt agraït al Jorge i al Joaquim pels seus consells i per tenir la porta del despatx oberta en tot moment. Moltes gràcies a la Mar per fer funcionar aquest laboratori .

De la gent del laboratori he d'agrair especialment al Daniel tot el que em va ensenyar. Ell va ser el meu mentor a les trinxeres de la recerca que són les poiates. Gràcies a l'Adelaida per la feina conjunta que va fructificar en l'article que tenim en comú. Merci al Carlos, el Jordi Vallès i el Jordi Lanuza per les hores compartides, pels riures, les converses i les delicatessens cuinades. Gràcies al Jordi Duran per ser un bon veí de poiata, a la Dèlia pel seu bon humor, a l'Isa per portar pastissos i tot tipus de material d'engreixament, al Felipe pel seu esperit crític, a la Flor per les converses i la Mireia per proveir-me de glicogenina. Una forta abraçada també als xilens que van compartir laboratori amb mi i que ara estan a l'altra banda del món, el Fabián i el Carlos. Agrair l'esforç que han fet els tècnics durant la meva tesi per tal que el laboratori funcionés i per la seva ajuda: Anna, Emma, Manu, Mari Carmen, Lydie i Ester. També remarcar el molt que ens facilita la feina tenir una persona fent el treball administratiu. Gràcies a la Carol i a la Carme.

He estat encantat de compartir la consecució de la tesi amb altres persones que ho han fet amb mi i que ja es mouen pel món com a doctors: el David, la Susana i la Laura fent post-docs, i l'Óscar ensenyant ciència a nens. Dir-los que ha estat un autèntic luxe tenir-los com a companys de viatge. Desitjar

molta sort als nouvinguts, la Giorgia, el Christopher i l'Enrique. També agrair a antics membres de Sucres a qui he pogut conèixer: Mari Carmen i Cristina. Recordar també a tots els que han passat per aquí i amb qui hem compartit coneixements i somriures: La Núria de la Iglesia i la Marta, el Jacques Borg i l'Stefania.

Una forta abraçada a la Consol, companya des de Química, i amb qui he compartit les penes i alegries del doctorat. Agrair l'alegria del dinar i algun que altre reactiu a la gent de Caelles: Cris, Tessa, Sara i Laura. Moltes Gràcies al Dr. Ignasi Fita i el Dr. Joan Carles Ferrer per la seva ajuda en l'escriptura i publicació de l'article en comú. Mercès també al Dr. Josep Maria Fernández per confiar en les meves habilitats com a educador en els cursos d' "I tu? Jo Bioquímica", les tutories de recerca i els cursets a professors de secundària.

Mil gràcies al Dr. Juan Valcárcel i als membres del seu laboratori, especialment al Joao, per l'ajuda en els experiments amb RNA. També han estat molt importants els diferents serveis dels quals disposa el Parc i l'IRB. Agrair tota l'ajuda que m'han donat des de la plataforma d'Advanced Digital Microscopy (Julien, Lúdia, Ana) i la de proteòmica de l'IRB (Marta, Núria) i del PCB (Lia), així com a la Marta, que s'encarrega pel bon ús del Biacore.

Finalment, tinc molt a agrair a gent que no pertany al món científic o del laboratori, però que han estat cabdals per donar-me l'empenta necessària en els moments més baixos. Gràcies als meus pares, Rosendo i Àgueda, per estimar-me, per ser un exemple de treballadors incansables i per haver-me fet tan fàcil el camí fins aquí. Gràcies als meus avis i la meva germana, Laura, pel seu amor. I gràcies a l'Ane per la vida que tenim en comú.

A tots, estimats, dir-vos que estic en deute en vosaltres per haver-me fet més fàcil arribar fins aquí. Us estaré eternament agraït.

TAULA DE CONTINGUTS

TAULA DE CONTINGUTS

	Pàgina
ABREVIATURES	1
PRESENTACIÓ I OBJECTIUS	7
INTRODUCCIÓ	11
1. El glicogen i el seu metabolisme	13
1.1 Estructura del glicogen	13
1.2 Funció del glicogen	14
1.3 Distribució subcel·lular del glicogen	15
1.4 Glicogen en situacions patològiques	17
1.5 Síntesi del glicogen	18
1.5.1 La internalització de la glucosa	18
1.5.2 Fosforilació de la glucosa	20
1.5.3 De glucosa-6-fosfat a glicogen	20
1.6 Degradació del glicogen	21
1.7 Metabolisme del glicogen hepàtic i muscular	22
1.7.1. Metabolisme del glicogen muscular. Síntesi	23
1.7.2. Metabolisme del glicogen muscular. Degradació	23
1.7.3. Metabolisme del glicogen hepàtic. Síntesi	24
1.7.4. Metabolisme del glicogen hepàtic. Degradació	25
1.8 El gra de glicogen, més que un reservori energètic	26
2. La glicogen sintasa	29
2.1 La GS és una glicosiltransferasa	29
2.2 Isoformes de GS	30
2.3 La glicogen sintasa muscular humana (HMGS)	30
2.3.1 La regulació de l'expressió de l'HMGS	30
2.3.2 La regulació de l'HMGS per fosforilació	31
2.3.3 La regulació de l'HMGS per al·lostèria	32
2.3.4 L'HMGS i la fosforilació del glicogen	33

2.3.5 La degradació de l'HMGS	33
2.3.6 La localització subcel·lular de l'HMGS	34
2.4 L'estructura de la glicogen sintasa	36
2.4.1 La GS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , la primera GS cristal·litzada	36
2.4.2 La GS de <i>Pyrococcus abyssi</i> , la GS d'arquea	37
2.4.3 La GS d' <i>Escherichia coli</i> , la primera GS en conformació tancada	38
2.4.4 El complex de la GS d' <i>Escherichia coli</i> amb maltooligosacàrids, els llocs d'unió a carbohidrats de GS	41
2.4.5 La GS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , la primera estructura de GS eucariota i la regulació al·lostèrica per G6P	43
RESULTATS	45
1. El domini d'unió a glicogen no catalític de la glicogen sintasa de <i>Pyrococcus abyssi</i>	47
1.1 Expressió d'una glicogen sintasa monomèrica de <i>Pyrococcus abyssi</i> funcional	47
1.2 Cristal·lització de la glicogen sintasa monomèrica de <i>Pyrococcus abyssi</i>	48
1.2.1 Centre actiu	49
1.2.2 Lloc d'unió a carbohidrats	50
1.3 Mètode fluorescent per a la mesura de l'activitat glicosiltransferasa	51
1.4 Estudi de la funcionalitat de lloc d'unió a carbohidrats de PaGSmon	53
1.5 Conservació del lloc d'unió a glicogen de PaGS	55
2. El domini d'unió a glicogen no catalític de la glicogen sintasa muscular humana	57
2.1 Purificació de glicogen sintasa muscular humana recombinant	57
2.2 Efecte de les mutacions Y239A i Y242A de l'HMGS sobre les constants cinètiques de l'enzim	58
2.3 Alteració de la localització subcel·lular de l'HMGS amb les mutacions Y239A i Y242A	60
2.4 Disminució de l'afinitat pel glicogen del mutant Y242A de l'HMGS	62
2.5 Disminució de l'afinitat pel glicogen per la mutació Y239A de l'HMGS	64

2.6 La unió a glicogen i el seu efecte sobre la catàlisi de l'HMGS <i>in vivo</i>	66
2.7 L'efecte de la glucosa-6-fosfat i l'estat d'activació de l'HMGS sobre l'afinitat pel glicogen	68
2.8 Modelització del lloc d'unió a glicogen de l'HMGS	70
2.9 Implicació dels residus Asn138, Trp143, Lys231 i Gln237 en la unió a glicogen	72
2.10 Implicació dels residus Asp230, Glu235, Arg246 i His250 en la unió a glicogen	74
3. El domini d'unió a glicogen no catalític de la glicogen sintasa hepàtica humana	77
3.1 Anàlisi per FRAP de la unió entre l'HLGS i el glicogen	77
3.2 Purificació de TAP-HLGS i càlcul de la seva Km pel glicogen	79
3.3 Estudi de les diferències en la seqüència aminoacídica del lloc d'unió de l'HMGS i l'HLGS	81
4. HMGS nuclear: proteïnes interaccionants i unió a ARN	85
4.1 Proteïnes interaccionants amb HMGS nuclear	85
4.2 Col·localització de l'HMGS nuclear, TLS, PSF i p54nrb	87
4.3 Localització subcel·lular de l'HMGS nuclear, TLS, PSF i p54nrb durant l'arrest transcripcional per actinomicina D	89
4.4 Capacitat d'unió <i>in vitro</i> entre ARN i HMGS recombinant purificada	92
4.5 Implicació del residu Trp143 en la translocació nuclear de l'HMGS	94
DISCUSSIÓ	97
CONCLUSIONS	115
MATERIALS I MÈTODES	119
1. Tècniques de Biologia Molecular	121
1.1. Reacció en cadena de la polimerasa	121

1.1.1 Amplificació d'ADN a partir de plasmidis	121
1.1.2 Mutagènesi dirigida	121
1.1.3 Detecció d'ADN	123
1.2 Clonació d'ADN	123
1.2.1 In-Fusion	124
1.2.2 Gateway	124
1.3 Electroforesi d'ADN	125
1.4 Quantificació d'ADN	126
1.5 Generació de cèl·lules competents	127
1.6 Transformació de bacteris	128
1.7 Obtenció de l'ADN plasmídic	128
1.7.1 Miniprep	128
1.7.2 Maxiprep	129
1.8 Seqüenciació de l'ADN	130
1.9 Transfecció de línies cel·lulars	131
1.9.1 Transfecció amb polietilenimina	131
1.9.2 Tranfecció amb lipofectamina	132
2. Cultiu cel·lular de línies estables	132
2.1 Cèl·lules HEK293A	132
2.2 Cèl·lules HeLa	133
2.3 Manteniment de cultius cel·lulars	133
3. Purificació de proteïnes recombinants	134
3.1 Glicogen sintasa monomèrica de <i>Pyrococcus abyssi</i>	134
3.2 Glicogen sintasa muscular humana	135
4. Obtenció del cristall de PaGS monomèrica i determinació de la seva estructura	136
5. Determinació i separació de proteïnes	137

5.1 Concentració proteica	137
5.2 SDS-PAGE	138
5.3 Western blot	139
5.4 Tinció de gels de SDS-PAGE	141
5.4.1 Tinció amb blau de Coomassie	141
5.4.2 Tinció de proteïnes amb nitrat de plata	141
5.5 Espectrometria de masses MALDI-TOF	142
5.6 Obtenció d'un extracte nuclear	142
5.7 Immunoprecipitació	143
6. Determinació d'activitats enzimàtiques	144
6.1 Determinació de l'activitat GS	144
6.2 Determinació de l'activitat glicosiltransferasa per fluorescència	145
7. Determinació de metabòlits	146
7.1 Determinació de la quantitat de glicogen	146
8. Tècniques d'immunofluorescència	147
8.1 Immunofluorescència. Cèl·lules crescudes sobre cobreobjectes	147
9. Microscòpia	149
9.1 Microscòpia confocal	149
9.2 Microscòpia d'epifluorescència	149
10. Tècniques d'avaluació de la unió entre la glicogen sintasa i el glicogen	150
10.1 Cosedimentació amb glicogen	150
10.2 Recuperació de la fluorescència després del fotoblanquejament (FRAP)	151
10.2.1 Introducció al FRAP	151
10.2.2 Protocol de FRAP per a la glicogen sintasa	154

10.3 Biacore	155
10.3.1 Introducció al Biacore	155
10.3.2 Protocol de Biacore per a HMGS	158
 11. Assaig de canvi de mobilitat electroforètica	 162
 12. Anàlisi estadística	 164
 BIBLIOGRAFIA	 165

ABREVIATURES

GSD	<i>Glycogen Storage Disease</i>
AC	Adenilat Ciclasa
ACH	Àcid ciano-4-hidroxicinàmic
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADPG	Difosfat d'adenosina-glucosa
AGL	Enzim desramificant
AMP	Monofosfat d'adenosina
AMPK	Proteïna quinasa depenent d'AMP
APS	Persulfat amònic
ARN	Àcid ribonucleic
AtGS	Glicogen sintasa d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Trifosfat d'adenosina
CBM	Motiu d'unió a carbohidrats
CeGS	Glicogen sintasa de <i>Caenorhabditis elegans</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrat
ddNTP	Trifosfat de dideoxinucleòtid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sulfòxid
DSP	Ditiobis(succimidil)propionat
DTT	Ditiotreitol
EcGS	Glicogen sintasa d' <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Àcid etilendinitriltetracètic
EMSA	Assaig de canvi de mobilitat electroforètica (<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>)
FA	Fosfatasa alcalina
FBS	Sèrum fetal boví
FRAP	Recuperació de fluorescència després del fotoblanqueig (<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>)

G1P	Glucosa-1-fosfat
G6P	Glucosa-6-fosfat
GBD	Domini d'unió a glicogen
GBE1	Enzim ramificant
GFP	Proteïna fluorescent verda
GK	Glucocuinasa
GKRP	Proteïna reguladora de glucocuinasa
GP	Glicogen fosforilasa
GS	Glicogen sintasa
GSK-3	Glicogen sintasa quinasa 3
Gsy2p	Glicogen sintasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2
GT	Glicosiltransferasa
GYG1	Glicogenina
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells 293</i>
HEPES	Àcid 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacini-(1)] etansulfònic
HEPPSO	4-(2-hidroxietil)piperazina-1-(2-hidroxipropà)sulfònic
HK	Hexocuinasa
HLGS	Glicogen sintasa hepàtica humana
HMGS	Glicogen sintasa muscular humana
LB	Medi <i>Luria Bertani</i>
LGS	Glicogen sintasa hepàtica
mARN	ARN missatger
MGS	Glicogen sintasa muscular
MOPS	Àcid 3-N-morfolin propansulfònic
NcGS	Glicogen sintasa de <i>Neurospora crassa</i>
NDPK	Nucleòsid difosfat quinasa
NTP	Trifosfat de nucleòtid
p54nrb	54 kD nuclear RNA-binding protein

PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
PaGS	Glicogen sintasa de <i>Pyrococcus abyssi</i>
PaGSmon	Glicogen sintasa monomèrica de <i>Pyrococcus abyssi</i>
PBS	Solució salina tamponada amb fosfat
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEI	Polietilenimina
PGB	Cos de poliglucosà (<i>Polyglucosan body</i>)
PGM	Fosfoglucomutasa
PhK	Fosforilasa quinasa
Pi	Fosfat inorgànic
PKA	Proteïna quinasa depenent d'AMP cíclic
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
PP1	Proteïna fosfatasa 1
PSF	<i>Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor</i>
PTG	<i>Protein targeting to glycogen</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
S/P	Estreptomicina/penicil·lina
saHMGS	Glicogen sintasa muscular humana superactiva
SDS	Dodecàcil sulfat de sodi
SPR	Ressonància superficial de plasmó (<i>Surface plasmon resonance</i>)
TAP	Purificació per afinitat en tàndem (<i>Tandem affinity purification</i>)
tARN	ARN de transferència
TBE	<i>Tris buffered EDTA</i>
TBS	<i>Tris buffere saline</i>
TE	Tris-HCl EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TLS	<i>Translocated in liposarcoma</i>
TRITC	Tetrametilrodamina

UDP	Difosfat d'uridina
UDPG	Difosfat d'uridina-glucosa
UTP	Trifosfat d'uridina

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

La glicogen sintasa (GS) és l'enzim més important en la síntesi de glicogen, un polímer de glucosa que és el principal reservori de carbohidrats de la cèl·lula. Aquest enzim catalitza l'addició d'un residu glicosil, provinent d'una molècula de difosfat d'uridina-glucosa (UDPG), a l'extrem no reductor d'una cadena de glicogen preexistent. D'aquesta manera el glicogen és a la vegada substrat i producte.

Les GSs eucariotes són enzims altament regulats. D'una banda, estan subjectes a regulació per al·lostèrisme, on la glucosa-6-fosfat n'és el principal activador. D'altra banda, són enzims que també es regulen mitjançant fosforilació covalent de diferents residus fosforilables. Com a exemple, s'han descrit fins a nou centres de fosforilació per a la glicogen sintasa muscular humana dins dels aproximadament 730 aminoàcids que formen la proteïna. Aquests dos mecanismes de regulació, àmpliament estudiats, permeten un control precís del seu estat d'activació.

Gràcies a la resolució de diferents estructures de glicogen sintases no eucariotes en els darrers anys, es comença a tenir una idea més precisa del mecanisme enzimàtic de la reacció. Es té una idea força acurada dels llocs d'unió de l'UDPG i de la cadena acceptora en el centre actiu de les GSs bacterianes. Però no ha estat fins fa poc que s'han obtingut indicis de l'existència a la superfície de l'enzim de llocs d'unió a carbohidrats lluny del centre actiu, que explicarien l'alta afinitat que sempre ha mostrat la GS pel glicogen.

El treball descrit en aquesta tesi s'origina a partir de la identificació, al nostre laboratori, d'un lloc d'unió a carbohidrats a la superfície de la GS de l'arqueó *Pyrococcus abyssi* (PaGS) a partir de l'anàlisi cristal·logràfica del complex format per aquest enzim i una molècula de maltohexaosa. A partir d'aquest resultat ens vam proposar confirmar si aquest domini era un lloc d'unió a glicogen funcional i, en cas afirmatiu, caracteritzar aquesta unió i els seus determinants a la seqüència de l'enzim, així com l'impacte de la unió a glicogen

sobre la catàlisi i sobre les diferents característiques de la glicogen sintasa, especialment les de les variants humanes de l'enzim.

En aquesta tesi també vam decidir investigar el fenomen de translocació nuclear de la isoforma muscular de la GS humana (HMGS), l'única isoforma per a la qual s'ha descrit aquest comportament. En aquest procés, l'enzim transloca des del citoplasma, on trobem l'enzim unit als dipòsits de glicogen, al nucli cel·lular quan la cèl·lula exhaureix els reservoris de glicogen. Treballant sota la hipòtesi que la translocació de l'HMGS obeeix a un procés de senyalització cel·lular, ens vam proposar identificar proteïnes que interaccionessin amb l'enzim nuclear per intentar obtenir indicis d'una possible funció nuclear per a la isoforma muscular de la GS humana.

INTRODUCCIÓ

1. EL GLICOGEN I EL SEU METABOLISME

1.1 Estructura del glicogen

La glucosa és una font d'energia cabdal per a les cèl·lules. Per aquesta raó els éssers vius tenen mecanismes per emmagatzemar la glucosa de forma eficient per poder-ne disposar donat el moment. En el cas dels bacteris, arquea, fongs i animals, la glucosa s'emmagatzema en forma de glicogen. El glicogen és un polímer ramificat de glucosa on els residus formen cadenes mitjançant enllaços glicosídics $\alpha(1\rightarrow4)$, que a la vegada es ramifiquen amb enllaços $\alpha(1\rightarrow6)$ cada 8-12 residus de glucosa (**Figura 1**).

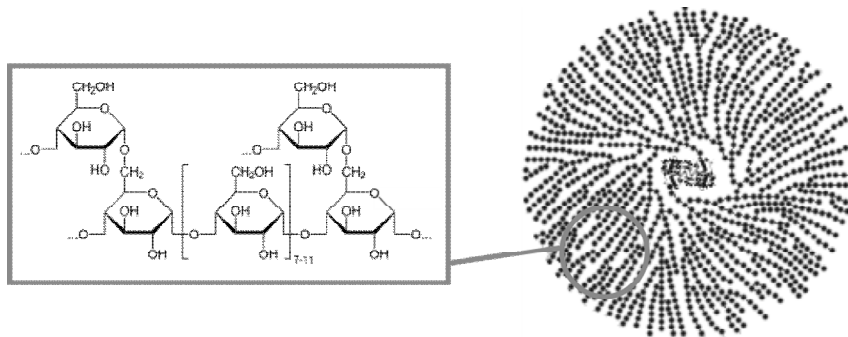


Figura 1. Representació esquemàtica del gra de glicogen i detall de les cadenes de glucosa ramificades.

La partícula de glicogen té un pes molecular i unes dimensions variables. Per microscòpia electrònica se n'observen diferents poblacions que es poden classificar segons la seva mida. D'una banda s'observen les partícules β amb un diàmetre d'entre 20-50 nm (Takeuchi et al. 1978). En fetge aquestes partícules s'agrupen formant les partícules α (**Figura 2**), amb una característica forma de rosassa i una mida de fins a 200 nm (Rybicka 1996). Tot i que no es sap experimentalment quina és la mida màxima a la qual pot arribar una partícula de glicogen, un model teòric prediu que arriba un moment a partir del qual no és possible afegir nous residus de glucosa a la partícula de glicogen degut a un impediment estèric (Melendez et al. 1998). Segons aquest model, les molècules

madures de glicogen arribarien a tenir fins a 12 capes de ramificació, amb un pes molecular de 10^7 Da i 55000 residus de glucosa.

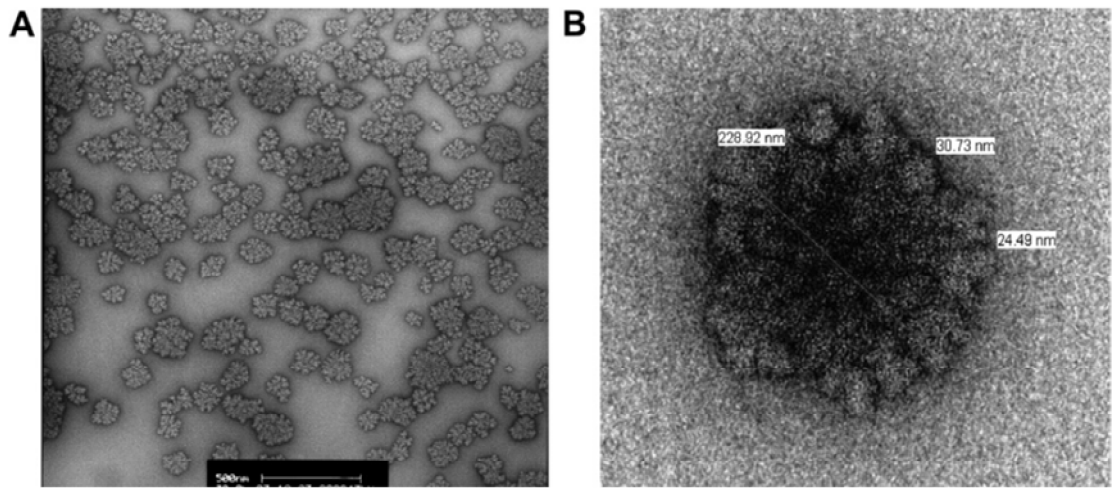


Figura 2. (A) Microscòpia electrònica de partícules α de glicogen purificades. (B) Detall d'una partícula α , mostrant el seu diàmetre en nm, juntament amb el de les partícules β que conté (Parker et al. 2007).

1.2 Funció del glicogen

El glicogen és una molècula perfectament adaptada al seu paper de reservori energètic, ja que permet emmagatzemar glucosa amb alta eficiència gràcies a l'alta ramificació i sense augmentar l'osmolaritat de la cèl·lula. L'elevat grau de ramificació augmenta el nombre d'extrems no reductors disponibles, afavorint una ràpida degradació en cas necessari, així com la seva solubilitat.

Les senyals que activen la síntesi de glicogen varien segons l'organisme al qual ens referim. El bacteris generalment sintetitzen el glicogen en situacions de creixement limitat, quan hi ha un excés de font de carboni i una deficiència en altres nutrients (Eydallin et al. 2007). La funció del glicogen en bacteris s'ha lligat a la supervivència en períodes de falta de nutrients (Strange 1968), esporulació (Kiel et al. 1994; Martin et al. 1997), creixement (Belanger and Hatfull 1999), cariogènesi (Spatafora et al. 1995) o virulència (Bonafonte et al. 2000).

En el cas dels llevats el glicogen es sintetitza en una situació de limitació de fonts de carboni o d'exhauriment de fonts de nitrogen, sulfur o fòsfor (Lillie and Pringle 1980). S'ha demostrat clarament la relació entre la síntesi glicogen en llevats i la seva supervivència a llarg termini durant una privació de nutrients (Sillje et al. 1999).

En animals el glicogen es sintetitza principalment en el fetge i en teixit muscular. El fetge és el teixit que arriba a un major contingut relatiu de glicogen, arribant a ser el 6-10% del seu pes. Al múscul, en canvi, aquest percentatge arriba només al 0.5%. Tot i així, el múscul és el teixit on s'emmagatzema la major part del glicogen degut a la seva major massa en relació al fetge.

El glicogen en mamífers és sintetitzat en situació postprandial, quan els nivells de glucosa són elevats gràcies a la ingesta d'aliments. Una vegada passada la fase absortiva, la glucosa que conté el glicogen comença a ser mobilitzada. Cal diferenciar entre el paper del glicogen en fetge i el de la resta de teixits. El glicogen hepàtic és degradat a glucosa i aquesta és alliberada al torrent sanguini per tal de mantenir l'homeòstasi glucídica i nodrir així els teixits perifèrics. En canvi, en els altres teixits la glucosa provinent de la degradació del glicogen és dirigida cap a la glucòlisi, ja sigui per abastir d'energia a la pròpia cèl·lula o per a generar metabòlits amb altres funcions, com seria el cas dels astròcits, que a partir del glicogen generen lactat que és utilitzat per les neurones veïnes com a font d'energia (Brown et al. 2004).

1.3 Distribució subcel·lular del glicogen

En situació no patològica el glicogen es localitza al citoplasma de les cèl·lules. Mitjançant microscòpia electrònica s'observa que el glicogen normalment està pròxim a estructures membranoses, com el reticle

endoplasmàtic en fetge (Cardell et al. 1985) o el reticle sarcoplasmàtic en múscul (Shearer and Graham 2004).

En el cas del glicogen muscular, s'ha postulat que la seva unió al reticle sarcoplasmàtic pugui ser mitjançada pel domini d'unió a membranes de la subunitat reguladora de la proteïna fosfatasa 1 G_M (Tang et al. 1991) o per la proteïna genetonina 1 (Jiang et al. 2010). La genetonina 1, també coneguda com stbd1 (*Starch binding domain-containing protein 1*), és una proteïna que s'expressa preferencialment en fetge i múscul, i permetria la interacció i ancoratge del gra de glicogen a membranes intracel·lulars. La genetonina 1 té un domini d'interacció amb la proteïna GABARAPL1 (Jiang et al. 2011), que és membre de la família de proteïnes associades a l'autofagia Atg8. Aquesta interacció suggereix que la genetonina 1 podria tenir un paper en la degradació del glicogen per autofagia, intervenint en el tràfic del glicogen cap als lisosomes.

En el cas del glicogen hepàtic, la síntesi del glicogen es fa des de la perifèria cel·lular cap a l'interior (Fernandez-Novell et al. 1997; Garcia-Rocha et al. 2001). Aquest mecanisme podria respondre a la necessitat d'una síntesi ordenada per tal de maximitzar la capacitat de l'hepatòcit.

En algunes situacions patològiques es pot trobar glicogen en altres compartiments subcel·lulars. En pacients amb la malaltia de Pompe, que tenen mutacions al gen que codifica per a la α -glucosidasa lisosomal, el glicogen s'acumula a dins del lisosoma (Fukuda et al. 2006). En condicions normals, el glicogen pot ser transportat al lisosoma i ser hidrolitzat per l' α -glucosidasa, però davant la impossibilitat d'aquests pacients de degradar-ho, el glicogen s'acumula, produint un dany fatal a la cèl·lula. També s'ha detectat glicogen a l'interior del nucli en diferents cèl·lules derivades de tumors (Dent et al. 1990; Granzow et al. 1981; Guillen et al. 2010; Zimmermann et al. 1976).

1.4 Glicogen en situacions patològiques

La desregulació del metabolisme del glicogen és un símptoma de les anomenades *glycogen storage diseases* (GSDs) (Ozen 2007). Són un grup de 12 malalties que es classifiquen segons la deficiència enzimàtica que la provoca i el teixit afectat (**Figura 3**). En general les GSDs impliquen un augment d'acumulació de glicogen a la cèl·lula. També estan els casos de la GSD 0, on hi ha una disminució de glicogen hepàtic per la falta d'activitat glicogen sintasa en fetge, la GSD IV, una malaltia mortal on la manca de l'enzim ramificant produeix un glicogen molt poc ramificat, o la GSD III, on la manca d'enzim desramificant només permet la degradació de les cadenes terminals del glicogen, formant una dextrina límit. Aquest glicogen anormal és altament tòxic per a les cèl·lules i provoca greus danys en diferents teixits, sobretot el fetge.

TABLE 21.1 Glycogen-storage diseases

Type	Defective enzyme	Organ affected	Glycogen in the affected organ	Clinical features
I Von Gierke disease	Glucose 6-phosphatase or transport system	Liver and kidney	Increased amount; normal structure.	Massive enlargement of the liver. Failure to thrive. Severe hypoglycemia, ketosis, hyperuricemia, hyperlipemia.
II Pompe disease	α -1,4-Glucosidase (lysosomal)	All organs	Massive increase in amount; normal structure.	Cardiorespiratory failure causes death, usually before age 2.
III Cori disease	Amylo-1,6-glucosidase (debranching enzyme)	Muscle and liver	Increased amount; short outer branches.	Like type I, but milder course.
IV Andersen disease	Branching enzyme (α -1,4 $\rightarrow$ α -1,6)	Liver and spleen	Normal amount; very long outer branches.	Progressive cirrhosis of the liver. Liver failure causes death, usually before age 2.
V McArdle disease	Phosphorylase	Muscle	Moderately increased amount; normal structure.	Limited ability to perform strenuous exercise because of painful muscle cramps. Otherwise patient is normal and well developed.
VI Hers disease	Phosphorylase	Liver	Increased amount.	Like type I, but milder course.
VII	Phosphofructokinase	Muscle	Increased amount; normal structure.	Like type V.
VIII	Phosphorylase kinase	Liver	Increased amount; normal structure.	Mild liver enlargement. Mild hypoglycemia.

Note: Types I through VII are inherited as autosomal recessives. Type VIII is sex linked.

Figura 3. Llistat d'algunes de les GSDs juntament amb les seves característiques.

El glicogen generat en el cas de la GSD IV no és totalment degradable per la cèl·lula i s'acumula formant cossos de poliglucosà (PGBs), que és un terme general per referir-se a aquelles incusions formades majoritàriament per

polímers de glucosa poc ramificats que apareixen en diferents condicions patològiques (Cavanagh 1999). Degut a la seva naturalesa, els PGBs es tenyeixen amb tincions específiques de carbohidrats, com l'àcid periòdic o el colorant de Schiff. Però als PGBs també hi podem trobar diferents proteïnes unides, entre elles la glicogen sintasa (Valles-Ortega et al. 2011). La relació entre enzims del metabolisme de glicogen i algunes malalties on s'acumulen PGBs, com la GSD IV o la malaltia de Lafora, indueix a pensar que aquests PGBs es tracten d'un glicogen aberrant que, per tant, es generaria en una situació de desregulació del metabolisme del glicogen.

1.5 Síntesi del glicogen

1.5.1 La internalització de la glucosa

La via de síntesi del glicogen comença amb el transport de glucosa cap a l'interior cel·lular mitjançant un transportador (**Figura 4**). El transport de glucosa a l'interior cel·lular és dut a terme, de forma independent del transport d'ions o hidròlisi d'ATP, pels transportadors GLUT 1-4 (Scheepers et al. 2004; Thorens and Mueckler 2010). En el cas de ronyó i intestí, a més dels transportadors de la família GLUT també existeixen transportadors dependents d'ions i hidròlisi d'ATP.

Dels transportadors de la família GLUT, GLUT1 va ser el primer en ser clonat (Mueckler et al. 1985) i, tot i que s'expressa en alts nivells en eritròcits i cèl·lules endotelials del cervell, és expressat de forma ubiqua i és l'encarregat del proveïment bàsic de glucosa a les cèl·lules. GLUT3 és un transportador que s'expressa en teixits amb alts requeriments de glucosa, com per exemple el cervell. Tant GLUT 1 com GLUT 3 són considerats transportadors de glucosa d'alta afinitat, amb una Km de 1-2 mM.

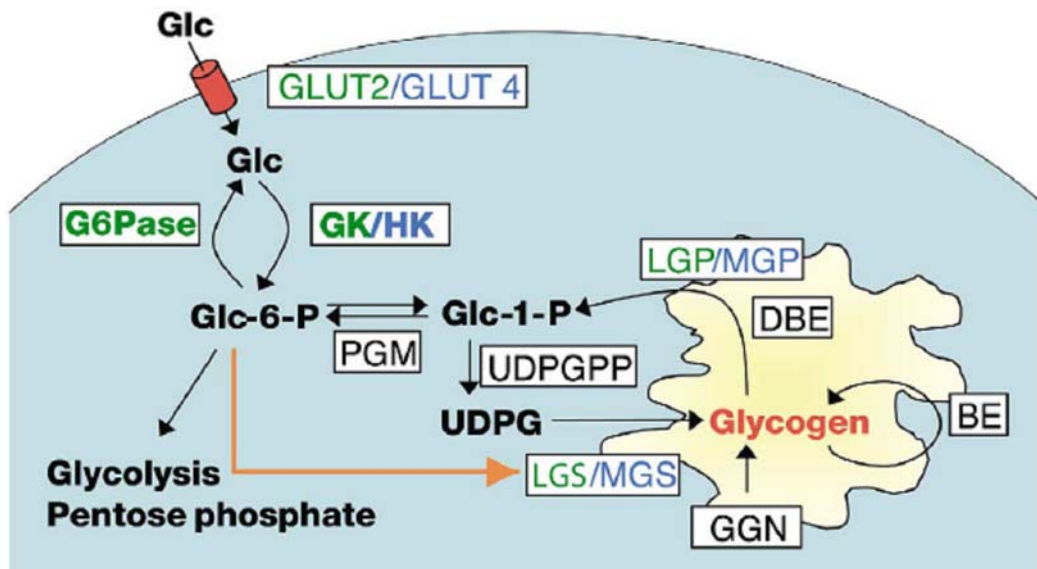


Figura 4. Esquema del metabolisme del glicogen (Ferrer et al. 2003).

Un altre transportador d'alta afinitat és el GLUT4, expressat específicament en múscul i adipòcits. Aquest transportador té certes peculiaritats. Presenta una Km per la glucosa de 5 mM i, mentre els altres transportadors GLUT es localitzen constitutivament a la membrana citoplasmàtica, GLUT4 està emmagatzemat en vesícules citoplasmàtiques. En resposta a la insulina, aquestes vesícules transloquen a la perifèria cel·lular i es fusionen amb la membrana citoplasmàtica, augmentant fins a 20 vegades el transport de glucosa cap a al citoplasma. Aquesta translocació és reversible (Pessin et al. 1999). Quan els nivells d'insulina tornen a baixar, el transportador torna a translocar cap al citoplasma. La translocació de GLUT4 també pot desencadenar-se per altres estímuls com la contracció muscular (Lund et al. 1995) o la hipòxia (Cartee et al. 1991).

L'altre membre destacable de la família GLUT és el transportador GLUT2, que s'expressa específicament en fetge, illots pancreàtics, ronyó i la membrana vasolateral de l'intestí. Aquest transportador és de baixa afinitat, amb una Km de 15-20mM, i actua com un transportador equilibratiu. Això permet que, quan la

concentració intracel·lular de glucosa és major que la concentració extracel·lular, es produeixi una exportació de glucosa cap al torrent sanguini.

1.5.2 Fosforilació de la glucosa

Una vegada dins la cèl·lula, la glucosa és fosforilada a glucosa-6-fosfat (G6P) per algun dels enzims de la família de les hexoquinases, consumint una molècula de trifosfat d'adenosina (ATP). Existeixen quatre isoformes d'hexoquinases. Les hexoquinases I, II i III presenten alta afinitat per la glucosa (K_m per sota de 0,2 mM) així com una retroinhibició pel seu producte, G6P. Això converteix aquests enzims en fàcilment activables però també ràpidament saturables. En canvi, l'hexoquinasa IV, també anomenada glucoquinasa (GK), té una menor afinitat per la glucosa (K_m de 10 mM) i no presenta retroinhibició per producte. Això fa de la GK un enzim amb una alta capacitat i una activació molt més progressiva i proporcional a la concentració de glucosa.

1.5.3 De glucosa-6-fosfat a glicogen

La G6P és convertida a glucosa-1-fosfat (G1P) per l'acció de l'enzim fosfoglucomutasa (PGM). Aquesta G1P, juntament amb una molècula de trifosfat d'uridina (UTP), és utilitzada per a la síntesi de difosfat d'uridina-glucosa (UDPG) per l'acció de l'enzim UDPG pirofosforilasa. Aquesta UDPG és la molècula donadora del grup glicosil que serà afegit a l'extrem no reductor una cadena de glucoses preexistent, l'acceptor en la reacció, per l'acció de l'enzim glicogen sintasa (GS).

Existeixen dues isoformes de GS, la glicogen sintasa muscular (MGS) i la glicogen sintasa de fetge (LGS). La MGS és la isoforma que s'expressa de forma ubíqua excepte a fetge, on s'expressa específicament la LGS. Ambdues isoformes són regulades per fosforilació múltiple, que provoca la inactivació de

l'enzim. A més, l'enzim s'activa de forma al·lostèrica per la G6P (Leloir et al. 1959).

A l'inici de la síntesi de la molècula de glicogen, l'acceptor de la reacció catalitzada per la GS és una cadena de glucoses proveïda per l'enzim glicogenina (GYG1). La glicogenina és una glicosiltransferasa capaç d'autoglicosilar-se en un residu de tirosina (Tyr195 en la glicogenina humana) utilitzant UDPG com a substrat, fins a una llargada de deu residus de glucosa (Cao et al. 1993). La GS, que interacciona amb GYG1 (Skurat et al. 2006), inicia la molècula de glicogen allargant aquesta cadena. Durant l'allargament linial de la cadena de glucoses l'enzim ramificant (GBE1) s'encarrega de ramificar el glicogen mitjançant la transferència d'un fragment terminal de 6-7 glucoses des d'un extrem amb un mínim d'onze residus de glucosa al carboni 6 d'una molècula de glucosa de l'interior del polímer (Bollen et al. 1998). Aquesta reacció comporta el trencament d'un enllaç glicosídic $\alpha(1\rightarrow4)$ i la generació d'un enllaç $\alpha(1\rightarrow6)$. Amb la ramificació de glicogen es generen nous extrems no reductors que poden ser utilitzats per la GS i allargar així la molècula de glicogen.

1.6 Degradació del glicogen

La degradació del glicogen es duta a terme per l'acció concertada de l'enzim glicogen fosforilasa (GP) i l'enzim desramificant (AGL). La GP degrada les cadenes lineals del glicogen trencant els enllaços glicosídics $\alpha(1\rightarrow4)$ i alliberant molècules de G1P mitjançant la incorporació d'una molècula de fosfat. La GP no pot seguir degradant la cadena quan es troba a 3-4 residus de distància d'un punt de ramificació. És aleshores quan l'AGL transfereix la branca, a excepció del residu unit per l'enllaç $\alpha(1\rightarrow6)$, a una altra cadena del glicogen mitjançant la formació d'un enllaç $\alpha(1\rightarrow4)$. Finalment l'enzim desramificant elimina el residu del punt de ramificació alliberant una molècula de glucosa.

En humans es coneixen tres isoformes de GP que reben el nom del teixit on s'expressen preferencialment: la muscular, l'hepàtica i la de cervell (Browner et al. 1992). La GP pot ser regulada de forma al·lostèrica (Hubbard and Cohen 1989a) i per fosforilació (Hubbard and Cohen 1989b), i la integració d'ambdues regulacions controla la interconversió entre els estats conformacionals actiu (R) i inactiu (T) de la GP.

A diferència de la GS, la GP té un sol residu fosforilable a l'extrem N-terminal de la proteïna (Ser14 a en el cas de la GP muscular de conill) i la fosforilació d'aquest residu genera una forma més activa de la GP, anomenada GP-a. Aquesta fosforilació és portada a terme per la fosforilasa quinasa (PhK), que s'activa amb nivells intracel·lulars de Ca^{2+} elevats o quan és fosforilada per la PKA. La defosforilació de la GP la realitza l'enzim PP1.

La regulació al·lostèrica de les GPs és depenent de la isoforma i l'estat de fosforilació (Hubbard and Cohen 1989a). Tots les isoformes, independentment de l'estat de fosforilació, s'inhibeixen per glucosa. La forma defosforilada de la GP (GP-b) muscular presenta activació al·lostèrica per AMP i inhibició per G6P i ATP. En canvi, la isoforma hepàtica de GP-b no és sensible a AMP, G6P o ATP. La GP-b de cervell sí presenta una forta activació per AMP, però no inhibició per G6P.

1.7 Metabolisme del glicogen hepàtic i muscular

Tot i que el metabolisme del glicogen muscular i hepàtic són esquemàticament iguals, hi ha diferències entre ambdós que expliquen la diferent funció entre el glicogen muscular i hepàtic. Les diferències principals es troben en les diferents isoformes de transportador de glucosa, hexoquinasa, glicogen sintasa i glicogen fosforilasa que presenten ambdós teixits.

1.7.1 Metabolisme del glicogen muscular. Síntesi

En múscul el glicogen està destinat a proveir de glucosa a la pròpia cèl·lula i la seva síntesi es portarà a terme quan l'organisme disposa d'un excés de glucosa. En aquesta situació, els alts nivells de glucosa en sang fan augmentar la secreció d'insulina. Aquesta provocarà la translocació dels transportadors GLUT4 a la perifèria de la cèl·lula muscular, augmentant el transport de glucosa circulant cap a l'interior. No serà necessari un gran augment en la concentració de glucosa per a què l'HKII, la isoforma d'hexoquinasa majoritària en múscul, comenci a convertir-la en G6P de forma eficient. La G6P produïda activarà al·lostèricament la MGS, que iniciarà la síntesi de glicogen.

També s'havia proposat una via complementària d'activació de MGS mitjançant insulina (Lawrence and Roach 1997). La senyal d'insulina activa una cascada senyalitzadora que resulta en la inhibició de GSK-3 (Cross et al. 1995) i l'activació de la proteïna fosfatasa 1 (PP1) (Dent et al. 1990; Hubbard and Cohen 1989b, 1989a), que condueix a la defosforilació i activació de la GS. Tot i així, recentment es va demostrar que l'activació síntesi de glicogen en resposta a insulina és deguda principalment a l'efecte de l'augment en G6P (Bouskila et al. 2010), deixant l'activació covalent en un segon pla.

1.7.2 Metabolisme del glicogen muscular. Degradació

Un cop s'acaba la fase absortiva i deixa d'haver-hi una aportació de glucosa a la sang provinent de la ingesta s'arriba al dejuni. Això fa caure la concentració circulant d'insulina, que provocarà la internalització dels transportadors GLUT4 i la ralentització el transport de glucosa cap a dins les cèl·lules musculars. Així, disminuirà la concentració de glucosa intracel·lular i de retruc la de G6P, inhibint la GS i activant la GP. La situació de dejuni també està

l·ligada a una disminució del nivell energètic de la cèl·lula, disminuint la concentració d'ATP i augmentant la d'AMP, resultant en una activació al·lostèrica de la isoforma muscular de GP.

Hi ha altres estímuls que també activen la degradació del glicogen, com la contracció muscular o l'estrès. La contracció muscular provocarà un augment en la concentració intracel·lular de calci que activarà la PhK i aquesta fosforilarà la GP. D'altra banda, els estímuls d'estrès provocaran l'alliberament d'adrenalina al torrent sanguini, que s'unirà al receptor β -adrenèrgic del múscul i iniciarà una cascada de senyalització que provocarà l'activació de PKA i la inhibició de PP1 (Toole and Cohen 2007), que afavorirà la fosforilació de GP. D'aquesta manera s'anirà degradant el glicogen i s'alliberarà G1P que s'incorporarà a les vies de glucòlisi per a la producció d'energia per a la pròpia cèl·lula.

1.7.3 Metabolisme del glicogen hepàtic. Síntesi

En fetge, el glicogen és destinat principalment a mantenir l'homeòstasi glucídica durant els períodes de dejuni. Així, ha de ser només quan l'organisme disposa d'un excés de glucosa quan s'ha d'activar la síntesi de glicogen, i això s'aconsegueix gràcies a les característiques de les isoformes hepàtiques d'alguns enzims de la via. Els hepatòcits tenen el transportador GLUT2 localitzat permanentment a la membrana cel·lular i fa que la concentració intra i extracel·lular s'equilibri (Thorens et al. 1990). Així, aquest transportador només internalitzarà glucosa en situació postprandial, quan els nivells de glucosa circulants són més elevats que els intracel·lulars.

A baixes concentracions de glucosa la GK es troba formant un complex inactiu nuclear amb la proteïna reguladora de GK (GKRP) (Van Schaftingen 1989; Van Schaftingen et al. 1994). L'augment de la concentració de glucosa intracel·lular trenca el complex format per GK i GKRP, permetent la translocació de GK cap al citoplasma (Toyoda et al. 1994) on començarà a sintetitzar G6P.

Degut a la seva baixa afinitat per la glucosa i la inexistència d'inhibició per producte, la GK actua com a sensor de les concentracions de monosacàrid, produint G6P només quan la concentració de glucosa sobrepassa la normoglicèmia i de manera progressiva a aquest augment de concentració. Aquesta G6P acabarà activant al·lostèricament la LGS i iniciant la síntesi de glicogen. A més, la unió de G6P afavoreix la defosforilació de LGS i per tant la seva activació (Villar-Palasi 1991). També s'inhibiria la degradació de glicogen mitjançant la inhibició al·lostèrica de la GP hepàtica per glucosa.

1.7.4 Metabolisme del glicogen hepàtic. Degradació

En dejuni la glicèmia disminueix i per tant els nivells intracel·lulars de glucosa. En hepatòcits, això farà disminuir la concentració intracel·lular de G6P i disminuirà l'activació al·lostèrica de LGS. També baixen els nivells circulants d'insulina, a la vegada que augmenten els de glucagó. La unió d'aquesta hormona al receptor de glucagó de la membrana dels hepatòcits activa l'enzim adenilat ciclase (AC), augmentant els nivells intracel·lulars d'AMPc, que activaran la quinasa PKA (Stalmans 1976; van de Werve and Jeanrenaud 1987). Aquesta inactivarà la LGS per fosforilació i activarà la PhK, que fosforilarà i activarà la GP hepàtica, portant a la degradació del gra de glicogen (Bollen et al. 1998). Aquesta activació de la degradació del glicogen per modificació covalent de diferents proteïnes també pot ser generada per l'hormona adrenalina, que augmentaria la concentració intracel·lular d'AMPc, activant la PKA. L'adrenalina també genera un augment de la concentració de calci intracel·lular, activant la PhK i les quinases dependents de calmodulina, que poden fosforilar i inactivar la LGS.

La GP, a més, es regula per unió a la G_L , subunitat reguladora de la PP1, que també pot modular l'activitat de la GS. La interacció entre la G_L i la GP es doïa través del domini C-terminal de la G_L , que s'uneix a la butxaca per AMP de la GP (Pautsch et al. 2008). La interacció de la G_L amb la forma activa de la GP,

suprimeix l'activitat de la PP1 sobre la GS, pel que es produeix inhibició de la síntesi de glicogen en fetge; pel contrari, si s'inhibeix aquesta interacció entre la GP i la G_L s'incrementa la síntesi de glicogen (Zibrova et al. 2008). A més, l'acció glicogenogènica de PTG, una altra subunitat reguladora de la PP1, és deguda no només a per un efecte directe com a fosfatasa de la sintasa (Brady et al. 1997) sinó també per inactivació de la GP (Green et al. 2004).

La G1P que s'allibera per l'acció de la GP acabarà derivant-se a glucosa per l'acció dels enzims de la via gluconeogènica fofsfoglucomutasa i glucosa-6-fosfatasa. Aquesta glucosa s'alliberarà al torrent sanguini a través del transportador GLUT2 per tal de mantenir la glicèmia.

1.8 El gra de glicogen, més que un reservori energètic

El gra de glicogen és considerat avui en dia molt més que un simple reservori energètic, passant a ser una estructura dinàmica i finament regulada, amb el seu propi conjunt de proteïnes que s'hi uneixen, permetent al glicogen ser la base sobre la qual s'interrelacionen.

Recentment es va publicar un treball (Stapleton et al. 2010) a on, mitjançant tècniques d'espectrometria de masses, s'identificaven un gran nombre de proteïnes unides al glicogen hepàtic, trobant-hi la major part de les proteïnes del metabolisme del glicogen així com altres que no havien estat prèviament descrites, com la genetonina1 o la ferritina. Tot i així es trobaven a faltar algunes proteïnes amb provada capacitat d'unió a glicogen, com podien ser l'AMPK o el GBE1. Durant l'experiment també s'identificaven altres proteïnes que es localitzaven en altres compartiments cel·lulars, com el lisosoma o el reticle endoplasmàtic. Segons els autors, aquests compartiments es copurificaven amb el gra de glicogen, reflectint la forta relació que hi ha entre el glicogen i altres compartiments cel·lulars.

La localització al gra de glicogen pot venir donada per una interacció directa de la proteïna amb el glicogen o per la interacció amb una proteïna que hi està unida. Els llocs d'unió a glicogen (GBD) formen part de diferents famílies de mòduls d'unió a carbohidrats (CBM) (Guillen et al. 2010). Els CBMs són dominis proteics encarregats de la interacció amb tota la varietat de estructures glicosídiques i estan classificats en 55 famílies diferents basant-se en la seva seqüència aminoacídica (Cantarel et al. 2009; Guillen et al. 2010). Quant a les proteïnes d'unió a glicogen, trobem membres de les famílies CBM20 (laforina, genetonina), CBM21 (PTG) o CBM48 (subunitat β d'AMPK, AGL o GBE1). La importància dels CBMs es demostra perquè la disrupció d'aquests CBMs pot derivar en alteracions del comportament de l'enzim. Per exemple, la deleció del lloc d'unió a glicogen de l'enzim desramificant AGL deriva en l'augment en la degradació de l'enzim a través de l'enzim malina, una U3-ubiquitin lligasa (Cheng et al. 2007). En el cas d'AMPK, més enllà de la seva funció en la regulació de la síntesi de glicogen, s'ha trobat en experiments *in vitro* que el glicogen actua com a inhibidor d'aquesta quinasa a través de la interacció amb el seu GBD (McBride et al. 2009). Sabent que l'AMPK actua com a sensor de l'estat energètic de la cèl·lula i s'activa per tal d'iniciar processos d'adaptació de la cèl·lula a situacions de baixa energia, al glicogen se li atorga aquí una nova funció com a senyal d'alta disponibilitat d'energia, amb l'AMPK actuant com a sensor.

També s'ha caracteritzat estructuralment un GBD en la GP de mamífer (Johnson et al. 1988; Pinotsis et al. 2003), anomenat lloc d'emmagatzematge de glicogen, ja que es troba lluny del centre catalític (**Figura 5**). S'ha descrit que la unió del glicogen a aquest lloc provoca una activació al·lostèrica de l'enzim (Newgard et al. 1989).

Poc es sap de la interacció entre la glicogen sintasa humana i el glicogen, tot i la llargament coneguda alta afinitat entre ambdós. Estudis amb la glicogen

sintasa muscular de conill utilitzant substrats acceptors de diferents mides demostraven que l'eficiència de l'enzim millorava amb substrats més llarg i ramificats (Larner et al. 1976). A partir d'aquests resultats es va proposar un model on l'enzim tindria dos llocs d'unió a polisacàrids, un per a unir la cadena acceptora al centre d'unió i un altre lloc d'unió a carbohidrats fora del centre actiu. D'aquesta manera el substrat s'uniria als dos llocs d'unió per tal d'una catàlisi eficient.

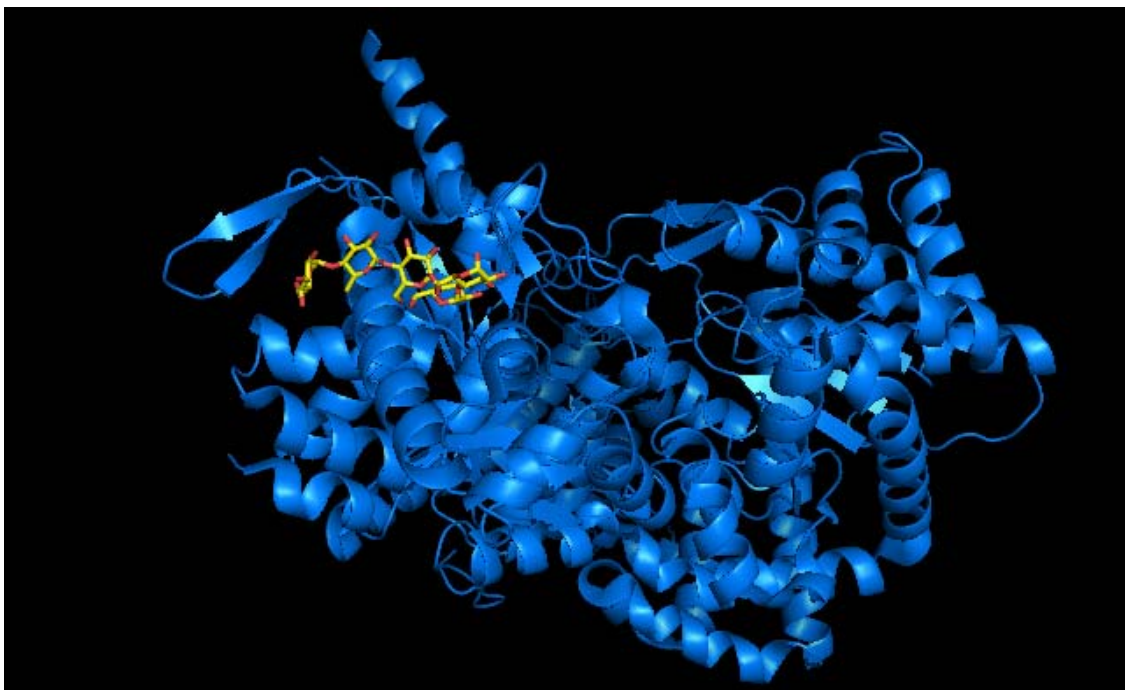


Figura 5. Estructura de la GP muscular de conill (blau) amb una molècula de maltopentaosa (groc) unida al lloc d'emmagatzemament de glicogen de l'enzim (PDB:1P2B).

Estudis estructurals de la GS d'*Escherichia coli* han permès descriure un lloc d'unió de la cadena acceptora al centre actiu (Sheng et al. 2009b), així com diferents llocs d'unió a carbohidrats lluny d'aquest centre (Sheng et al. 2009a), un resultat que sembla confirmar la hipòtesi de què la glicogen sintasa compta amb més d'un lloc d'unió a glicogen. Tot i així, no hi ha cap recolzament experimental de la funcionalitat d'aquests dominis. Per a les glicogen sintases eucariotes encara manquen resultats que descriguin o senzillament recolzin l'existència d'algun lloc d'unió a glicogen o CBM fora del centre actiu, un

coneixement que seria molt interessant per tal de poder aprofundir en la interrelació entre l'enzim i el gra de glicogen.

2. LA GLICOGEN SINTASA

2.1 La GS és una glicosiltransferasa

Com ja s'ha comentat, la GS catalitza l'últim pas de la síntesi de glicogen i tradicionalment s'ha considerat que exerceix gran part del control sobre aquesta via metabòlica.

La glicogen sintasa pertany a la superfamília GT-B de les glicosiltransferases (GT) i catalitza l'addició de residus de glucosa mitjançant enllaços α -1,4 a una cadena creixent de polisacàrid amb retenció de configuració. Les glicogen sintases dels diferents organismes s'han classificat en diferents famílies dins del conjunt de les GTs degut a què no presenten una identitat de seqüència significativa, a què utilitzen diferents donadors de residus glicosil (UDPG o ADPG) i a altres diferències. Les GSs de fongs i animals pertanyen a la família 3, i utilitzen exclusivament UDPG com a substrat. Les GSs bacterianes i d'arquea pertanyen a la família 5 (Campbell et al. 1997; Campbell et al. 1998). Les GSs bacterianes utilitzen ADPG com a substrat, mentre que les GSs d'arquea poden utilitzar tant ADPG com UDPG. Dins de la família GT-5, per comparació de seqüència les GS d'arquea són les més properes a les GSs d'eucariotes.

2.2 Isoformes de GS

En humans, com a la resta de mamífers, existeixen dues isoformes de GS, MGS i LGS (**Figura 6**), que provenen de dos gens diferents (GYS1 i GYS2 respectivament). Aquestes dues proteïnes presenten un 70% d'identitat a nivell de seqüència aminoacídica. La zona més conservada és la part central, on està el domini d'unió a UDPG i el centre catalític. En canvi, als extrems N i C terminals és on difereixen més. La MGS té nou residus fosforilables, mentre que a la LGS li manquen els dos darrers de l'extrem C-terminal, tenint-ne un total de set.

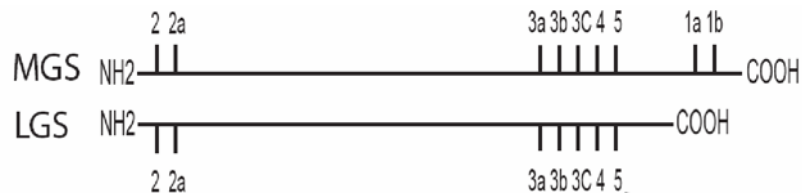


Figura 6. Esquema de les isoformes hepàtica i muscular de la GS humana, marcant els centres de fosforilació.

2.3 La glicogen sintasa muscular humana (HMGS)

2.3.1 La regulació de l'expressió de l'HMGS

La glicogen sintasa muscular (MGS) humana es tracta d'una proteïna de 85 KDa i, per analogia amb la GS de llevat, sembla ser un tetràmer (Baskaran et al. 2010; Nimmo et al. 1976). El seu gen, GYS1, es troba en el cromosoma 19, inclòs en la banda citogenètica 19q13.3, i està format per 16 exons que s'extenen al llarg de 27 Kb d'ADN (Orho et al. 1995). Poc es coneix de la regulació transcripcional del gen GYS1. Els dos factors coneguts que activen la transcripció del gen GYS1 són l'exercici (Dela et al. 1995; Vestergaard et al. 1994) i la hipòxia (Pescador et al. 2010).

2.3.2 La regulació de l'HMGS per fosforilació

L'HMGS va ser un dels primers enzims per als quals es descrigué una regulació per fosforilació reversible i el primer que s'inactivava per fosforilació. Aquest enzim conté 9 residus de serina fosforilables *in vivo*, distribuïts als extrems N i C terminals de la proteïna. A N-terminal hi ha els residus 2 i 2a, que corresponen als aminoàcids 7 i 10. A C-terminal trobem els llocs de fosforilació 3a, 3b, 3c, 4, 5, 1a i 1b, que corresponen als aminoàcids 640, 644, 648, 652, 656, 697 i 710. La fosforilació dels diferents llocs provoca una inhibició de l'enzim mitjançant una disminució de l'afinitat pel substrat UDPG (Roach et al. 1976) així com per l'activador al·lostèric G6P (Roach et al. 1976; Salavert et al. 1979; Skurat et al. 2000). A més, també s'augmenta l'afinitat per ATP i Pi, que tendeixen a antagonitzar la G6P (Mathews and Van Holde 1990). La velocitat màxima de l'enzim, d'altra banda, no resulta afectada sensiblement (Roach et al. 1976).

S'ha estudiat la importància relativa dels diferents centres de fosforilació (Skurat et al. 1994), dels quals els més importants són els 2,2a, 3a i 3b. S'han descrit diferents quinases amb capacitat per fosforilar els diferents centres. Respecte els llocs de la cua N-terminal, el lloc 2 seria fosforilat per la quinasa depenent d'AMP cíclic (PKA) (P. Cohen and Hardie 1991), la quinasa depenent d'AMPK (Carling and Hardie 1989) o la fosforilasa quinasa (Roach et al. 1978). El lloc 2a seria fosforilat per la caseïna quinasa 1 (Flotow and Roach 1989), però només quan el lloc 2 està fosforilat (Skurat et al. 1994), ja que la seqüència diana d'aquesta quinasa és S(P)-X-X-S. Respecte els centres de l'extrem C-terminal 3a i 3b, sembla que la principal quinasa implicada en la seva regulació seria la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3) (Roach 1990). El lloc 3a també és fosforilat per la quinasa PASK (Wilson et al. 2005). S'ha descrit la interacció entre aquesta proteïna i GS, i tant la interacció com la fosforilació per PASK s'inhibirien en presència de glicogen.

La defosforilació de l'enzim és portada a terme, principalment, per un complex format per la subunitat catalítica proteïna fosfatasa 1 (PP1) juntament amb alguna de les subunitats reguladores. Mentre que la subunitat catalítica és ubiqua (Bollen 2001), existeixen isoformes teixit-específiques per a les diferents subunitats reguladores. La subunitat reguladora G_M s'expressa principalment en múscul esquelètic (Tang et al. 1991), la G_L s'expressa en fetge (Doherty et al. 1995) i la PTG (Berman et al. 1998; Printen et al. 1997) i la R6 (Armstrong et al. 1997) són ubíques. Recentment s'ha descrit la subunitat R3, que s'expressa en fetge i múscul cardíac de rata, i en múscul esquelètic, múscul cardíac i fetge humans (Munro et al. 2005). Les subunitats reguladores són capaces d'interaccionar amb PP1 i el glicogen a la vegada, aconseguint localitzar la subunitat catalítica al gra de glicogen. La unió de G_M amb PP1 augmenta la defosforilació de MGS, activant la síntesi de glicogen. S'ha descrit que, en resposta a adrenalina, G_M es fosforila, provocant que el complex G_M -PP1 es desfaci (Hubbard and Cohen 1993).

2.3.3 La regulació de l'HMGS per al·lostèricisme

Es coneixen diferents moduladors de l'activitat de MGS. Entre els inhibidors es troben diversos nucleòtids: ATP, ADP, AMP i UDP. El principal activador és la G6P. La zona responsable de l'activació al·lostèrica per G6P seria una zona rica en arginines (Pederson et al. 2000), corresponents als residus 579, 580, 582, 586, 588 i 591 de la MGS humana. Segons l'estructura de GS de llevat, la unió de G6P produiria un canvi conformacional (Baskaran et al. 2010) que faria el centre catalític accessible, afavorint la catàlisi i revertint la inactivació provocada per la fosforilació de l'enzim (Villar-Palasi and Guinovart 1997).

Aquest efecte de la G6P s'utilitza tradicionalment en les tècniques de determinació de la quantitat de GS d'una mostra i del seu estat d'activació. La

mesura de l'activitat sense G6P en el medi de reacció ens dona l'activitat I (independent de G6P), que seria l'activitat intrínseca de l'enzim i que dependria únicament del seu estat de fosforilació. D'altra banda, si es mesura l'activitat en presència d'una alta concentració de G6P (6.6 mM en el nostre cas) s'aconsegueix revertir els efectes de la fosforilació i obtenir l'activació màxima de l'enzim. D'aquesta manera es mesura l'activitat T (total), que serà l'activitat GS màxima que pot adquirir aquella mostra. Així, si es fa el quocient entre les activitats I i T s'obté el *ratio I/T*, que és un tant per u de l'activitat màxima de l'enzim, i s'indica el grau d'activació de la GS. Així, com més proper a 1 sigui el valor, més propera a l'activació màxima estarà la GS d'aquella mostra, reflectint una baixa fosforilació. En canvi, quan el valor s'apropa a 0 la GS es troba en un estat altament inactiu, reflex d'un alt grau de fosforilació.

2.3.4 L'HMGS i la fosforilació del glicogen

Recentment ha estat publicat un treball on es descriu com, durant la síntesi del glicogen, a més de la incorporació de grups glicosil al glicogen, també és capaç de transferir-hi un grup fosfat provinent de l'UDPG, formant monoèsters de fosfat als carbonis 2 o 3 d'un grup glicosil de la cadena de glicogen (Tagliabracci et al. 2011). Aquest procés seria un error en la síntesi de glicogen i es donaria amb una freqüència d'una vegada cada 10.000 residus de glucosa. La laforina, una fosfatasa que conté un GBD en la seva seqüència, seria capaç d'eliminar aquests grups fosfats del glicogen.

2.3.5 La degradació de l'HMGS

La laforina, juntament amb malina, també està implicada en la degradació de GS i altres proteïnes del gra de glicogen (Vilchez et al. 2007). La malina és una U3-ubiquitin lligasa que interacciona amb laforina, formant un complex que s'uniria al glicogen gràcies al GBD de la laforina. Ambdues proteïnes foren descobertes per la seva relació amb l'epilèpsia mioclònica progressiva o malaltia

de Lafora. La disfunció d'una de les dues proteïnes desencadena aquesta malaltia, caracteritzada per la formació de grans inclusions (cossos de Lafora) compostes per polímers de glucosa poc ramificats en axons i dendrites de les neurones. La malaltia es manifesta a l'adolescència, amb un progrés marcat per la degeneració del sistema nerviós, acabant amb la mort del pacient entre els primers deu anys després dels primers símptomes.

Encara no s'ha establert si la malaltia de Lafora és deguda a un problema en la defosforilació del glicogen o a la incorrecta degradació de la GS i altres proteïnes del gra de glicogen. La laforina està relacionada amb ambdós processos, però el fet que malina generi també la malaltia sense tenir cap paper en la defosforilació del glicogen deixa entreveure que la causa de la patologia estaria relacionada amb una incorrecta degradació proteïca.

2.3.6 La localització subcel·lular de l'HMGS

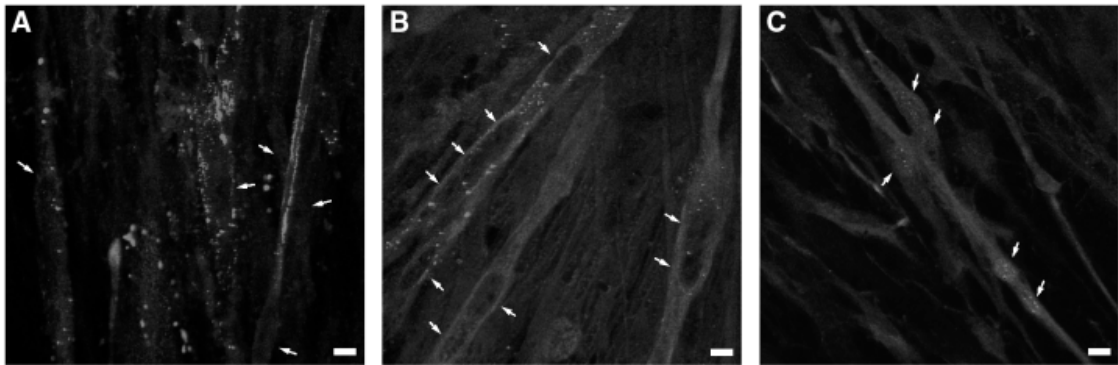


Figura 7. Immunocitoquímica contra la MGS endògena en cultiu primari muscular humà incubat amb 30mM glucosa (A), 22h sense glucosa (B) o 22h sense glucosa i una hora en 100 μ M forskolina (C). La depleció de glicogen fa que l'enzim transloqui des del citoplasma al nucli.

Al contrari que LGS, la localització subcel·lular de MGS no és únicament citoplasmàtica. Mentre la cèl·lula té dipòsits de glicogen, la MGS es localitza en el citoplasma cel·lular. Però tal com es va observa al nostre laboratori, quan les cèl·lules s'incuben sense glucosa, la fusió GFP-HMGS transloca al nucli cel·lular

(Ferrer et al. 1997), amb un patró nuclear puntejat. En estudis posteriors es va observar al translocació nuclear de MGS endògena en resposta a la depleció de glicogen en cultiu primari muscular (**Figura 7**) i en cèl·lules 3T3-L1 diferenciades a adipòcit (Cid et al. 2005). També es va observar una correlació inversa entre la translocació i el contingut de glicogen cel·lular, indicant que el glicogen podria estar actuant com a factor de retenció citoplasmàtic. Encara cal aclarir si és l'alta afinitat de l'enzim pel glicogen la responsable d'aquesta retenció citoplasmàtica pel glicogen o es deu a algun factor que es troba en el gra de glicogen.

No es va poder determinar quina part de la seqüència de MGS és utilitzada com a senyal per a l'entrada o sortida de MGS del nucli, tot i que es va observar que l'exportació nuclear es feia pel la via depenent de la proteïna CMR1. Diferents mutants de GFP-MGS amb algunes o totes les serines fosforilables mutades a alanina mantenen la seva capacitat de translocació, demostrant que aquest procés era independent de l'estat de fosforilació de l'enzim. Respecte el clúster d'arginines responsable de l'activació al·lostèrica, el mutant amb totes les arginines mutades a alanina transloca a nucli, però no és retingut i torna al citoplasma, acumulant-se al nucli només en presència d'inhibidors de la via d'exportació. Això suggereix que el clúster d'arginines no és important per a la translocació però sí per a la retenció nuclear de l'enzim.

Per últim, es va observar com la inhibició de la transcripció i de la síntesi de mARN mitjançant actinomicina D desfà el patró nuclear puntejat de GFP-MGS. Després de dues hores d'incubació amb aquest inhibidor, els cossos nuclears desapareixen i la senyal nuclear de GFP-MGS passa a ser difosa.

El sentit biològic de la translocació nuclear de l'HMGS segueix essent una incògnita, i més si es té en compte el seu cost energètic per a la cèl·lula. Com que aquest procés es dona en el moment en que s'exhaureix el glicogen de la cèl·lula, una situació de baixa energia, és intuïtiu pensar que la translocació

podria funcionar com a senyal nuclear de l'estrès metabòlic de la cèl·lula. Tot i així, no hi ha cap evidència que suggereixi que aquesta hipòtesi sigui certa.

2.4 L'estructura de la glicogen sintasa

2.4.1 La GS d'*Agrobacterium tumefaciens*, la primera GS cristal·litzada

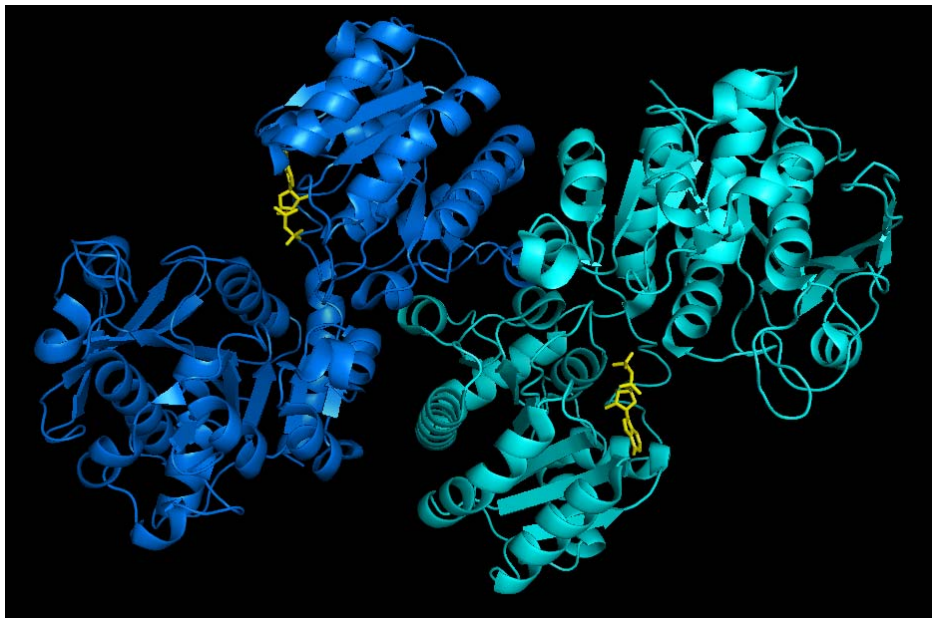


Figura 8. Dímer de la GS d'*Agrobacterium tumefaciens* (subunitats blava i cian) amb ADP (groc) unit.

La primera estructura de GS cristalitzada i resolta va ser la GS d'*Agrobacterium tumefaciens* (AtGS) (Buschiazzi et al. 2004) (**Figura 8**). L'enzim es compon de una subunitat amb dos dominis amb plegament de Rossman que s'agruparia formant dímers. Entre aquests dos dominis hi ha una escletxa profunda on es troba situat el centre catalític. L'enzim va ser cristal·litzat en conformació "oberta", que seria l'estat relaxat i inactiu de l'enzim, on l'escletxa que conté el centre actiu està oberta i els dominis separats. Els autors dedueixen, per comparació amb conformacions d'altres GTs, que la zona de l'escletxa funcionaria com a bisagra que permetria l'obertura i tancament de

l'enzim. En aquesta estructura també es va identificar el lloc d'unió del substrat donador, trobant-se ADP en un pocket al domini C-terminal.

El lloc d'unió a ADP seria el lloc on s'uniria el substrat donador ADPG en la sintasa. L'*AtGS* interacciona amb la base nitrogenada de l'ADP a través dels residus Ser296, Gly353, Tyr354, Asn355 i Ser359, uns residus que no es troben clarament conservats en les GSs eucariotes. En canvi els residus que interaccionen amb la ribosa, Ile297 i Thr381, i el grup fosfat en posició beta, Arg299, sí estan en zones d'alta conservació entre les GSs.

2.4.2 La GS de *Pyrococcus abyssi*, la GS d'arquea

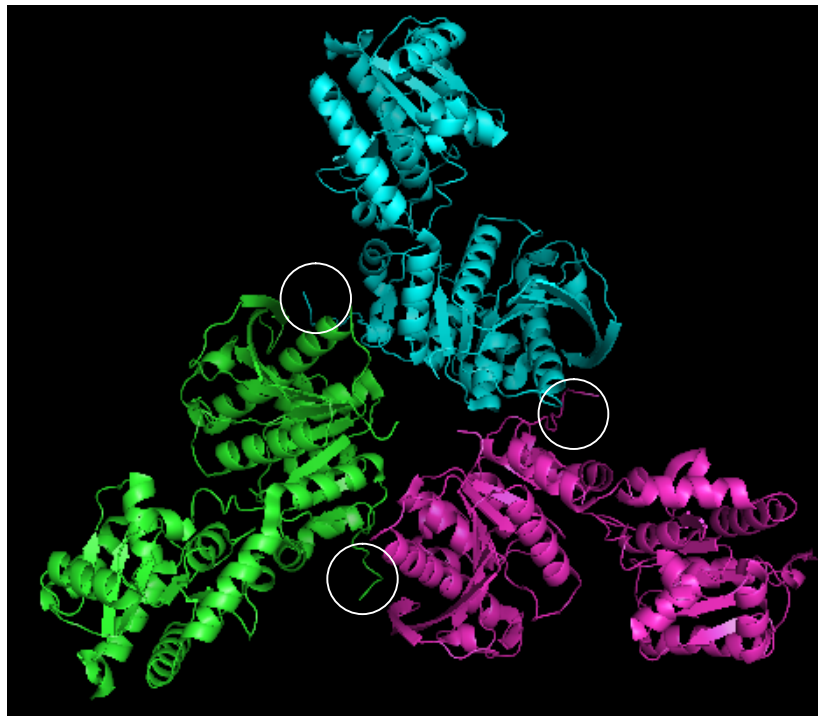


Figura 9. Estructura de la GS de *Pyrococcus abyssi*, que forma un trímer mitjançant la interacció amb les cues C-terminals (cercle) i el domini N-terminal de la subunitat veïna (PDB:2BIS).

Posteriorment, al nostre grup es va resoldre l'estructura de la GS de *Pyrococcus abyssi* (*PaGS*) (Horcajada et al. 2006) (**Figura 9**). El monòmer de *PaGS* té un plegament semblant a l'*AtGS*, compostat pels dos dominis amb

plegament Rossman formant una escletxa central on es situa el centre actiu. A diferència de l'AtGS, PaGS trimeritza per la interacció entre la cua C-terminal d'una subunitat amb un domini hidrofòbic situat al domini N-terminal de la subunitat veïna. Això fa que els dominis N-terminals estiguin fortament units uns amb els altres, mentre que el domini C-terminal té la llibertat de moviment suficient per ser el que es mogui en el pas entre les conformacions oberta i tancada de l'enzim. La geometria triangular del trímer té caràcter polar, definint-se una cara superior i una inferior, remarcada per la pròpia distribució de càrregues de l'enzim, que presenta una cara superior amb una càrrega majoritàriament positiva i una cara inferior cap a la qual s'encaren un gran nombre de residus àcids.

2.4.3 La GS d'*Escherichia coli*, la primera GS en conformació tancada

Uns anys després es van resoldre diferents estructures de la GS d'*Escherichia coli* (EcGS) (Sheng et al. 2009b) en diferents estats conformacionals que van donar força informació sobre el mecanisme catalític de la GS, es van descriure per primera vegada interaccions de l'enzim amb el grup acceptor, el grup glicosil del donador, i es van aconseguir importants indicis del quin és el paper específic dels diferents residus claus del centre actiu. Això va ser possible gràcies la cristal·lització d'una GS en conformació tancada, amb una rotació de 15° respecte la conformació oberta, mitjançant la incubació de l'enzim amb una molècula d'àcid 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-(2-hidroxipropà)sulfònic (HEPPSO) i ADPG (**Figura 10**). L'HEPPSO, que en principi només era part del tampó de cristal·lització, va resultar que s'incorporava com a anàleg estructural de l'acceptor del grup glicosil de la reacció catalitzada per GS. La interacció d'aquest anàleg amb l'enzim es fa a través dels residus Asp137 i Trp138 (**Figura 11; esquerra**), equivalents als residus Glu181 i Trp 182 de l'HMGS i que formen part d'una zona altament conservada. La interacció de l'HEPPSO amb l'enzim i

amb el grup glicosil del donador sembla crítica per al tancament de l'enzim, procés que crea un centre actiu competent.

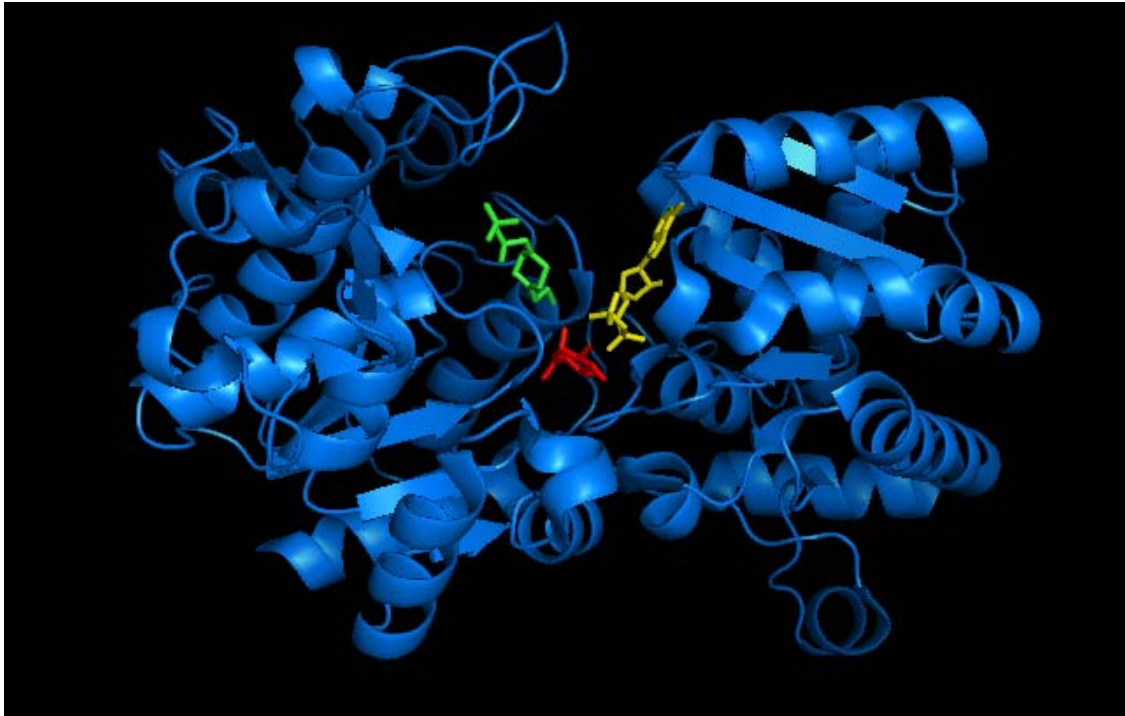


Figura 10. Estructura de la GS d'*Escherichia coli* en conformació tancada i unint les molècules d'ADP (groc), glucosa (vermell) i HEPPSO (verd) (PDB:2R4U).

El tancament de l'estructura crea noves interaccions entre els dominis N i C terminals entre Asn162 i Gln304, i entre Lys15 i Glu357. A més hi ha un desplaçament del loop format pels aminoàcids 376-381 per tal de deixar lloc al residu de glucosa del substrat donador, creant més interaccions entre els dos dominis de l'enzim a través del residu Pro378 i els residus Ser212 i Tyr215.

Al centre actiu de l'estructura tancada es detectà la presència d'una glucosa, en la posició que ocuparia el residu glicosil del donador, així com ADP, ambdós provinents de l'ADPG afegit durant la co-cristal·lització (**Figura 11; dreta**). Dels residus de l'EcGS que interaccionen amb l'ADP cal destacar els conservats en les GSs eucariotes: la lisina 15 (Lys39 en HMGS), que interacciona amb la ribosa, i els residus Gly18, Arg300 i Lys305 (Gly42, Arg331 i

Lys337 en HMGS), que interaccionen amb els gups fosfats. El residu de glucosa també interacciona amb els residus conservats en les GSs eucariotes His161 (His205 en HMGS) i Glu377. Aquest darrer és el primer glutàmic del motiu E-X₇-E de la *EcGS*, un motiu conservat en totes les glicogen sintases així com en altres glicosiltransferases, i seria l'equivalent al Glu510 de l'HMGS. Ja s'havia comprovat que aquest residu era crític, perquè el mutant E510A de l'HMGS és inactiu (Cid et al. 2000). Si es cristal·litza el mutant E377A d'*EcGS* en presència d'ADPG i HEPPSO s'obté una estructura igual a la de la forma salvatge excepte en què no es detecta la presència del residu de glucosa al centre actiu. Aquest fet demostra que el residu Glu377 té un paper crític a l'hora de posicionar el grup glicosil del donador per tal de portar a terme la catàlisi. El residu Glu377 interacciona també amb la Lys305, així que també podria intervenir en l'estabilització de la càrrega positiva d'aquest residu.

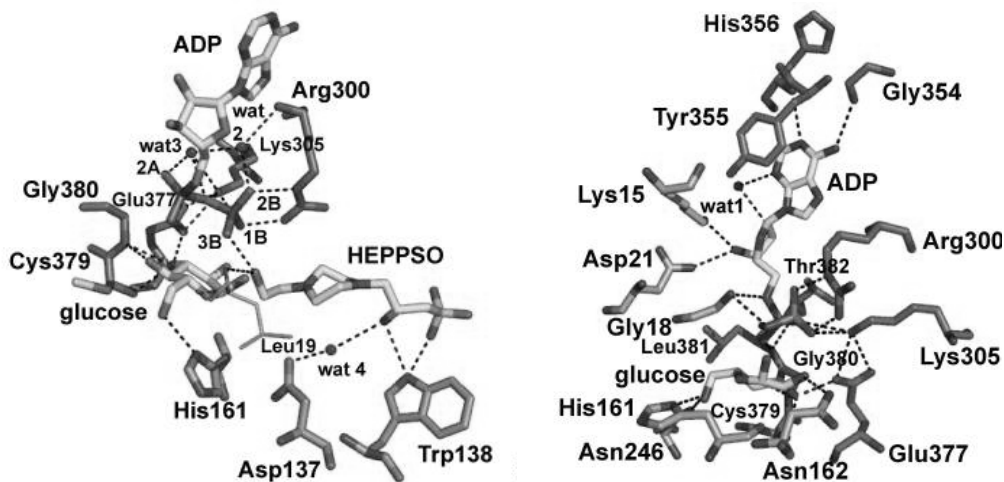


Figura 11. Dues vistes de l'ADP, glucosa i HEPPSO que es troben al centre actiu de l'estructura d'*EcGS* en conformació tancada juntament amb els residus que hi interaccionen (Sheng et al. 2009b).

2.4.4 El complex de la GS d'*Escherichia coli* amb maltooligosacàrids, els llocs d'unió a carbohidrats de GS

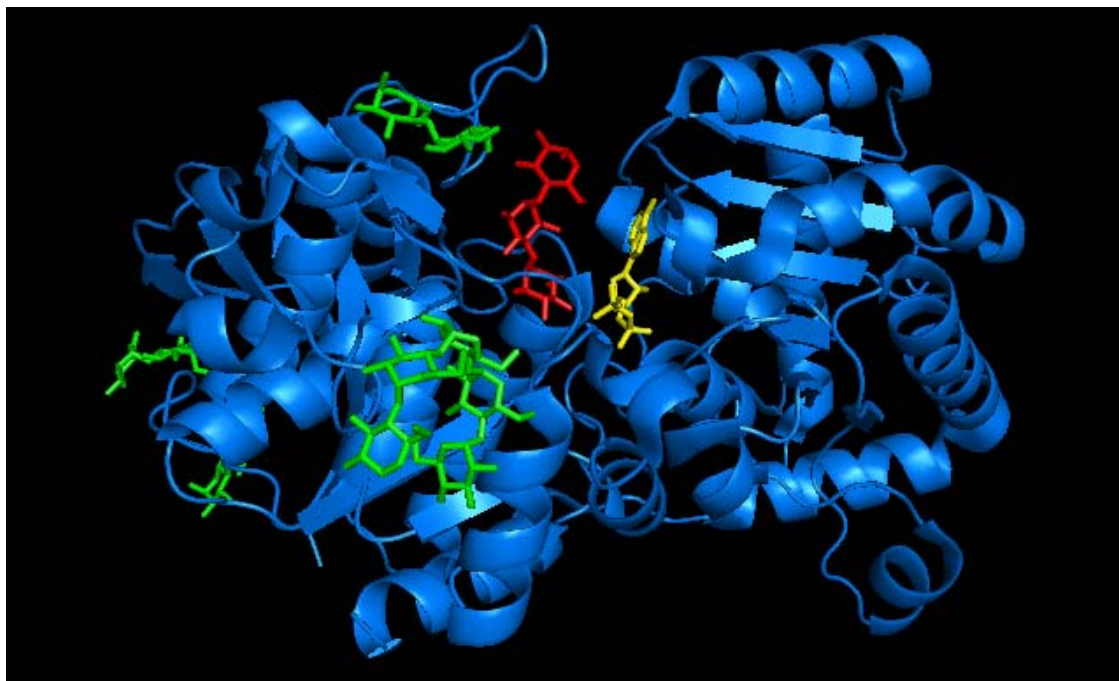


Figura 12. Estructura de la GS d'*Escherichia coli* amb una molècula d'ADP (groc), una maltotriosa al centre actiu (vermell) i tres llocs més d'unió a carbohidrats fora del centre actiu (verd) (PDB:3CX4).

Posteriorment es va cristal·litzar el mutant inactiu E377A de *EcGS* en presència d'ADPG i els substrats acceptors maltohexaosa i maltopentaosa (Sheng et al. 2009a) (**Figura 12**). L'estructura que es va obtenir va mostrar quatre oligosacàrids units a l'enzim. El primer era una maltotriosa unida al centre actiu al mateix lloc on també s'uneix l'HEPPSO en l'estructura anterior i mostra el mapa d'interaccions complet del que seria el lloc d'unió del grup acceptor (**Figura 13; lloc G6a**). La conservació d'aquestes interaccions mostra la seva gran importància. A més dels residus Asp137 i Trp 138, ja descrits per a l'HEPPSO, també interacciona amb altres residus conservats en les GSs eucariotes, com Glu9, Thr16, Gly17, Gly18, His139 i Arg300, els equivalents dels quals en HMGS són Glu31, Val40, Gly21, Gly42, His139 i Arg331 respectivament.

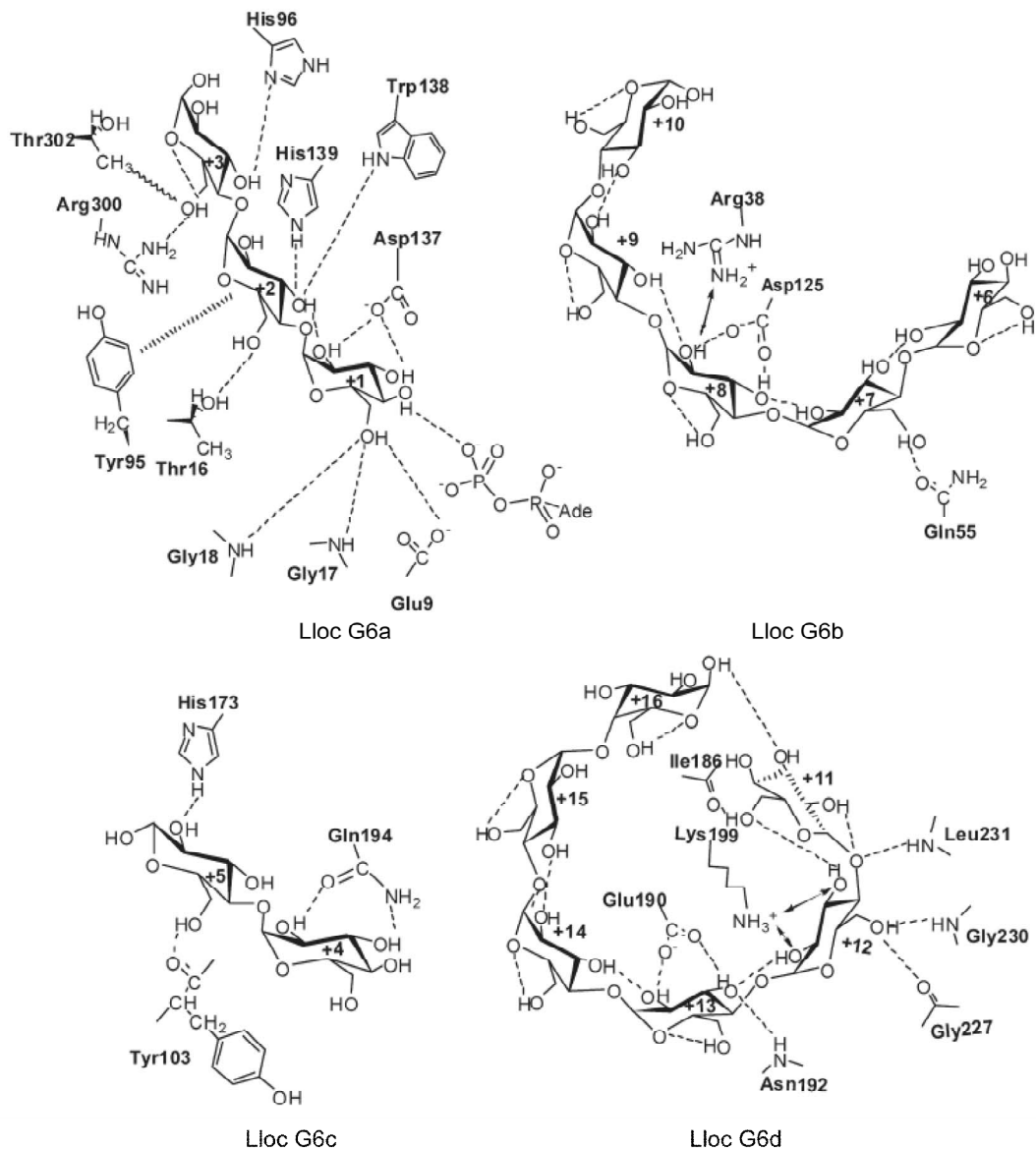


Figura 13. Mapa d'interaccions dels diferents llocs d'unió a carbohidrats trobats en l'estructura cristal·logràfica del mutant E377A d'*EcGS* (Sheng et al. 2009a). El lloc G6a seria el lloc d'unió de la cadena acceptora al centre actiu. Els llocs G6b, G6c i G6d es troben fora del centre catalític.

Els altres tres oligosacàrids s'uneixen amb disposició helicoidal a la superfície del domini N-terminal de l'enzim, descrivint així per primera vegada possibles llocs d'unió a oligosacàrids fora del centre actiu de la GS (**Figura 13; lloc G6b, G6c i G6d**). Si considerem aquests llocs d'unió com dominis d'unió a glicogen, és remarcable com l'enzim assegura la llibertat de moviments necessària per a canviar entre les conformacions tancada i oberta unint-se

només per un domini i deixant l'altre lliure. Tot i així, no hi ha cap evidència experimental que doni suport a la seva funcionalitat.

2.4.5 La GS de *Saccharomyces cerevisiae*, la primera estructura de GS eucariota i la regulació al·lostèrica per G6P

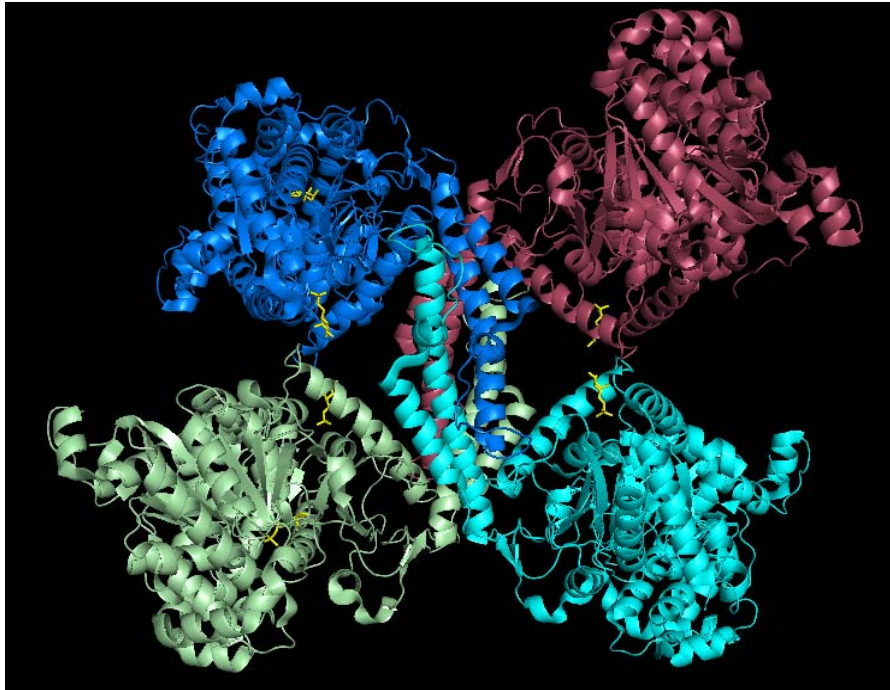


Figura 14. Estructura del tetràmer format per la isoforma 2 de la GS de *Saccharomyces cerevisiae* amb molècules de glucosa-6-fosfat (groc) unides (PDB:3NB0).

Recentment s'ha publicat l'estructura de la isoforma 2 de la GS de *Saccharomyces cerevisiae* (Gsy2p) (Baskaran et al. 2010) (**Figura 14**). Aquest ha estat un important avenç, degut a què es tracta de la primera estructura de GS eucariota que s'ha aconseguit. Respecte a les GSs bacterianes o d'arquea, la Gsy2p incorpora elements reguladors conservats a les GS d'organismes superiors, com la regulació al·lostèrica per G6P a través d'un clúster ric d'arginines o la regulació per fosforilació, ja que a la seva seqüència conté 3 serines fosforilables homòlogues als llocs 3a, 3b i 3c de l'HMGS. A més dels elements reguladors, Gsy2p mostra una inserció de dues hèlixs alfa al domini C-terminal que s'extenen cap a fora del tradicional plegament de Rossman. Aquest

nou domini, conservat en la resta de GSs eucariotes, és el responsable de la tetramerització de l'enzim i constitueix la major part de la interfície entre les subunitats de l'enzim.

Al treball es descriu l'estructura de Gsy2p amb i sense G6P, mostrant les modificacions estructurals derivades de l'activació de l'enzim per la unió del seu activador al·lostèric. La G6P s'uneix a Gsy2p, que interacciona amb el grup glicosil a través dels residus His280 i Gln283 d'una subunitat i amb el grup fosfat a través dels residus His286, Lys290, His500, Arg583, i Arg587 de la subunitat veïna. Aquestes dues darreres arginines formen part del clúster d'arginines ja descrit com a element important en la regulació al·lostèrica en la MGS de conill (Pederson et al. 2000). Aquesta unió de G6P provoca la creació d'una superfície d'interacció entre subunitats i porta a una sorprenent reorganització de l'enzim, que allibera les diferents subunitats de les limitacions de moviment en què es troba en l'estat basal i permet que aquestes puguin adoptar les conformacions tancada i oberta requerides per una unió eficient dels substrats i l'alliberament del producte.

En el mateix treball es va obtenir també l'estructura de Gsy2p amb UDP al lloc d'unió del donador. La ribosa i els grups fosfats interaccionen amb els residus Arg320, Lys326, Glu509, Thr514 i Glu517. La importància d'aquests residus es reflecteix en la seva conservació en totes les GSs. Els residus que interaccionen amb la base nitrogenada de l'UDP són Phe480, Leu481 i Tyr492 i estan totalment conservats per a les GSs eucariotes, però no en les GSs bacterianes. Aquesta diferència de residus podria ser determinant a l'hora de permetre la utilització d'ADPG o UDPG com a substrats donadors.

RESULTATS

1. EL DOMINI D'UNIÓ A GLICOGEN NO CATALÍTIC DE LA GLICOGEN SINTASA DE *PYROCOCCLUS ABYSSI*

1.1 Expressió d'una glicogen sintasa monomèrica de *Pyrococcus abyssi* funcional

El nostre grup (Dra. Adelaida Díaz) va clonar i purificar la forma monomèrica de la GS de *Pyrococcus abyssi* (PaGSmon). Per tal d'obtenir aquesta variant es va partir de la seqüència de la PaGS que, en la seva forma salvatge, trimeritza a través de la cua C-terminal (Horcajada et al. 2006). Es va realitzar una deleció dels residus compresos entre la glicina 427 i la leucina 437 a la seqüència de la PaGS i es va clonar en pauta en el vector pCold I, un vector d'expressió en bacteris que afegeix 6 histidines a l'extrem N-terminal de la proteïna.

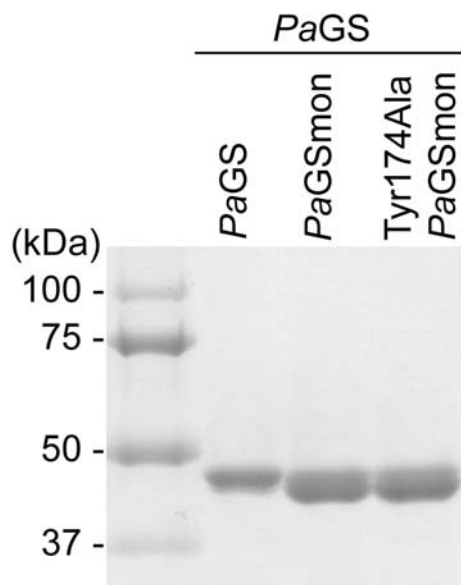


Figura 15. Gel SDS-PAGE tenyit amb reactiu de Coomassie amb mostres de la PaGS, PaGSmon i el mutant PaGSmon Y174A.

La proteïna va ser expressada en bacteris i purificada ajudant-nos de la cua de polihistidines, i es va obtenir una proteïna pura d'un pes aproximat de 45 kDa, tal com s'esperava (**Figura 15**). El rendiment de la purificació de la proteïna resultant, *PaGSmon*, va ser 10 vegades major que en el cas de la *PaGS* salvatge. Es va comprovar que la proteïna era funcional mitjançant la mesura de la seva activitat glicogen sintasa (**Taula I**). *PaGSmon* mostra activitat, que és igual a la de l'enzim salvatge a 37 °C, però que és 7 vegades menor a 80 °C. Aquesta davallada és atribuïble a una menor estabilitat tèrmica, ja que el pas de monòmer a trímer deixa exposada una cavitat hidrofòbica del domini N-terminal.

Taula I
Activitat específica *PaGS*

Temperatura (°C)	<i>PaGS</i> (U/mg)	<i>PaGSmon</i> (U/mg)	<i>PaGSmon Y174A</i> (U/mg)
37	1.02 ± 0.05	1.04 ± 0.06 (1.41 ± 0.10)	0.24 ± 0.04 (1.24 ± 0.08)
60	10.91 ± 0.62	5.05 ± 0.14	0.36 ± 0.07
80	38.25 ± 0.22	7.34 ± 0.46	0.51 ± 0.16

Es va utilitzar glicogen com a substrat acceptor excepte en els valors entre parèntesi, on es va utilitzar maltohexaosa 50mM com a acceptor.

1.2 Cristal·lització de la glicogen sintasa monomèrica de *Pyrococcus abyssi*

Va aconseguir-se la cristal·lització de *PaGSmon* en presència dels seus substrats, UDPG i maltohexaosa. La difracció del cristall va portar-se a terme amb èxit i l'estructura es va resoldre per reemplaçament molecular a una resolució de 2.6 Å (**Taula II**). La unitat asimètrica del cristall contenia dues subunitats amb els 426 residus de la *PaGSmon* organitzats de forma pràcticament idèntica a la conformació oberta vista en la subunitat A de l'estructura trimèrica de la *PaGS* salvatge (Horcajada et al. 2006).

Taula II
Captació de dades, resolució de la fase i refinament

Refinement		Captació de dades	
Resolució (Å)	25.0 - 2.6		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
R _{cryst} (%)	19.8		
R _{free} (%)	22.8		
Nombre d'àtoms		Dimensions de la cel·la	
Proteïna	6 788	a (Å)	103.6
Maltotetraosa	90	b (Å)	119.0
Glicerol	24	c (Å)	141.1
Potassi	6	Resolució (Å)	25.0 - 2.6 (2.74 - 2.6)
Clorur	6	Reflexions úniques	44 800
Aigua	97	I/σI	10.0 (2.8)
B-factors (Å ²)		R _{merge} (%) ^a	5.6 (45.0)
Proteïna	16.4	Completeness (%)	86.5 (83.5)
Maltotetraosa	88.8	Multiplicitat	4.8 (4.7)
Glicerol	78.2	Mosaicitat (°)	0.6
Potassi	77.6		
Clorur	64.7		
Aigua	37.4		
RMSD			
Llargades enllaç (Å)	0.022		
Angles enllaç (°)	1.98		

Els valors en parèntesi són pel shell de major resolució

$$^a R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I(hkl).$$

1.2.1 Centre actiu

Tot i que la cristal·lització es va portar a terme en presència d'UDPG i maltohexaosa, no es va trobar cap densitat electrònica en el centre actiu atribuïble a alguna d'aquestes dues molècules. En canvi, al centre actiu de l'enzim es van trobar dues molècules de glicerol, un ió clorur i un ió potassi (**Figura 16**). Està publicada una estructura del mutant E377A de la glicogen sintasa d'*Escherichia coli* (*EcGS*) (Sheng et al. 2009a) (PDB:3CX4) en presència d'ADP i d'una molècula de maltotriosa en el que podria ser el lloc d'unió de l'acceptor. Si comparem l'estructura del centre actiu de *PaGSmon* amb el centre actiu d'aquesta estructura d'*EcGS*, veiem com les molècules de glicerol s'uneixen a l'enzim de la mateixa forma que la molècula de maltotriosa que ocupa el lloc del substrat acceptor en *EcGS*. Per la seva part, els ions clorur i potassi es troben en posicions similars a les ocupades pels grups fosfat de l'ADP a l'estructura de l'*EcGS*. Tot i que els glicerols i ions ocupen les posicions equivalents dels substrats, són incapaços de mantenir l'enzim en conformació tancada com fan la maltotriosa i l'ADP en el cas de l'*EcGS*.

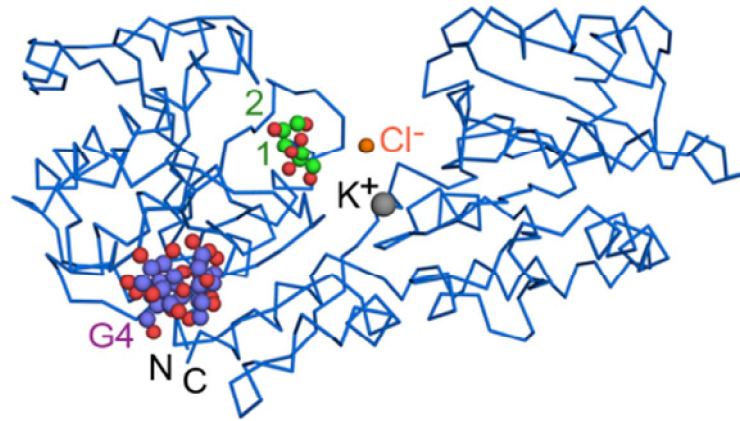


Figura 16. Estructura de la PaGSmon on es troben unides dues molècules de glicerol (verd), un ió potassi (gris), un ió clorur (taronja) i una molècula de maltotetraosa (blau) (PDB:3L01).

1.2.2 Lloc d'unió a carbohidrats

Tot i no trobar maltohexaosa unida al centre actiu, el mapa de densitat electrònica mostrava quatre molècules de glucosa unides a la superfície del domini N-terminal de PaGSmon (**Figura 16; Figura 17**), una posició allunyada del centre actiu. Aquestes glucoses pertanyien probablement a una molècula de maltohexaosa. Aquestes glucoses interaccionaven amb l'enzim per formació de ponts d'hidrogen amb els residus Lys157, Leu171, Asp176, Asp178 i Thr182 de l'enzim, així com per interaccions de Van der Waals amb els residus Pro173, Tyr174, His181 i Tyr185. Destaca molt el paper de la tirosina 174, que funciona com a carret al voltant del qual s'organitzen els diferents residus de glucosa.

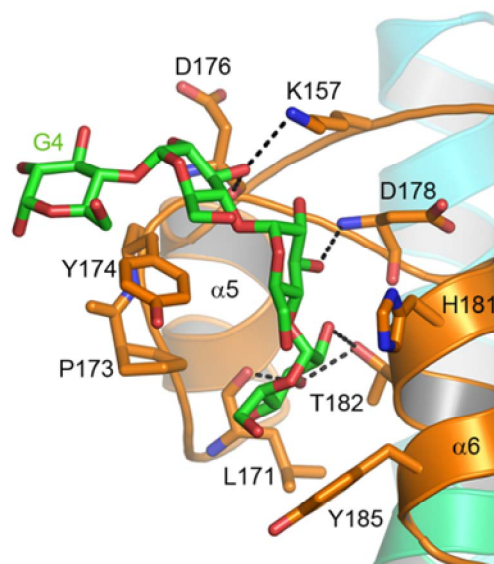


Figura 17. Detall del lloc d'unió de la maltotetraosa (verd) a PaGSmon, on s'indiquen amb línia discontinua els ponts d'hidrogen establerts entre el carbohidrat i la proteïna.

1.3 Mètode fluorescent per a la mesura de l'activitat glicosiltransferasa

Per a posteriors experiments necessitàvem un mètode de mesura de l'activitat glicosiltransferasa (GT) capaç d'utilitzar substrats acceptors petits. Els mètodes tradicionals de mesura de l'activitat glicogen sintasa, que no deixa de ser una activitat GT on s'utilitza glicogen com a substrat, s'aprofiten de la insolubilitat del glicogen en etanol 66%, la qual cosa permet purificar-lo després de la reacció pertinent. D'aquesta forma es realitza la reacció GS utilitzant glicogen com a substrat acceptor i ADPG o UDPG amb la glucosa marcada radioactivament com a substrat donador. Després del temps de reacció, es precipita i purifica el glicogen i es mesura la incorporació de glucosa radioactiva. Els oligosacàrids petits, com la maltohexaosa, no precipiten en etanol 66%. Si s'usen com a substrat de la reacció GT, es fa difícil la posterior separació i mesura del producte de la reacció. Per aquest motiu vam desenvolupar un nou assaig d'activitat GT, on el que es mesura és l'UDP alliberat resultat de la

hidròlisi de l'UDPG que es produeix en la reacció. Aquest UDP és transformat a UTP per l'enzim nucleòsid difosfat quinasa (NDPK), a la vegada que es consumeix una molècula d'ATP que donarà ADP (**Figura 18**). És aquest ADP el que finalment es mesura una vegada transcorregut el temps de reacció utilitzant el kit comercial ADP Hunter Plus de la casa comercial Discoverx. Amb aquest kit el que es fa és parar l'activitat quinasa de l'NDPK al temps desitjat i mitjançant una sèrie de reaccions acoblades cada molècula d'ADP acabarà donant una molècula de resorufina, un fluoròfor amb absorció a 530 nm i emissió a 590 nm. A l'assaig es realitza una corba patró d'UDP que cobreix el rang 0-150 μ M.

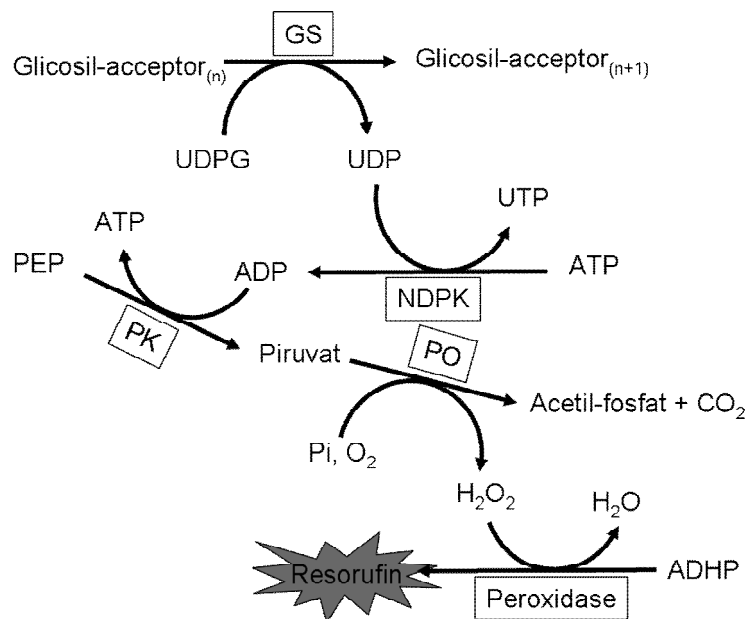


Figura 18. Esquema de les reaccions acoblades utilitzades en el mètode fluorescent de mesura de l'activitat glicosiltransferasa. GS: Glicogen sintasa, NDPK: Nucleòsid difosfat quinasa. PK: Piruvat quinasa. PO: Piruvat oxidasa.

Per tal de validar l'assaig es va mesurar l'activitat glicogen sintasa de diferents mostres amb continguts variables de *PaGSmon* utilitzant tant el mètode radioactiu tradicional com el nou mètode de mesura de l'activitat GT per fluorescència, utilitzant glicogen com a acceptor. La representació dels resultats obtinguts amb ambdós mètodes (**Figura 19**) mostra una bona correlació, validant així el mètode de mesura de l'activitat GT per fluorescència.

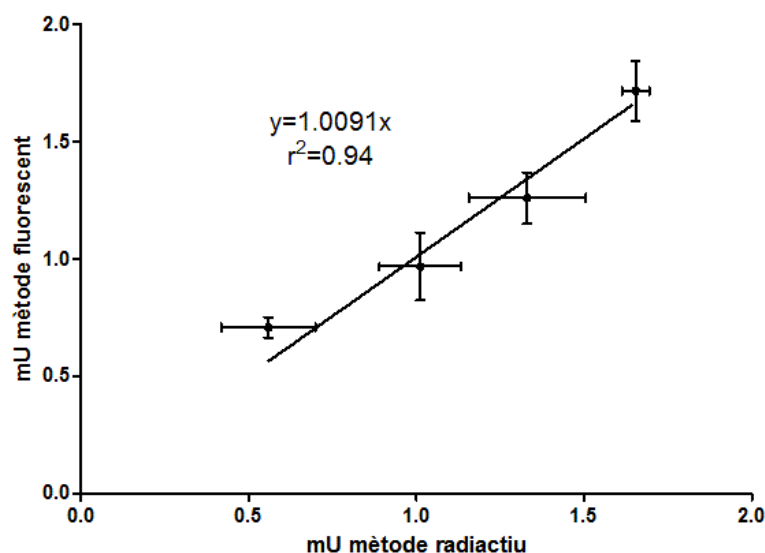


Figura 19. Correlació de la mesura de l'activitat glicogen sintasa de diferents mostres utilitzant el mètode radiactiu i el mètode fluorescent.

1.4 Estudi de la funcionalitat de lloc d'unió a carbohidrats de *PaGSmon*

El lloc d'unió a carbohidrats trobat a l'estructura de *PaGSmon* està allunyat del centre actiu, i això fa difícil que estigui directament relacionat amb el mecanisme de catàlisi. Per tant vam voler estudiar si aquest domini era funcionalment un lloc d'unió a glicogen. Es va generar un mutant on s'alterés l'arquitectura d'aquest nou lloc d'unió a carbohidrats per poder analitzar posteriorment l'efecte sobre l'activitat i afinitat respecte el glicogen. Com que la tirosina 174 semblava un residu crític d'aquest lloc d'unió, es va generar un mutant on aquest residu es mutava a alanina (Y174A). Aquest mutant es va purificar amb èxit, obtenint així *PaGSmon* Y174A (**Figura 15**). Per tal de definir la importància del residu Tyr174 en la unió de l'enzim a glicogen, es va realitzar un assaig de coprecipitació amb glicogen de la forma salvatge i el mutant Y174A de *PaGSmon* (**Figura 20**). En tots dos casos vam observar que en absència de glicogen la proteïna romaní al sobrenedant després d'una ultracentrifugació a

100000xg durant 90 minuts. En canvi, quan vam realitzar l'assaig en presència de glicogen, la forma salvatge es trobava al precipitat de glicogen resultat de la ultracentrifugació, mentre que el mutant Y174A es quedava al sobrenedant. Això suggeria una pèrdua d'afinitat de l'enzim pel glicogen.

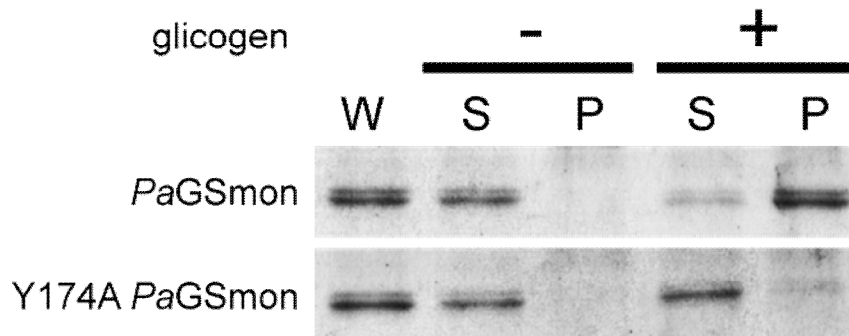


Figura 20. Gel SDS-PAGE gel tenyit amb reactiu de Coomassie amb les mostres resultants de la cosedimentació de *PaGSmon* i del seu mutant Y174A amb (+) o sense (-) glicogen. Càrrega inicial (W), fracció sobrenedant (S), fracció precipitada (P).

Aquest resultat apuntava clarament a la implicació funcional de la tirosina Tyr174 i, per extensió, del lloc d'unió a carbohidrats identificat a l'estructura, en la interacció entre el glicogen i l'enzim. Era, per tant, un domini d'unió a glicogen funcional.

Per tal de determinar l'efecte que té la pèrdua d'afinitat de l'enzim pel glicogen, el seu substrat acceptor per excel·lència, sobre l'activitat enzimàtica es va mesurar l'activitat glicogen sintasa de la forma salvatge i el mutant Y174A (**Taula I**). Vam observar que la mutació Y174A provocava una disminució en l'activitat glicogen sintasa de l'enzim d'entre quatre i catorze vegades, segons la temperatura de l'assaig. Per tal d'observar si l'efecte de la mutació Y174A sobre l'activitat de l'enzim era degut a una alteració del centre catalític o a una variació en la interacció entre glicogen i *PaGSmon*, es va mesurar l'activitat glicosiltransferasa de l'enzim utilitzant maltohexaosa com a acceptor. Aquest acceptor té una mida que impossibilita una interacció simultània entre el nou lloc d'unió a glicogen i el lloc d'unió del substrat acceptor al centre catalític. D'aquesta manera, es mesura l'activitat glicosiltransferasa intrínseca del centre

actiu, sense influència de zones de la proteïna allunyades del centre catalític. Tant la forma salvatge com el mutant Y174A de *PaGS*mon van donar valors similars d'activitat utilitzant maltohexaosa com a acceptor. Així vam demostrar que és la disminució de l'afinitat pel glicogen la que té un fort impacte en l'activitat específica de l'enzim.

1.5 Conservació del lloc d'unió a glicogen de *PaGS*

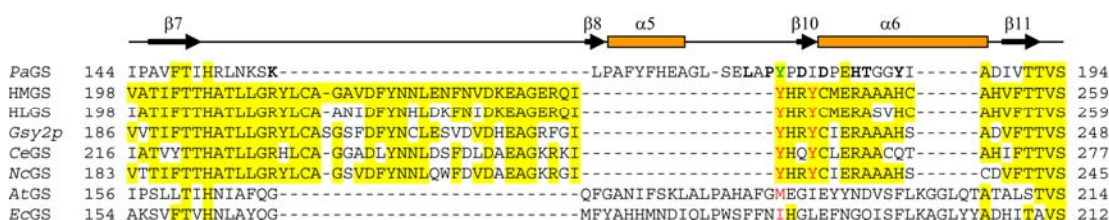


Figura 21. Alineament de seqüència basat en l'estructura de *PaGS* amb la glicogen sintasa muscular humana (HMGS), glicogen sintasa hepàtica humana (HLGS) i les glicogen sintases de *Saccharomyces cerevisiae* (Gsy2p), *Caenorhabditis elegans* (CeGS), *Neurospora crassa* (NcGS), *Agrobacterium tumefaciens* (AtGS) i *Escherichia coli* (EcGS) a la regió al voltant de la Tyr174. Amb fons groc s'indiquen els residus conservats. En verd està marcada la Tyr174 de *PaGS*. En vermell es marquen els residus que alineen amb la tirosina 174 de *PaGS*.

Es va realitzar un alineament de la seqüència aminoacídica de diferents GSs al voltant de la zona d'unió a glicogen de *PaGS*mon (**Figura 21**). Es va observar que aquesta és una zona altament conservada entre les GSs eucariotes i que aquestes també conserven el residu Tyr174 de *PaGS*, que es correspon amb la tirosina 228 de la isoforma 2 de la GS de *Saccharomyces cerevisiae* (Gsy2p) i, més interessant per nosaltres, amb la tirosina 239 de la glicogen sintasa muscular humana (HMGS). En canvi, aquest residu no es troba en les GSs bacterianes. Tot i així, si comparem els llocs d'unió a carbohidrats d'*EcGS* amb el lloc d'unió a glicogen de *PaGS* (**Figura 22**) veiem una alta conservació estructural tot i que la composició aminoacídica del domini difereix. De fet, en *EcGS* veiem com el paper de carret realitzat per la tirosina 174 en la *PaGS* el realitza el residu Ile186. També si comparem el lloc d'unió a glicogen de

PaGS amb la zona equivalent de *Gsy2p* veiem una similitud en els dominis i una conservació de la localització dins el domini N-terminal de la proteïna.

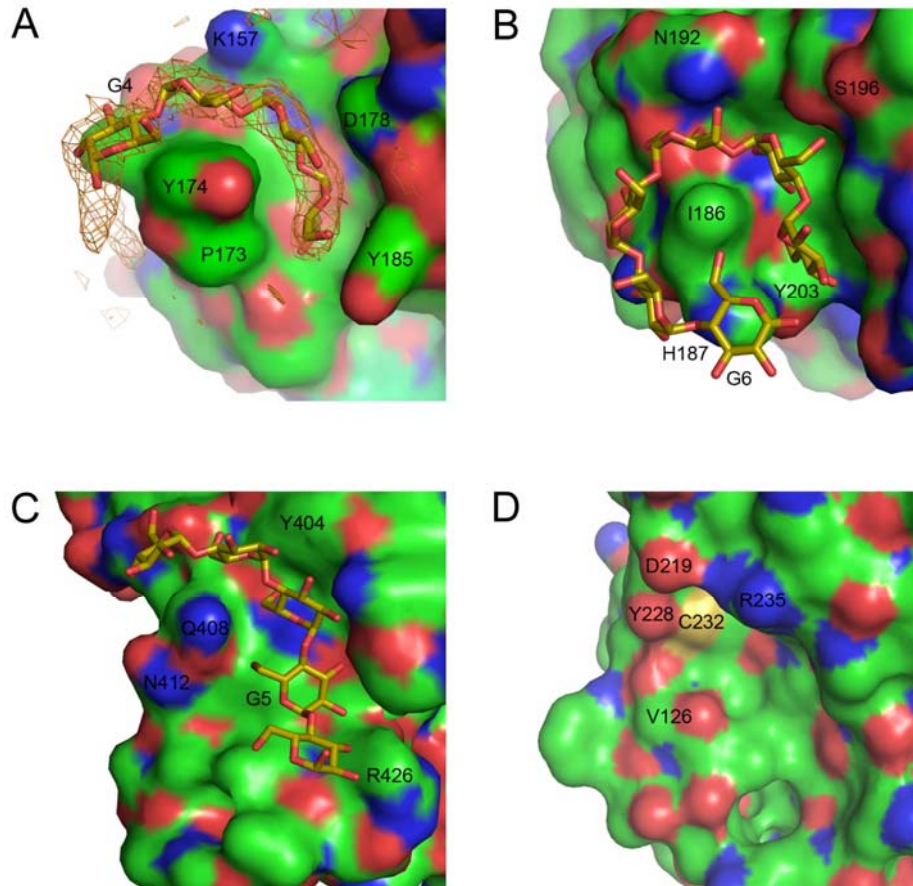


Figura 22. Lloc d'unió entre la maltohexaosa i *PaGS* (A) i el detall de les zones equivalents en *EcGS* (B), *GP* (C) i *Gsy2P* (D).

2. EL LLOC D'UNIÓ A GLICOGEN NO CATALÍTIC DE LA GLICOGEN SINTASA MUSCULAR HUMANA

2.1 Purificació de glicogen sintasa muscular humana recombinant

Per tal de portar a terme estudis funcionals amb l'HMGS necessitàvem produir aquesta proteïna en forma recombinant i purificar-la. Amb aquesta finalitat vam clonar la seqüència referència codificant de l'HMGS en el vector pDEST/N-SFTAP (Gloeckner et al. 2007) mitjançant el mètode de clonatge Gateway (Invitrogen). Aquest vector, dissenyat originalment per realitzar la tècnica *tandem affinity purification* (TAP), afegeix en N-terminal de la seqüència clonada un epítot FLAG i un epítot StrepTagII, de forma que permet la captura i purificació de l'enzim gràcies a l'alta afinitat exhibida entre l'epítot FLAG i l'anticòs anti-FLAG, i entre l'StreptagII i l'Strep-Tactin (una estreptavidina modificada). D'aquesta forma el vector expressarà la proteïna TAP-HMGS en cèl·lules de mamífer sota el control d'un promotor d'alta activitat com és el CMV. Vam aconseguir expressar i purificar la proteïna seguint el protocol especificat en l'apartat de materials i mètodes. Breument, es va transfectar la construcció pDEST/N-SFTAP_HMGS en cèl·lules de ronyó embrionari humà HEK293A, es va permetre que la proteïna s'expressés i després de deixar les cèl·lules tota la nit en medi sense glucosa, es va fer l'extracte d'aquestes cèl·lules i es va capturar la proteïna TAP-HMGS utilitzant la resina Strep-Tactin (IBA Tools). Després de nombrosos rentats, la proteïna va ser eluïda incubant amb una solució amb destiobiotina. Així vam obtenir l'enzim recombinant amb alta puresa (**Figura 23**).

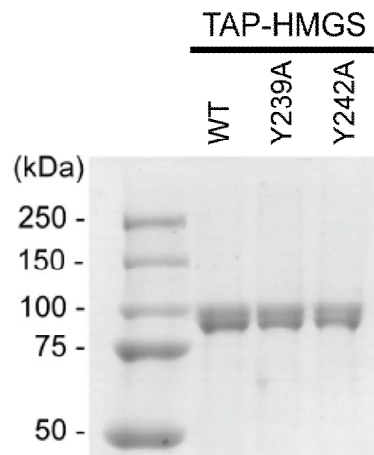


Figura 23. Gel SDS-PAGE tenyit amb reactiu de Comassie carregat amb mostres resultants de la purificació de la variant salvatge de TAP-HMGS (WT) i els mutants Y239A i Y242A.

2.2 Efecte de les mutacions Y239A i Y242A de l'HMGS sobre les constants cinètiques de l'enzim

Per tal de determinar si la tirosina 239 de la seqüència de l'HMGS, homòloga a la tirosina 174 de *PaGS*, també forma part d'un domini d'unió a glicogen, es va mutar el residu Tyr239 a alanina (Y239A) en el plàsmid pDEST/N-SFTAP_HMGS mitjançant mutagènesi dirigida. Es va observar també que a la seqüència de l'HMGS hi ha un altre residu de tirosina molt proper, Tyr242, així que també es va mutar aquest residu a alanina en el vector pDEST/N-SFTAP_HMGS, obtenint el mutant Y242A. Amb la construcció original i les obtingudes per mutagènesi es van expressar i purificar la proteïna recombinant TAP-HMGS salvatge (WT) i els mutants Y239A i Y242A (**Figura 23**).

Per avaluar l'efecte d'aquestes mutacions sobre l'activitat específica de l'enzim i l'afinitat per glicogen de l'HMGS, es va mesurar l'activitat glicogen sintasa d'aquestes proteïnes en un rang de concentracions de glicogen utilitzant l'assaig d'activitat radioactiu en presència de l'activador al·lostèric G6P per tal d'activar totalment l'enzim i obtenir mesures d'activitat independents de l'estat de

fosforilació de la proteïna. A partir dels resultats de les mesures es va representar la velocitat en funció de la concentració de glicogen (**Figura 24**) i es van ajustar els punts a l'equació de Michaelis-Menten, obtenint els paràmetres V_{max} i K_m de cada enzim (**Taula III**).

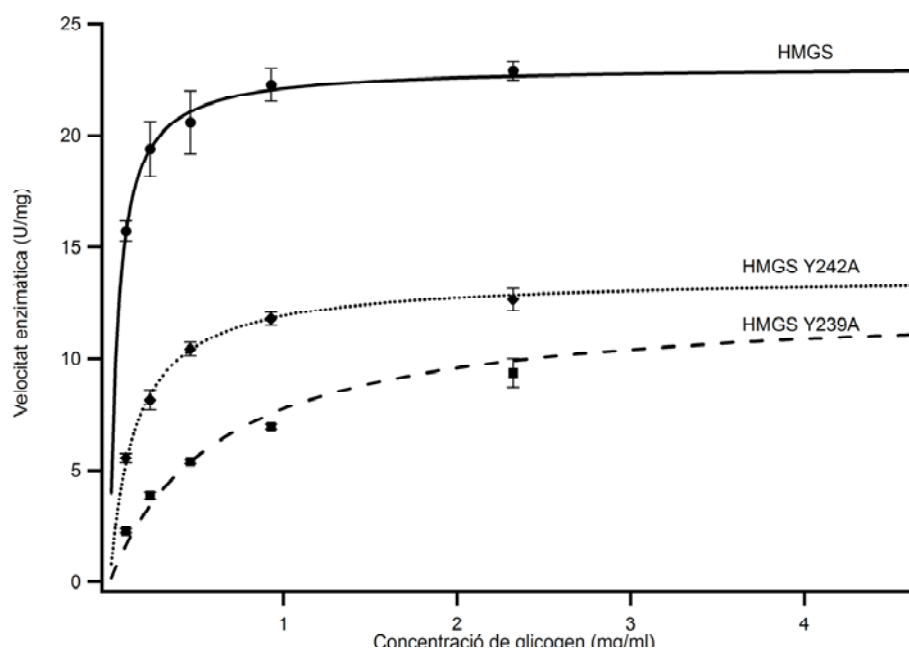


Figura 24. Mesures de la velocitat enzimàtica de la variant salvatge de TAP-HMGS i els seus mutants Y239A i Y242A amb diferents concentracions de glicogen i l'ajust del resultat de cada variant de la proteïna a l'equació de Michaelis-Menten.

La mutació Y239A provoca una disminució d'un 45% en l'activitat específica de l'enzim respecte a la seva forma WT i un augment de més d'un ordre de magnitud en la K_m pel glicogen, indicant una clara disminució de l'afinitat per aquest carbohidrat. En el cas de la mutació Y242A, observem una disminució d'un 41% en l'activitat i un augment de quasi quatre vegades en la K_m per glicogen respecte a la forma WT de l'enzim. De forma paral·lela a com vam procedir amb l'anàlisi de la mutació Y174A en *PaGSmon*, vam mesurar l'activitat GT de les diferents formes de TAP-HMGS utilitzant maltohexaosa com a acceptor per tal d'estudiar si les mutacions realitzades alteraven l'activitat intrínseca del centre actiu. Podem veure (**Taula III**) que TAP-HMGS WT i el mutant Y239A mostren la mateixa activitat quan usem maltohexaosa com

acceptor, mentre que el mutant Y242A mostra una lleugera disminució del voltant d'un 25% vers l'enzim salvatge. Aquests resultats indiquen les mutacions Y239A i Y242A no afecten directament al centre actiu. La disminució de la Km pel glicogen que mostren aquests mutants apunta a què aquests residus podrien tenir un paper en la interacció entre l'HMGS i el glicogen.

Taula III
Caracterització cinètica de les variants purificades de HMGS

Sample	Vmax (U/mg) ^a	Km pel glicogen (µg/ml) ^a	Activitat específica amb maltohexaosa 50mM (U/mg) ^b
HMGS	23.1 ± 0.2	44.4 ± 2.9	3.67 ± 0.10
HMGS Y239A	12.6 ± 0.6	623.1 ± 126.4	4.00 ± 0.31
HMGS Y242A	13.7 ± 0.2	146.1 ± 8.7	2.69 ± 0.30

^a Determinat per l'assaig radioactiu utilitzant glicogen com a acceptor

^b Determinat pel mètode fluorescent

2.3 Alteració de la localització subcel·lular de l'HMGS amb les mutacions Y239A i Y242A

Una vegada establert que les mutacions Y239A i Y242A tenien efectes sobre el comportament *in vitro* de l'HMGS, vam estudiar quins efectes tenien *in vivo*. A tal fi, es va clonar en pauta la seqüència codificant de l'HMGS salvatge en el vector pEGFP-C2, obtenint la seqüència per a l'expressió de GFP-HMGS, una proteïna de fusió entre la proteïna fluorescent verda (GFP) i l'HMGS. En aquest vector també es van portar a terme les mutacions Y239A i Y242A sobre la seqüència de l'HMGS mitjançant mutagènesi dirigida.

Vam sembrar cèl·lules de la línia cel·lular humana HeLa sobre cubreobjectes de vidre. Aquestes es van transfectar amb les construccions pEGFP-C2/HMGS WT o un dels mutants Y239A i Y242A utilitzant Lipofectamine

2000 (Invitrogen). Després de 24 hores d'expressió, les cèl·lules es van fixar durant 20 minuts amb paraformaldehid 4% en PBS. Sobre aquestes mostres es va realitzar una immunocitoquímica per a marcar el glicogen utilitzant un anticòs primari anti-glicogen i un anticòs secundari marcat amb el fluoròfor isotiocianat de tetrametilrodamina (TRITC). Els nuclis també es van marcar amb el fluoròfor 4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrat (DAPI). Vam procedir a observar les preparacions al microscopi confocal (**Figura 25**).

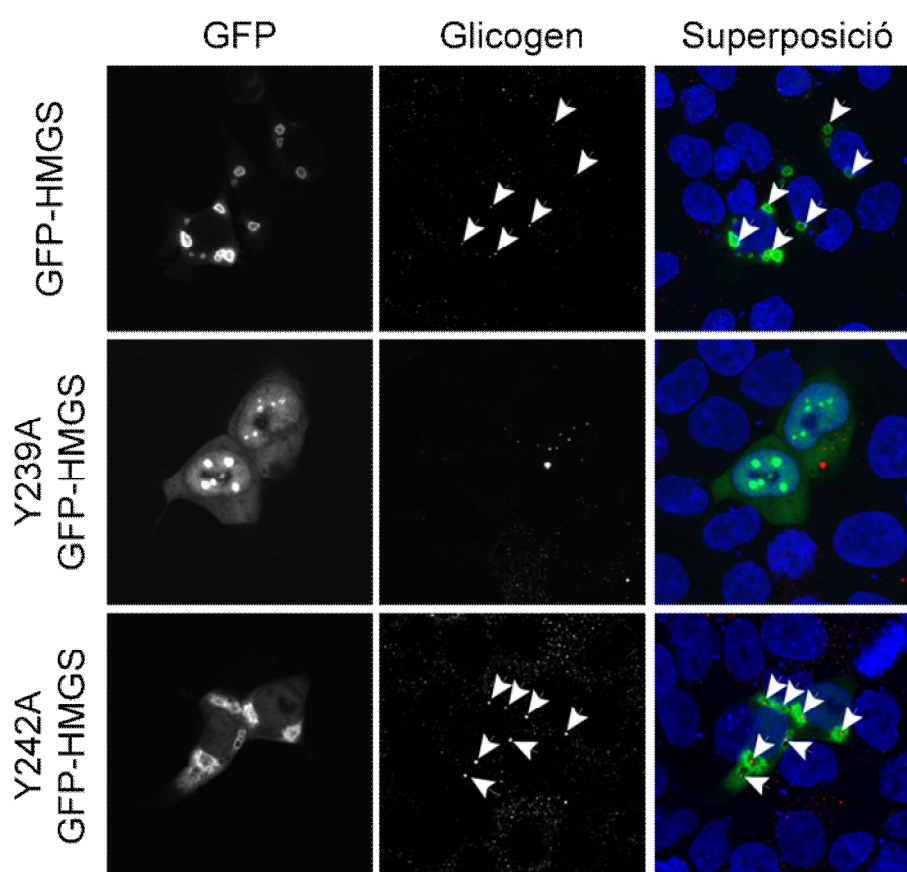


Figura 25. Imatges de microscòpia de fluorescència confocal amb cèl·lules transfectades amb GFP-HMGS salvatge o els seus mutants Y239A o Y242A (GFP en verd a la superposició), fixades després de 24h i subjectes a immunocitoquímica amb anticòs contra glicogen (vermell a la superposició) i marcatge nuclear DAPI (blau a la superposició). Amb caps de fletxa marquem senyal de glicogen que col·localitza amb senyal de GFP-HMGS.

En el cas de GFP-HMGS WT, l'enzim mostrava una localització estrictament citoplasmàtica i col·localitzava amb el senyal per glicogen. En el cas

del mutant Y239A s'observava l'enzim a dins del nucli de la cèl·lula formant agregats nuclears, un comportament similar al que té la forma salvatge de l'enzim quan no hi ha reservoris de glicogen dins de la cèl·lula (Ferrer et al. 1997). El mutant Y242A mostrava un comportament intermedi i trobàvem l'enzim al citoplasma, col·localitzant amb la senyal corresponent al glicogen, però també a dins del nucli cel·lular. Aquest resultat era consistent amb la disminució de la K_m per glicogen derivada de les mutacions Y239A i Y242A, on una pèrdua d'afinitat pel glicogen podia explicar aquest canvi en la localització subcel·lular de l'enzim.

2.4 Disminució de l'afinitat pel glicogen del mutant Y242A de l'HMGS

El comportament en la localització subcel·lular de GFP-HMGS Y242A semblava resultat d'una disminució de l'afinitat per glicogen respecte a la forma WT, però a diferència del mutant Y239A, encara semblava tenir afinitat suficient per unir-se als dipòsits de glicogen citoplasmàtics. El fet que el mutant Y242A encara es trobi unit al glicogen permetia estudiar l'afinitat mitjançant la tècnica de Recuperació de Fluorescència Després del Fotoblanqueig (FRAP; consultar materials i mètodes per a detalls sobre aquesta tècnica) mitjançant la mesura de la velocitat d'intercanvi de GFP-HMGS entre el gra de glicogen i el citoplasma. Com major fos l'afinitat de l'enzim pel glicogen més unit estaria al gra i més temps trigaria en deixar-se anar i bescanviar la seva posició per una nova molècula de GFP-HMGS. En la tècnica de FRAP això es traduiria en què, quan blanquegem un dipòsit de glicogen, com més triguí la molècula blanquejada (no fluorescent) unida a glicogen en intercanviar la seva posició per una nova molècula de GFP-HMGS del citoplasma (fluorescent), més tardarà en recuperar-se la fluorescència al gra de glicogen. Així, com més afinitat pel compartiment cel·lular, més es tarda en recuperar la fluorescència després del pas de blanquejament.

Vam sembrar cèl·lules HeLa en plaques MatTek amb fons de vidre, que permet el seu ús per a microscòpia de fluorescència. Aquestes cèl·lules es van transfectar amb GFP-HMGS WT o Y242A i es va deixar expressar la proteïna durant 24 hores. Aleshores es van realitzar els experiments de FRAP en els quals es blanquejava la GFP-HMGS d'un dipòsit de glicogen de la cèl·lula i es registraven les imatges de fluorescència durant uns 6 minuts. Després s'analitzaren les imatges amb el software ImageJ, mesurant la variació de la fluorescència amb el pas del temps en el dipòsit de glicogen blanquejat, així com en un dipòsit no blanquejat que va servir de referència. Les dades de fluorescència es van representar en funció del temps, es van ajustar els punts a un model exponencial i es van calcular els paràmetres de la corba resultant per a cada experiment, el temps mig de recuperació ($\tau_{1/2}$) i la fracció mòbil (A).

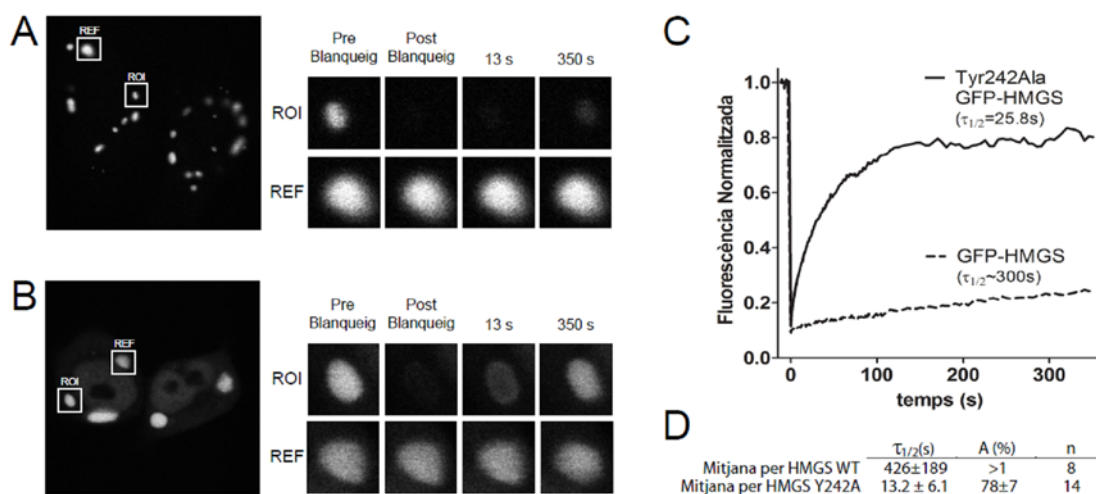


Figura 26. Experiment representatiu de FRAP de GFP-HMGS unida a glicogen utilitzant GFP-HMGS salvatge (A) i el mutant Y242A (B), mostrant la senyal de GFP-HMGS del dipòsit de glicogen blanquejat (ROI) i un no blanquejat (REF). Corba de recuperació de fluorescència de l'experiment representatiu (C). Taula resum dels valors mitjans obtinguts pels experiments de FRAP(D) amb els valors de temps mig de recuperació ($\tau_{1/2}$), fracció mòbil (A) i nombre de cèl·lules analitzades (n).

Els experiments de FRAP van mostrar que la mutació Y242A de l'enzim provocava una disminució d'aproximadament 30 vegades en el temps de recuperació de fluorescència. Vam observar que GFP-HMGS WT s'unia amb

altíssima afinitat al gra de glicogen, registrant-se una recuperació de fluorescència molt petita durant el temps de l'experiment (**Figura 26**). Aquesta poca recuperació va fer molt difícil ajustar les dades experimentals al model i obtenir els paràmetres. Tot i així es va poder fer una estimació del seu valor de $\tau_{1/2}$, que seria de 430 ± 190 s. En el cas del mutant GFP-HMGS Y242A vam observar una recuperació de fluorescència molt més ràpida. En aquest cas les dades podien ajustar-se bé al model exponencial, obtenint un valor de $\tau_{1/2}$ de 13.2 ± 6.1 s i una fracció mòbil de 78 ± 7 %. Així, el mutant Y242A mostrava un major intercanvi entre la fracció lliure citoplasmàtica i la fracció unida al gra de glicogen, indicant una menor afinitat pel glicogen en comparació a la forma salvatge de l'enzim.

2.5 Disminució de l'afinitat pel glicogen per la mutació Y239A de l'HMGS

Per tal de comprovar si la mutació Y239A produïa una disminució de l'afinitat de l'HMGS pel glicogen ens vam plantejar obtenir-ne una mesura directa. Per això vam recórrer a l'ús de la ressonància superficial de plasmó (SPR) (per a més detall consultar l'apartat de materials i mètodes). En el nostre cas l'estratègia va consistir en lligar covalentment anticòs anti-FLAG a la superfície metàl·lica del xip de SPR. Un cop fet, cada mesura consistia en les següents passes: primer s'unia al xip la variant desitjada de l'enzim TAP-HMGS a través de l'epítot FLAG que conté. Després es feia passar glicogen a la concentració desitjada i l'aparell registrava el glicogen que s'hi unia gràcies a què el fenomen de l'SPR produeix una senyal depenent de la massa sobre la superfície del xip. Així, a mesura que la TAP-HMGS anava unint les molècules de glicogen, la massa sobre la superfície del xip creixia i vèiem un augment en la senyal. Finalment, entre cada mesura es regenerava el xip desfent la unió entre l'anti-FLAG i la TAP-HMGS amb una solució de glicina 10 mM pH2, deixant

l'anticòs lliure per a tornar a unir nou enzim i assajar una nova concentració de glicogen.

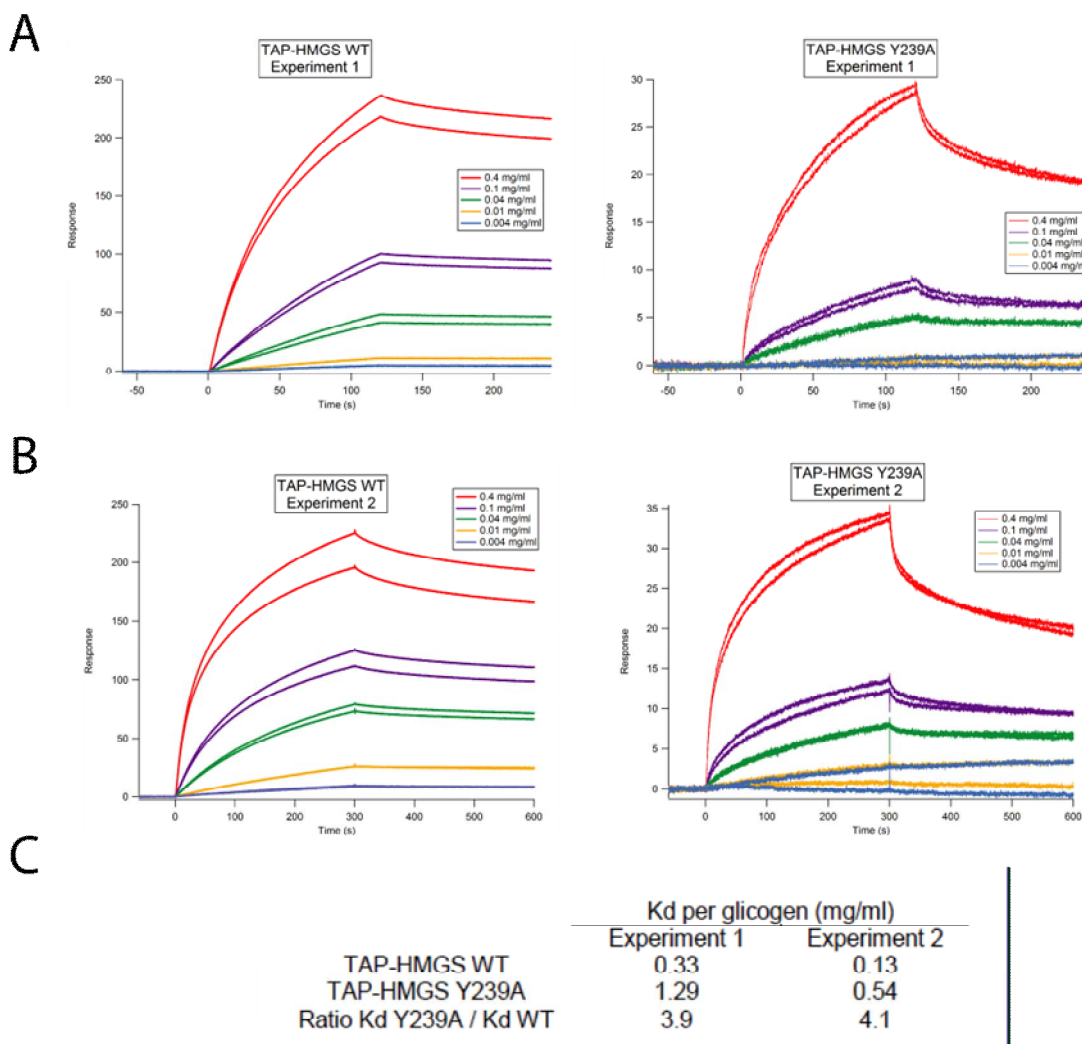


Figura 27. (A, B) Sensogrames d'unió entre glicogen i TAP-HMGS (salvatge o mutant Y239A) mesurada per SPR pertanyents a dos experiments diferents. (B) Valor de les constants d'afinitat Kd pels diferents experiments i enzims.

Es van aconseguir fer dos experiments amb un bon rang de resposta (**Figura 27; A i B**). En ambdós vèiem una menor resposta en el cas del mutant en comparació a la variant salvatge, que queda palesa en el canvi dels valors de resposta a cada concentració assajada. Per exemple, en el cas de 0.4 mg/ml, la

mutació Y239A provocava una disminució d'aproximadament deu vegades en la unió a glicogen. Cal remarcar que les corbes d'unió no arribaven a un estat estacionari. Es van intentar millorar augmentant el temps de contacte entre glicogen i TAP-HMGS de 120 s a 300 s, però tampoc així es va aconseguir arribar a un estat estacionari. Això fa que el càlcul de la constant d'afinitat que proporciona el software comercial de l'aparell utilitzat només fos orientatiu. En ambdós experiments el mutant tenia una constant d'afinitat quatre vegades major que la variant salvatge, tot i que els valors absoluts entre els experiments variaven bastant (**Figura 27; C**).

Fixant-nos en la fase de dissociació, també vèiem una corba de dissociació més pronunciada en el cas del mutant Y239A, reflectint una alliberació del glicogen més ràpida que en el cas de la variant salvatge, on la dissociació era extremadament lenta.

2.6 La unió a glicogen i el seu efecte sobre la catàlisi de l'HMGS *in vivo*

Una vegada establert que les mutacions Y239A i Y242A sobre l'HMGS afecten l'afinitat de l'enzim pel glicogen, ens vam preguntar quin efecte tindrien sobre l'activitat *in vivo* de l'enzim. Per avaluar-ho, sense haver de tenir en compte altres factors que afecten a l'activitat de l'enzim, com la inactivació per fosforilació, es van generar els mutants Y239A i Y242A del vector que codifica per la proteïna resultant de la fusió de GFP i la forma superactiva de l'HMGS (GFP-saHMGS) (Cid et al. 2005). Aquesta forma superactiva de l'HMGS té totes les serines fosforilables de l'HMGS mutades a alanina, impeding la inactivació per fosforilació.

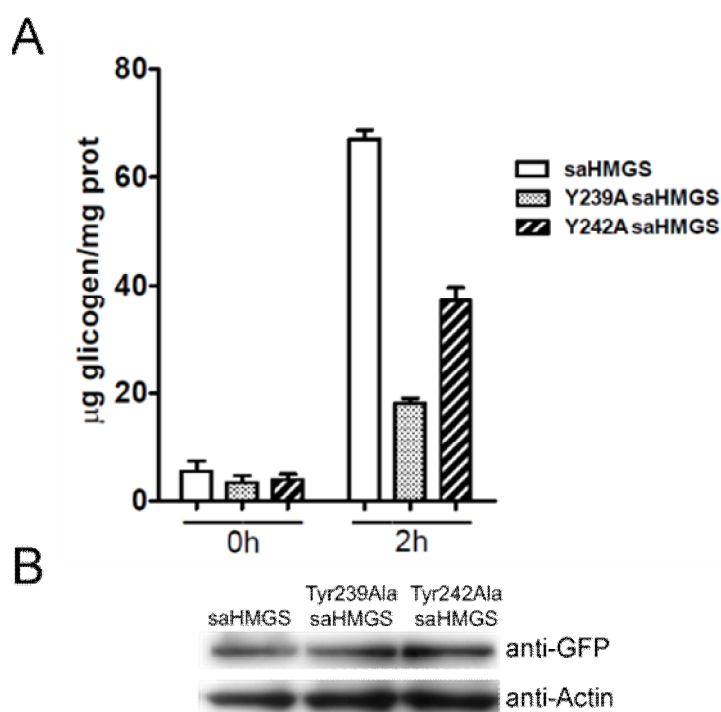


Figura 28. (A) Deposició de glicogen produïda per la transfecció de cèl·lules HeLa transfectades amb el mutant superactiu de GFP-HMGS (saHMGS) i les seves variants Y239A i Y242A abans (0h) i després (2h) d'una incubació de dues hores en 25 mM de glucosa. (B) Nivells d'expressió de les diferents variants de GFP-saHMGS i actina.

Es van sembrar plaques de 60mm de diàmetre amb cèl·lules HeLa i es van transfectar les diferents formes de GFP-saHMGS utilitzant Lipofectamina 2000. 24 hores després de la transfecció es van incubar les plaques tota la nit amb medi sense glucosa per tal d'exhaurir el glicogen. Aleshores es van congelar un grup de plaques a temps zero i les altres es van congelar després d'una incubació de 2h amb medi amb 25 mM de glucosa. Es va mesurar el glicogen d'aquestes cèl·lules (**Figura 28**). El glicogen a temps zero era menyspreable, ja que la incubació sense glucosa n'havia deplecionat les cèl·lules. Els valors de glicogen després de 2h d'incubació amb glucosa demostraven que les mutacions Y239A i Y242A tenien impacte sobre l'activitat *in vivo* de la GFP-saHMGS, ja que, respectivament, els valors es reduïen a una quarta part i a la meitat respecte GFP-saHMGS WT.

2.7 L'efecte de la glucosa-6-fosfat i l'estat d'activació de l'HMGS sobre l'afinitat pel glicogen

La presència de G6P disminueix en un 50% la K_m de la GS de llevat pel glicogen (Pederson et al. 2000). Vam voler determinar si aquest efecte es mantenia en el cas de l'HMGS. Amb aquest propòsit vam mesurar l'activitat de la variant salvatge de TAP-HMGS en un rang de concentracions de glicogen i en presència o absència de G6P 6.6 mM, la concentració utilitzada normalment per a activar totalment la GS en els assajos d'activitat. Per tal de millorar la sensibilitat de l'assaig radioactiu la purificació de l'enzim utilitzat en aquestes mesures es va fer en absència d'inhibidors de fosfatases per tal d'activar l'enzim. L'enzim purificat va mostrar un ratio I/T de 0.07. Els valors del ratio I/T l'enzim purificat en presència d'inhibidors de fosfatases es mouen al voltant de 0.01.

Amb aquest enzim vam determinar la K_m per glicogen en absència i presència de G6P, obtenint uns valors de 14 i 72 $\mu\text{g/ml}$ respectivament (**Taula IV**). Veiem com la presència de G6P, a diferència de la GS de llevat, disminueix l'afinitat de l'enzim pel glicogen.

Per tal d'estudiar si aquesta variació en l'afinitat per glicogen és deguda en realitat a l'activació de l'enzim i els canvis conformacionals que en deriven i no a un efecte directe de la G6P sobre la unió del glicogen, vam incubar una mostra de TAP-HMGS durant 2 hores a 37 °C en presència de fosfatasa alcalina (FA) per tal d'activar l'enzim a través de la seva defosforilació. L'enzim obtingut estava activat parcialment, amb un ratio I/T de 0.26. Aquest enzim parcialment activat mostrava una K_m pel glicogen de 26 $\mu\text{g/m}$ en absència de G6P i de 87 $\mu\text{g/m}$ en presència de G6P. Així, en un enzim més actiu observem també un augment en la K_m pel glicogen, tot i que en menor grau respecte a l'enzim més inactiu.

Taula IV
Km per glicogen en funció de l'activació de HMGS

Mostra	Cocient d'activitats I/T	Km per glicogen (μg glicogen/ml)		Cocient de Km
		- G6P	+ G6P	
HMGS WT	0.07	14 ± 1	72 ± 7	5
TAPHMGS WT tractada amb FA	0.24	26 ± 3	87 ± 7	3
TAPsaHMGS	1.1	52 ± 8	61 ± 6	1

Els valors de Km han estat calculats a partir de les mesures d'activitat glicogen sintasa en diferents concentracions de glicogen i ajustant aquests valors a la corba de Michaelis-Menten.

Per tal d'obtenir un enzim totalment actiu vam decidir que, enlloc d'incubar durant temps més llargs l'enzim en presència de FA, purificaríem la variant superactiva de l'HMGS (saHMGS), on tots els centres de fosforilació descrits han estat mutats a alanina. Així, vam clonar la seqüència codificant per saHMGS a dins del vector pDEST/NSFTAP en la pauta desitjada, per tal d'expressar així la proteïna de fusió TAPsaHMGS. En aquest cas l'enzim es va purificar amb un mètode lleugerament diferent a l'usat amb la soca salvatge, ja que es va obviar la incubació nocturna en absència de glucosa i es va substituir per una incubació amb amilasa de l'extracte cel·lular prèvia a la purificació (veure materials i mètodes). D'aquesta manera vam aconseguir una mostra d'enzim pur que estava totalment actiu, amb un ratio I/T de 1.1. Aquest enzim té una Km pel glicogen de $52 \mu\text{g}/\text{m}$ en absència de G6P i $61 \mu\text{g}/\text{m}$ en presència de glicogen. Així, l'afinitat d'aquest enzim no varia en presència o absència de G6P.

2.8 Modelització del lloc d'unió a glicogen de l'HMGS

Les GSs eucariotes estan força conservades a nivell de seqüència, suggerint que estructuralment tindran força semblança. La recent resolució de l'estructura de la isoforma 2 de la GS de llevat (Gsy2p) (Baskaran et al. 2010) ens permet tenir una idea força aproximada de com és l'estructura de l' HMGS. Per tal de fer-nos una idea més exacta de com és l'enzim humà, vam modelitzar l' HMGS utilitzant la Gsy2p com a motlle mitjançant el servei online de modelització SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) que ofereix l'Institut Suís de Bioinformàtica i el Biozentrum de Basilea.



Figura 29. Modelització de l'HMGS a partir de l'estructura resolta de Gsy2p. En vermell veiem la situació de la cadena lateral del residu Tyr239 i en verd la cadena lateral de Tyr242.

El model de l'HMGS obtingut (**Figura 29**) tenia la cadena principal estructurada d'una manera pràcticament idèntica a l'estructura de Gsy2p excepte en algun residu puntual i una zona del domini N-terminal on Gsy2p té una inserció de vuit aminoàcids que no trobem en l'HMGS. Observant amb més detall la disposició de les cadenes laterals, veiem que els residus Tyr239 i Tyr242 amb els quals treballàvem es trobaven situats al domini N-terminal, però només Tyr239 es trobava a la superfície de l'enzim, mentre que Tyr242 es

trobava amagat a dins del domini proteic, tot i que molt proper als aminoàcids exposats.

A



B

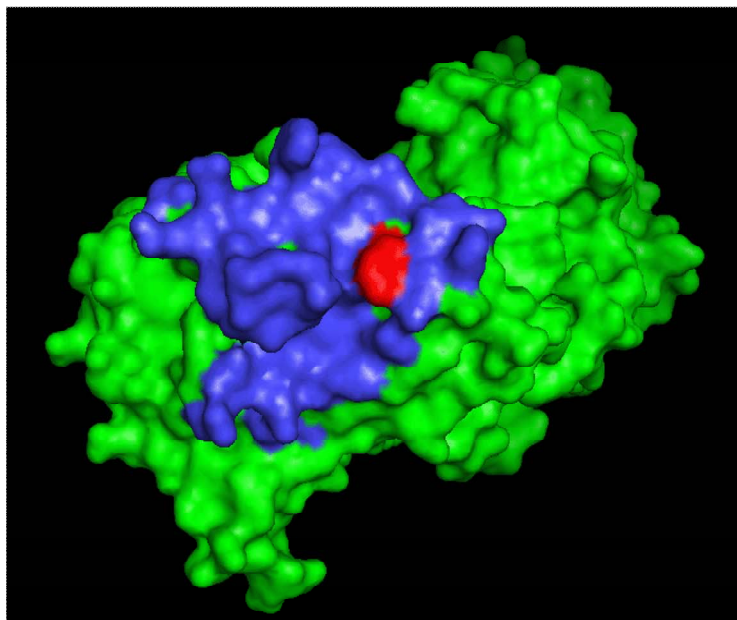


Figura 30. (A) Alineament de seqüència entre la isoforma 2 de la GS de llevat (Gsy2p) i la glicogen sintasa muscular humana (HMGS), marcant amb un requadre blau els residus que es troben a la superfície del model estructural obtingut per a l'HMGS. S'indica la posició del residu Tyr239 amb una fletxa vermella. Els residus conservats estan en fons groc i lletra vermella. Els residus similars estan en fons verd i lletra negra. Els residus no conservats estan en fons blanc i lletra negra. (B) Topologia del model estructural de l'HMGS, marcant en blau els residus superficials indicats a l'alineament superior i en vermell la situació del residu Tyr239.

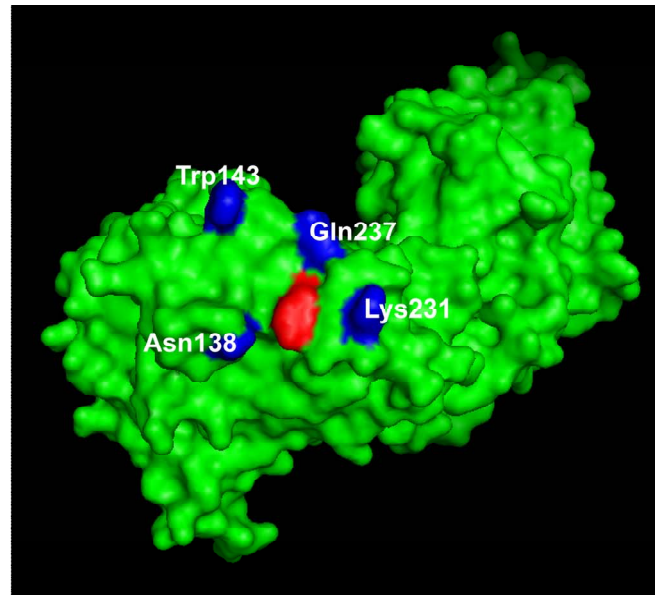
Aquest model també ens resultava útil per tal de predir quins altres residus de l'HMGS es podrien trobar a la superfície de l'enzim. D'aquests residus de superfície es pot pensar que els propers al residu Tyr239 també podrien formar

part del lloc d'unió a glicogen de l'HMGS i interaccionarien directament amb la cadena de carbohidrats. Fixant-nos en aquests residus (**Figura 30**), la zona més conservada era la més propera en seqüència al residu Tyr239, mentre que els aminoàcids superficials situats entre els residus 123 i 142 de l'HMGS mostraven menor conservació. Tenint en compte que la K_m per glicogen publicada per Gsy2p (Pederson et al. 2000), que es mou entre 3.4 i 1.1 mg/ml, és dos ordres de magnitud major a la que nosaltres mesurem per l'HMGS, vam pensar que aquesta zona menys conservada podria ser responsable de la diferent afinitat dels dos enzims pel glicogen.

2.9 Implicació dels residus Asn138, Trp143, Lys231 i Gln237 en la unió a glicogen

Per tal de trobar cap a on s'estén el domini d'unió a glicogen, vam decidir realitzar mutacions puntuals en diferents residus que al model es trobessin a la superfície, condició necessària per a la interacció amb el glicogen. L'altre criteri que vam seguir a l'hora de triar els aminoàcids va ser que les seves cadenes laterals tinguessin capacitat d'interaccionar amb carbohidrats. Finalment vam decidir mutar a alanina els residus Asn138, Trp143, Lys231 i Gln237 (**Figura 31; A**). Aquests aminoàcids ens semblaven rellevants per diferents raons. El residu Asn138 està encarat cap la Tyr239 i ambdós formen un canal per on podria passar la cadena de glucoses, la Gln237 està situada en la trajectòria més curta que hauria de fer la cadena de glicogen per arribar al centre actiu i la Lys231 i el Trp143 són residus amb una cadena gran encarada cap a fora i la seva disposició recorda a la Tyr174 que funciona de carret en el cas de *PaGS*.

A



B

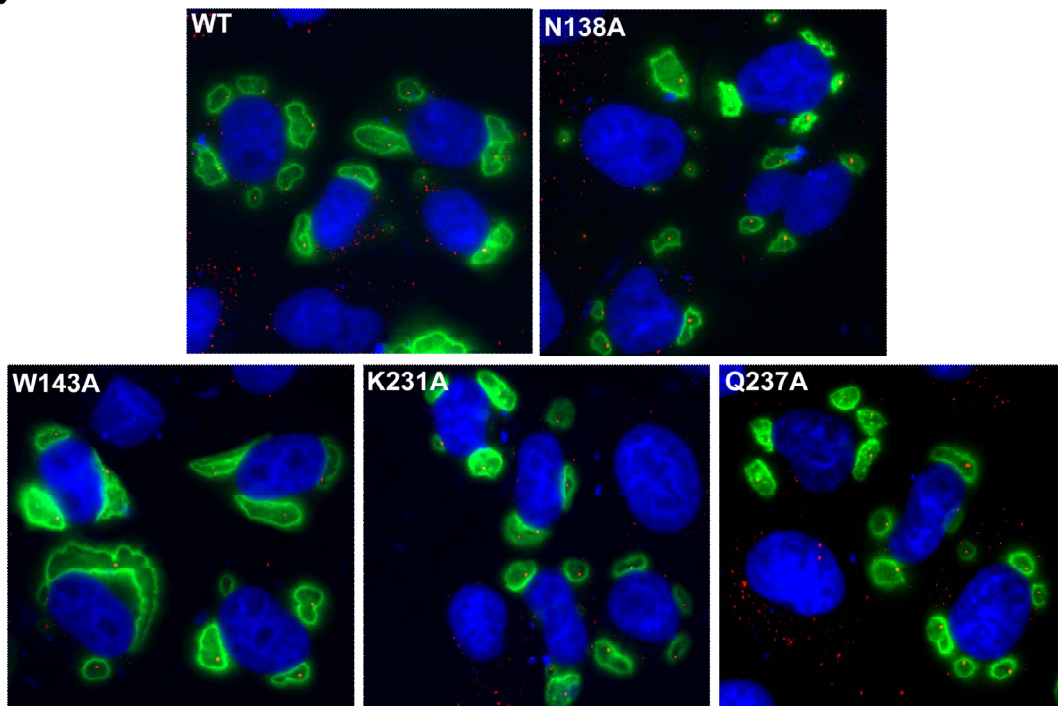


Figura 31. (A) Sobre el model generat de l'HMGS veiem etiquetats i marcats en blau els residus candidats a interaccionar amb glicogen. En vermell veiem la situació del residu Tyr239. (B) Imatges de microscòpia d'epifluorescència amb cèl·lules HeLa transfectades amb GFP-HMGS salvatge o els seus mutants N138A, W143A, K231A o Q237A (senyal verda), fixades després de 24h i subjectes a immunocitoquímica amb anticòs contra glicogen (senyal vermella) i marcatge nuclear DAPI (senyal blava).

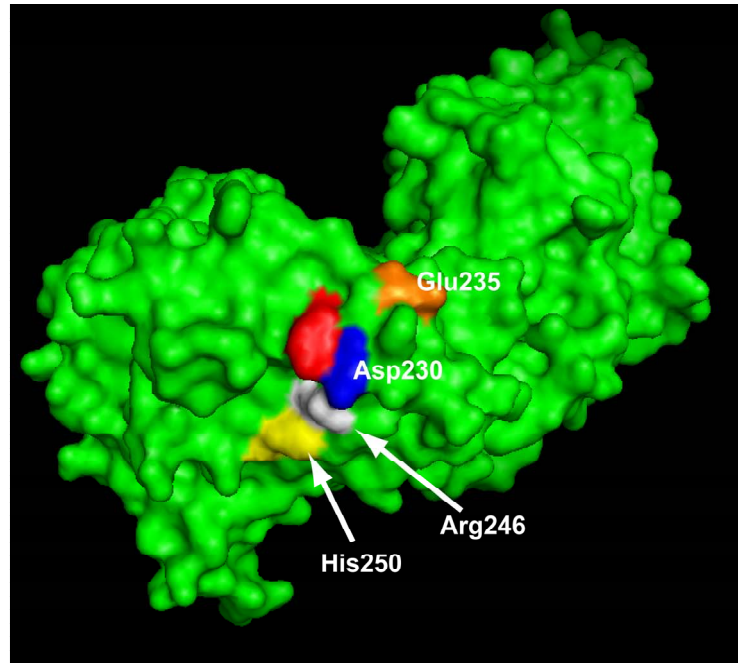
Vam transfectar cèl·lules HeLa amb cadascun dels mutants N138A, W143A, K231A o Q237A de la construcció GFP-HMGS. Després de deixar les cèl·lules durant 24 hores en medi amb glucosa es van fixar amb paraformaldehid 4% en PBS i es van sotmetre les mostres a immunocitoquímica detectant el glicogen amb anti-glicogen i marcant els nuclis amb DAPI. El resultat es va observar sota microscòpia d'epifluorescència (**Figura 31; B**). Cap de les mutacions realitzades va alterar la distribució subcel·lular de GFP-HMGS. Aquest resultat indicava o que cap dels residus estudiats era un aminoàcid crític en la unió entre l'HMGS i el glicogen o bé que el model generat a partir de l'estructura de la GS de llevat no és acurat.

2.10 Implicació dels residus Asp230, Glu235, Arg246 i His250 en la unió a glicogen

Per tal de posar a prova la fiabilitat del model generat i trobar cap a on s'extén el domini d'unió a glicogen de l'HMGS, vam realitzar noves mutacions sobre la seqüència de GFP-HMGS. Aquesta vegada vam elegir residus propers al residu Tyr239 i amb cadenes laterals amb capacitat d'interaccionar amb carbohidrats. Així, es van generar els mutants D230A, E235A, R246A i H250A de GFP-HMGS (**Figura 32; A**). Aquestes variants es van transfectar en cèl·lules HeLa i 24 hores després es van fixar. Per immunocitoquímica es va marcar el glicogen amb anti-glicogen i els nuclis amb DAPI.

L'observació de les cèl·lules amb microscopi d'epifluorescència (**Figura 32; B**) va mostrar que les mutacions D230A i R246A provocaven una alteració total de la distribució subcel·lular de l'enzim, que, tot i haver-hi glicogen al citoplasma de la cèl·lula, es localitzava a dins del nucli. Aquest resultat és similar a l'obtingut amb la mutació Y239A i apuntaria a que els residus Asp230 i Arg246 tenen un paper important en la interacció entre la GS i el glicogen. En el cas del mutant E235A de GFP-HMGS vam observar que l'enzim es trobava concentrat als dipòsits citoplasmàtics de glicogen, però també s'observava un augment de

A



B

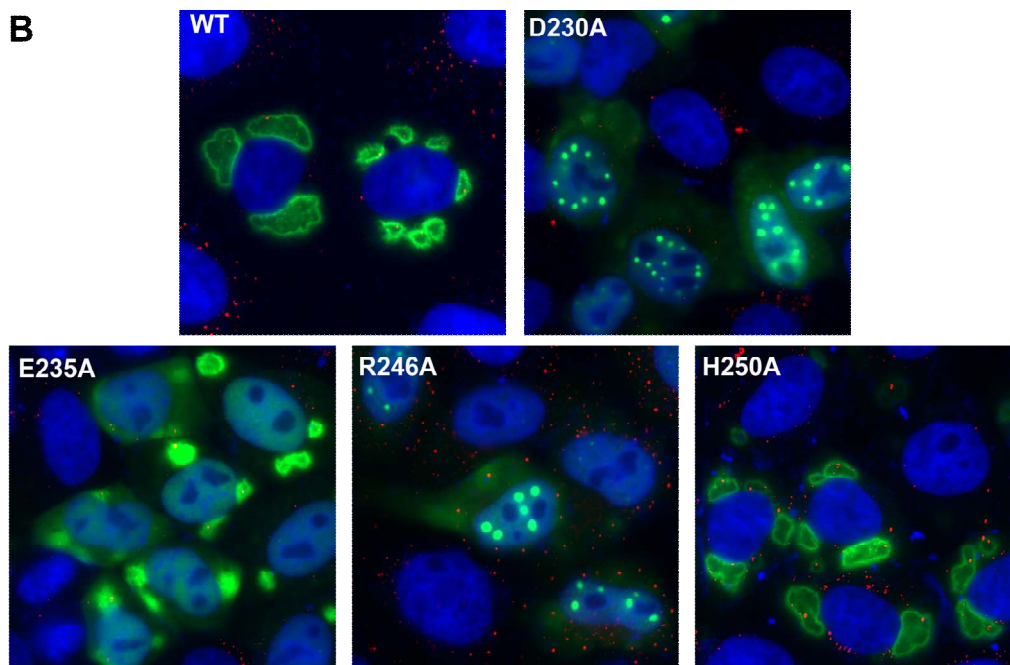


Figura 32. (A) Sobre el model generat de l'HMGS veiem rotulats i marcats en diferents colors els residus candidats a interaccionar amb glicogen. En vermell veiem la situació del residu Tyr239. (B) Imatges de microscòpia d'epifluorescència amb cèl·lules HeLa transfectades amb GFP-HMGS salvatge o els seus mutants D230A, E235A, R246A i H250A (senyal verda), fixades després de 24h i subjectes a immunocitoquímica amb anticòs contra glicogen (senyal vermella) i marcatge nuclear DAPI (senyal blava).

la senyal de fluorescència tant a la resta del citoplasma com a dins del nucli, però no s'arriben a observar cossos nuclears. Com que aquest resultat és similar a l'obtingut amb la mutació Y242A, podem pensar que l'efecte provocat per la mutació E235A és degut a una lleugera disminució de l'afinitat de l'enzim pel glicogen, però no suficient per a evitar que l'enzim s'uneixi al glicogen citoplasmàtic per complet. Per últim, la mutació H250A no va alterar la distribució subcel·lular de l'enzim.

3. EL DOMINI D'UNIÓ A GLICOGEN NO CATALÍTIC EN LA GLICOGEN SINTASA HEPÀTICA HUMANA.

Com ja s'ha comentat, tot i estar molt conservades a nivell de seqüència, les isoformes LGS i MGS tenen característiques diferenciadores a nivell de la seva localització subcel·lular o de la regulació de la seva activitat. Un cop establerta la importància de la unió a glicogen en l'activitat de l'enzim, vam estudiar si existia cap diferència entre els dos isoenzims en aquest apartat.

3.1 Anàlisi per FRAP de la unió entre l'HLGS i el glicogen

En primer lloc vam analitzar si LGS mostrava la mateixa afinitat que mostra MGS quan s'analitza mitjançant FRAP. A tal objecte es va clonar en pauta, a dins el vector pEGFP, la seqüència referència codificant per a la glicogen sintasa hepàtica humana (HLGS), obtenint així un vector que expressava en cèl·lules eucariotes la proteïna de fusió GFP-HLGS. Vam transfectar aquest vector en cèl·lules HeLa i vam incubar les cèl·lules en un medi amb glucosa durant 24 h després de la transfecció. L'anàlisi de l'expressió per western blot amb anticòs anti-GFP o amb l'anticòs L1, específic per a la LGS, va donar una sola banda (**Figura 34; B**).

També vam transfectar cèl·lules HeLa amb la construcció pEGFP/HLGS. Després de deixar expressar la proteïna durant 24 hores, vam fixar les cèl·lules amb paraformaldehid 4% en PBS. Vam sotmetre les cèl·lules a un protocol d'immunocitoquímica, marcant el glicogen amb anticòs anti-glicogen i els nuclis amb DAPI (**Figura 33; A**). Vam observar com la senyal de GFP-HLGS es trobava al citoplasma i col·localitzava amb la senyal pel glicogen.

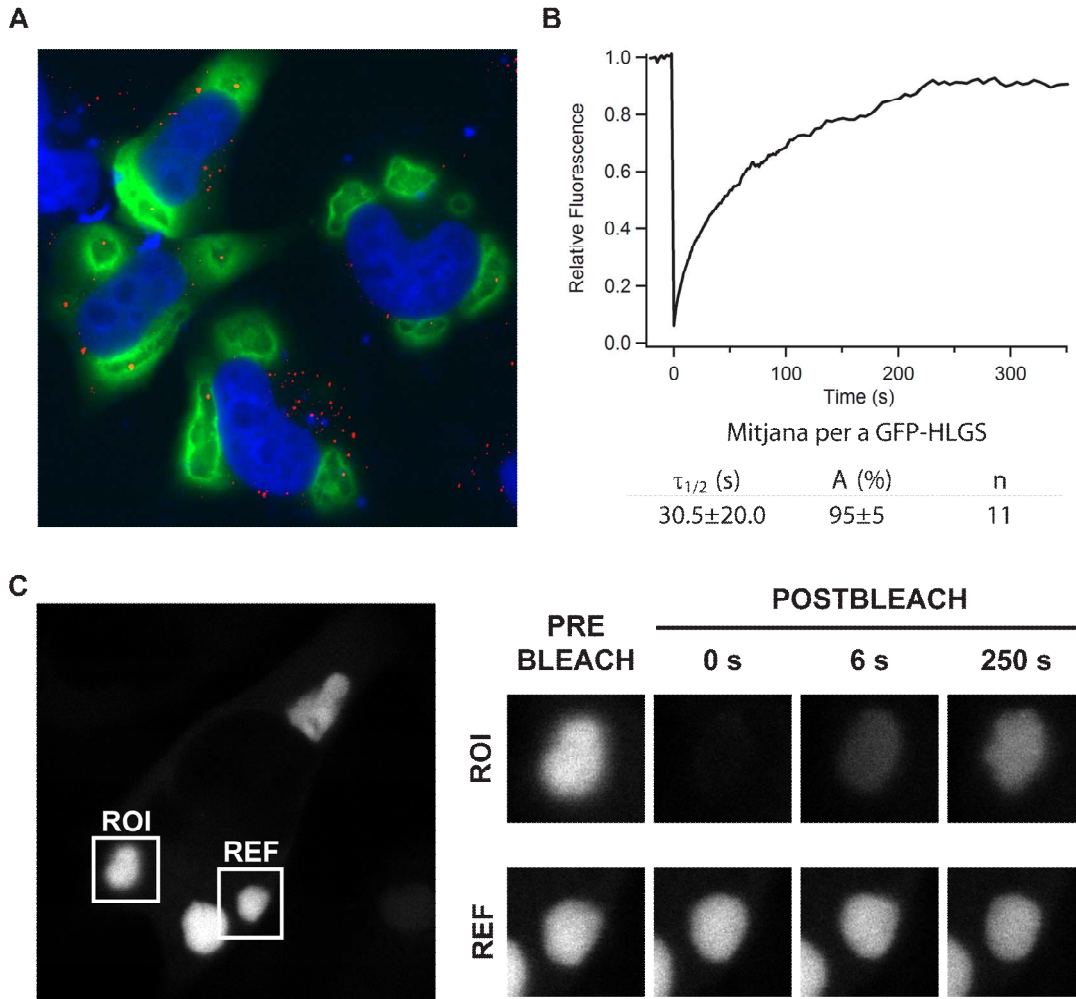


Figura 33. Expressió de la construcció GFP-HLGS i anàlisi de la seva afinitat pel glicogen mitjançant FRAP. (A) Cèl·lules HeLa incubades en 25 mM de glucosa sobreexpressant la construcció GFP-HLGS (verd), amb marcatge del glicogen amb anti-glicogen (vermell) i marcatge nuclear amb DAPI (blau). (B) Corba de recuperació de fluorescència d'un experiment representatiu de FRAP per a GFP-HLGS unida a glicogen i la taula dels valors globals obtinguts en els diferents experiments. (C) Imatges de l'experiment de FRAP representatiu en cèl·lules HeLa transfectades amb GFP-HLGS. ROI indica la zona fotoblanquejada. REF indica una zona no blanquejada. Veiem el progrés de la seva senyal abans i 0, 6 i 250 segons després del pols de làser blanquejant.

Una vegada comprovat que la proteïna GFP-HLGS expressada en HeLa s'unia als dipòsits de glicogen cel·lular, vam procedir a analitzar l'afinitat d'aquesta construcció pel glicogen mitjançant la tècnica de FRAP. De forma paral·lela a com ho vam fer per GFP-HMGS, vam transfectar la construcció pEGFP/HLGS en cèl·lules HeLa sembrades en una placa MatTek amb fons de vidre. 24 hores després de la transfecció vam realitzar les mesures de FRAP en

un microscopi confocal Leica SP5 a 37 °C i en atmosfera de 5% de CO₂. Vam prendre vint imatges d'abans del blanquejament, férem un pols de làser d'intensitat 100% per blanquejar la senyal de GFP-HLGS en una zona corresponent a un gra de glicogen i durant aproximadament sis minuts vam registrar imatges seguint la recuperació de fluorescència en aquest gra de glicogen.

El resultat obtingut va mostrar una ràpida recuperació de la senyal fluorescent de GFP-HLGS una vegada fotoblanquejat el dipòsit de glicogen (**Figura 33; B i C**). En el global d'onze mesures fetes els paràmetres de recuperació de fluorescència per a GFP-HLGS foren $\tau_{1/2} = 30.5$ s i una fracció mòbil del 95 %. Aquests valors mostraven una elevada mobilitat de l'HLGS i una menor afinitat pel glicogen en comparació als resultats obtinguts per GFP-HMGS.

3.2 Purificació de TAP-HLGS i càlcul de la seva Km pel glicogen

Per tal de comprovar *in vitro* si l'HLGS tenia una menor afinitat pel glicogen que l'HMGS, vam clonar la seqüència referència codificant per a l'HLGS en el vector pCDNA3/N-SFTAP, per tal d'obtenir un vector per expressar en cèl·lules eucariotes la proteïna de fusió TAP-HLGS, on TAP és una seqüència que conté els epítops FLAG i Strep-TagII. De la mateixa forma com vam purificar TAP-HMGS, procedírem a purificar la TAP-HLGS produïda en cèl·lules HEK293A. Analitzàrem la solució de proteïna purificada mitjançant SDS-PAGE i tinció amb Coomassie. Vam observar que la proteïna purificada donava una banda situada entre els marcadors de pesos moleculars de 75 i 100 kDa (**Figura 34**). Amb la tinció del gel també vam comprovar que la proteïna era altament pura. Analitzant la mateixa mostra per western blot amb anticòs anti-FLAG, L1 (anticòs contra LGS que reconeix un epítop del C-terminal) i MGS3 (anticòs contra MGS), vam comprovar que la proteïna era reconeguda pels anticossos

anti-FLAG i L1, però no MGS3. En el mateix gel vam carregar una mostra de TAP-HMGS purificada i vam comprovar que la senyal amb l'anticòs L1 és altament específica per a LGS.

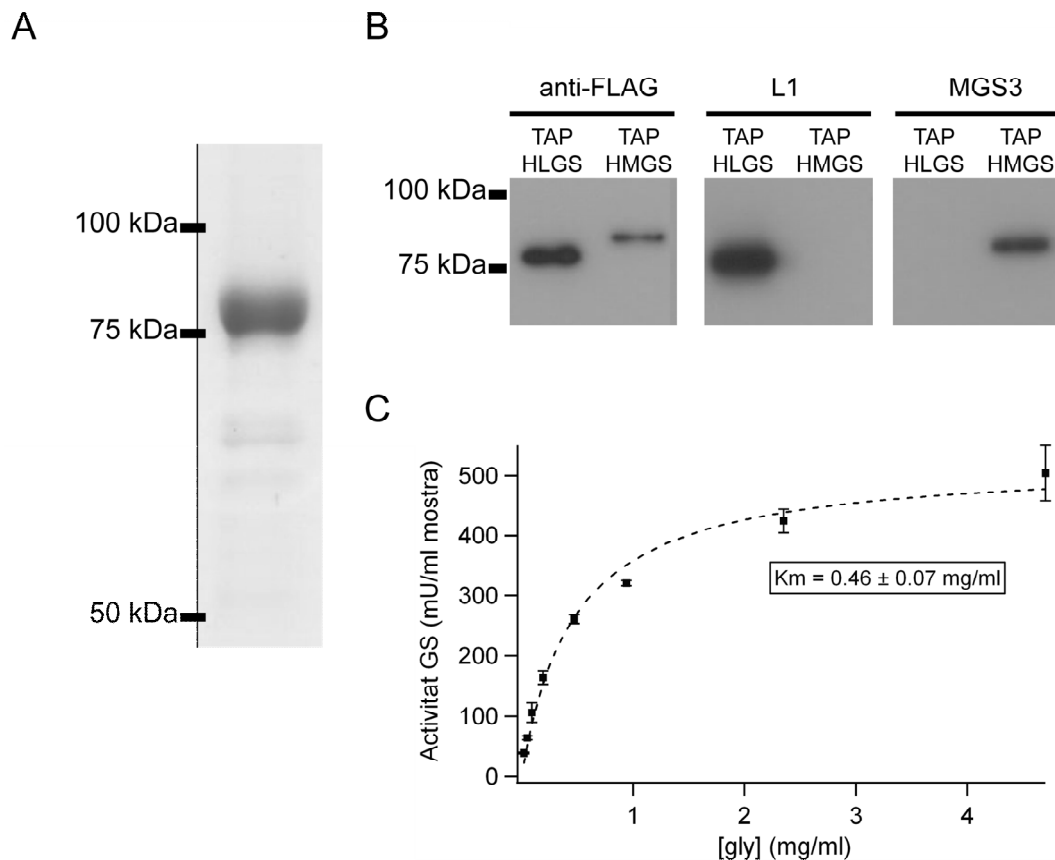


Figura 34. (A) Tinció Coomassie d'un gel SDS-PAGE amb una mostra de TAP-HLGS purificada. (B) Western blots amb mostres de les purificacions de TAP-HMGS i TAP-HLGS utilitzant anticossos anti-FLAG, L1 (anticòs contra LGS) i MGS3 (anticòs contra MGS). (C) Mesura de l'activitat glicogen sintasa en presència de diferents concentracions de glicogen, així com la corba resultant de l'ajust dels diferents punts a l'equació de Michaelis-Menten i el valor de K_m pel glicogen resultant.

Amb la mostra de TAP-HLGS purificada vam mesurar la seva activitat glicogen sintasa en presència de glucosa-6-fosfat en un rang de concentracions de glicogen. Es va representar el valor d'activitat en front de la concentració de glicogen i s'ajustaren els punts obtinguts a l'equació de Michaelis-Menten. A partir de la corba obtinguda es va calcular que TAP-HLGS tenia una K_m pel glicogen de 460 $\mu\text{g/ml}$, un ordre de magnitud per sobre dels valors que s'obtenen per a la isoforma muscular.

3.3 Estudi de les diferències en la seqüència aminoacídica del lloc d'unió en l'HMGS i l'HLGS

Les diferències d'afinitat pel glicogen entre MGS i LGS observades eren molt remarcables, sobretot tenint en compte l'alt grau de similitud entre ambdós enzims. La unió de MGS al glicogen semblava dependre del lloc d'unió on es troba el residu Tyr239. En el model d'estructura generat per a MGS vam poder entreveure els residus al voltant de la Tyr239 que podrien ser superficials. Fent un alineament de seqüència entre l'HMGS i l'HLGS i fixant-nos en aquests residus de la superfície, vèiem, com en el cas de Gsy2p, que els residus propers en seqüència a la Tyr239 estaven força conservats. En canvi, la zona compresa entre els residus superficials 127-144 de l'HMGS, residus més llunyans dins la seqüència però estructuralment propers, estaven menys conservats (**Figura 35; A**). Aquesta zona podia ser, per tant, la que feia de l'HMGS un enzim més afí pel glicogen que no pas l'HLGS. Per això ens vam plantejar intercanviar una part d'aquests dominis d'unió a glicogen (GBD) entre els enzims HMGS i HLGS i veure si érem capaços d'intercanviar a la vegada les seves afinitats pel glicogen. Així, a GFP-HMGS li vam substituir el aminoàcids que van des de Asp135 a Tyr144 (la seqüència DTCNIGVPWY, que anomenarem muscGBD) per la seqüència compresa entre els residus Glu136 i His145 (la seqüència EACSVGIPYH, que anomenarem hepGBD) i viceversa. Així vam obtenir les construccions GFP-HMGS-hepGBD i GFP-HLGS-muscGBD (**Figura 35; B**).

Per comprovar si les proteïnes s'expressaven tal com s'esperava, vam transfectar cèl·lules HeLa amb les diferents construccions i vam deixar expressar la proteïna durant 24 hores. Després vam fer l'extracte proteic, vam realitzar SDS-PAGE amb ell i ho vam analitzar mitjançant western blot amb diferents anticossos (**Figura 35; C**). Amb l'anti-GFP vèiem banda en totes les construccions, com era d'esperar. Amb L1 reconeixíem totes les construccions d'HLGS, ja que L1 reconeix un epítip que es troba a la cua C-terminal de l'enzim. El mateix succeeix amb MGS3, que donava senyal per a totes les

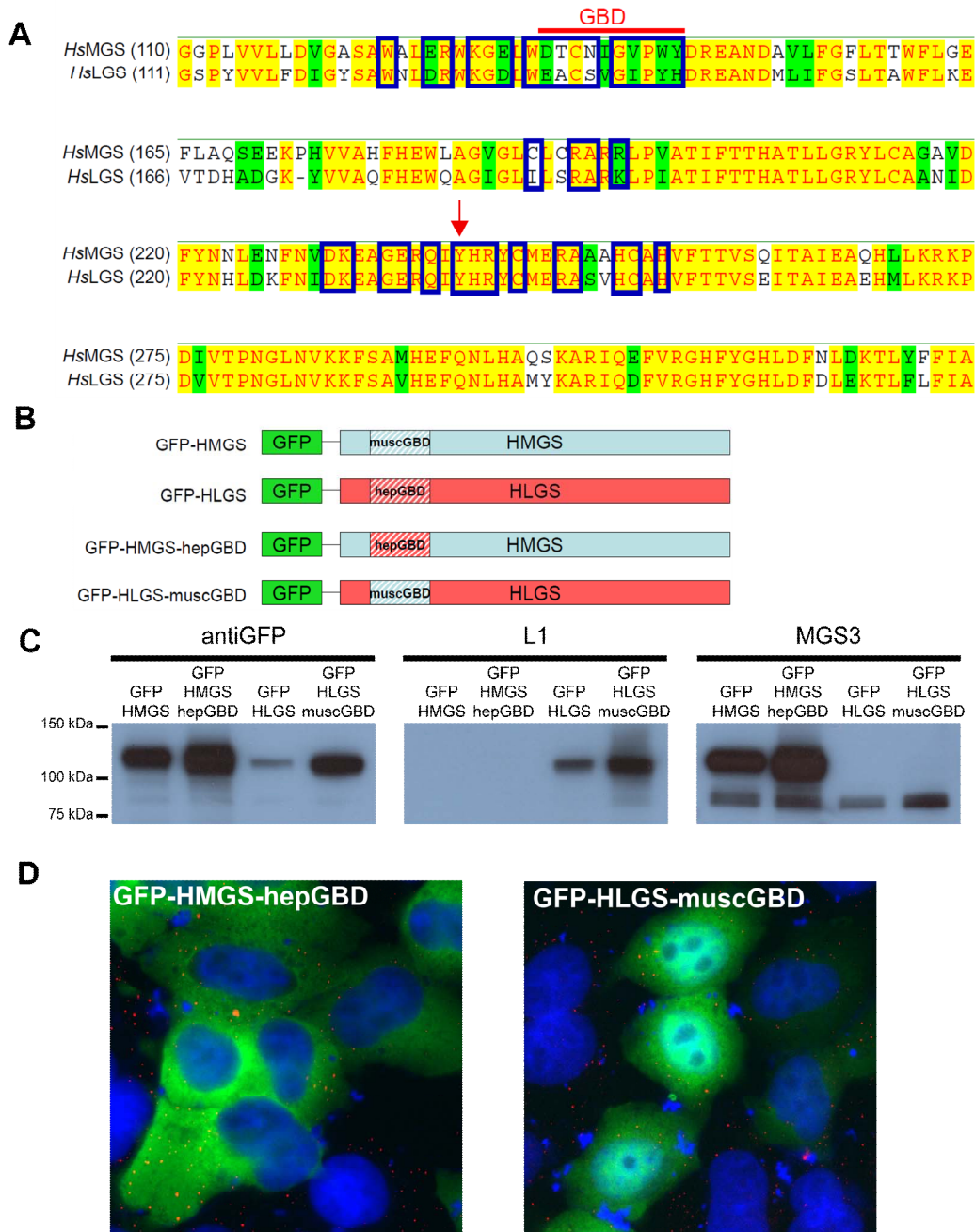


Figura 35. (A) Alineament de les seqüències de l'HMGS i l'HLGS, marcant els residus amb més probabilitat d'estar a la superfície (requadre blau), així com aquella zona que vam postular com a determinant de la diferent afinitat pel glicogen de les dues proteïnes (GBD). S'indica la posició del residu Tyr239 amb una fletxa vermella. Els residus conservats estan en fons groc i lletra vermella. Els residus similars estan en fons verd i lletra negra. Els residus no conservats estan en fons blanc i lletra negra. (B) Esquema de les construccions realitzades. (C) Western blot utilitzant anti-GFP, L1 (anti-LGS) i MGS3 (anti-MGS) per analitzar les proteïnes expressades a partir de la transfecció de cadascuna de les construccions generades. (D) Imatges de microscòpia d'epifluorescència de cèl·lules HeLa transfectades amb GFP-HMGS-hepGBD i GFP-HLGS-muscGBD. 24 hores després de la transfecció les cèl·lules es van fixar i es van sotmetre a un protocol d'immunocitoquímica. Veiem senyals de GFP (verd), anti-glicogen (vermell) i la tinció nuclear DAPI (blau).

formes de l'HMGS, ja que reconeix un epítop de MGS situat a la cua C-terminal, i tots els GBDs intercanviats es trobaven al domini N-terminal. Amb MGS3 també vèiem una doble banda en tots els carrils, corresponent a la MGS endògena de la línia cel·lular.

Vam expressar els construccions GFP-HMGS-hepGBD i GFP-HLGS-muscGBD en cèl·lules HeLa durant 24 hores. Després vam fixar les cèl·lules i vam marcar el glicogen amb anti-glicogen i els nuclis amb DAPI. Amb l'observació d'aquestes cèl·lules amb microscopi de fluorescència (**Figura 35; D**) vam observar que amb l'intercanvi de GBDs no s'intercanviaven les capacitats d'unió entre l'HLGS i l'HMGS, sinó que es provocava una pèrdua de la capacitat d'unió a glicogen dels dos enzims. Ambdós van passar a tenir un patró difús a la cel·lula. Sorprenentment, no vam observar senyal nuclear per a la construcció GFP-HMGS-hepGBD, mentre que sí ho vam fer en el cas de GFP-HLGS-muscGBD.

4. HMGS NUCLEAR: PROTEÏNES INTERACCIONANTS I UNIÓ A ARN

4.1 Proteïnes interaccionants amb HMGS nuclear

Des que es va descriure el procés de translocació nuclear de la MGS humana, ha existit la gran incògnita de si aquest procés podia formar part d'un mecanisme de resposta a l'estrès generat per la manca de nutrients. La translocació cap a dins el nucli d'una proteïna d'uns 80 kDa és un procés actiu i la cèl·lula ha d'invertir energia per portar-ho a terme, i en un context de baix nivell energètic sembla poc lògic que la cèl·lula inverteixi ATP en la translocació nuclear d'una proteïna si no és per a alguna finalitat.

Ens vam proposar esbrinar quin és el sentit biològic de la translocació nuclear de MGS. L'estratègia a utilitzar era identificar proteïnes que interaccionessin amb l'HMGS nuclear i a partir d'elles inferir una funció per MGS. Per aquesta raó primerament es va posar a punt un protocol per a l'aïllament de nuclis per tal d'obtenir la fracció de l'HMGS que ens interessava. Per això es van infectar plaques de cèl·lules HeLa amb un adenovirus recombinant que expressava la proteïna de fusió GFP-HMGS. Després de deixar les cèl·lules expressant durant 24 hores la proteïna, seguit d'una incubació durant tota la nit en medi sense glucosa per a forçar la translocació de la proteïna, les plaques es van incubar 20 min amb l'agent entrecreuant Ditiobis(succimidil)propionat (DSP), un compost que genera enllaços covalents reversibles entre les proteïnes i manté així les interaccions transitòries. Després de la incubació, les cèl·lules es tripsinitzaren, es posaren en contacte amb un tampó hipotònic i es trencà la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules per l'acció d'un homogeneïtzador Dounce, alliberant així els nuclis. Finalment, per centrifugació i utilitzant gradient de sacarosa, vam separar la fracció citoplasmàtica de la nuclear. L'observació dels nuclis purificats amb un microscopi de fluorescència mostrava que aquests contenien els acúmul·ls de GFP-HMGS nuclear (**Figura 36; B**). Aquests nuclis es

van trencar per sonicació per obtenir la fracció nuclear i poder comparar-la amb la fracció citoplasmàtica per western blot i comprovar que la purificació havia anat bé (**Figura 36; A**). S'utilitzà com a marcador citoplasmàtic l'enzim piruvat quinasa i com a marcador nuclear vam utilitzar les histones. L'anàlisi de les diferents fraccions indicà que la purificació va ser completa, ja que no vam trobar senyal de l'enzim citoplasmàtic piruvat quinasa de l'extracte nuclear, mentre sí vam mantenir la senyal per histones.

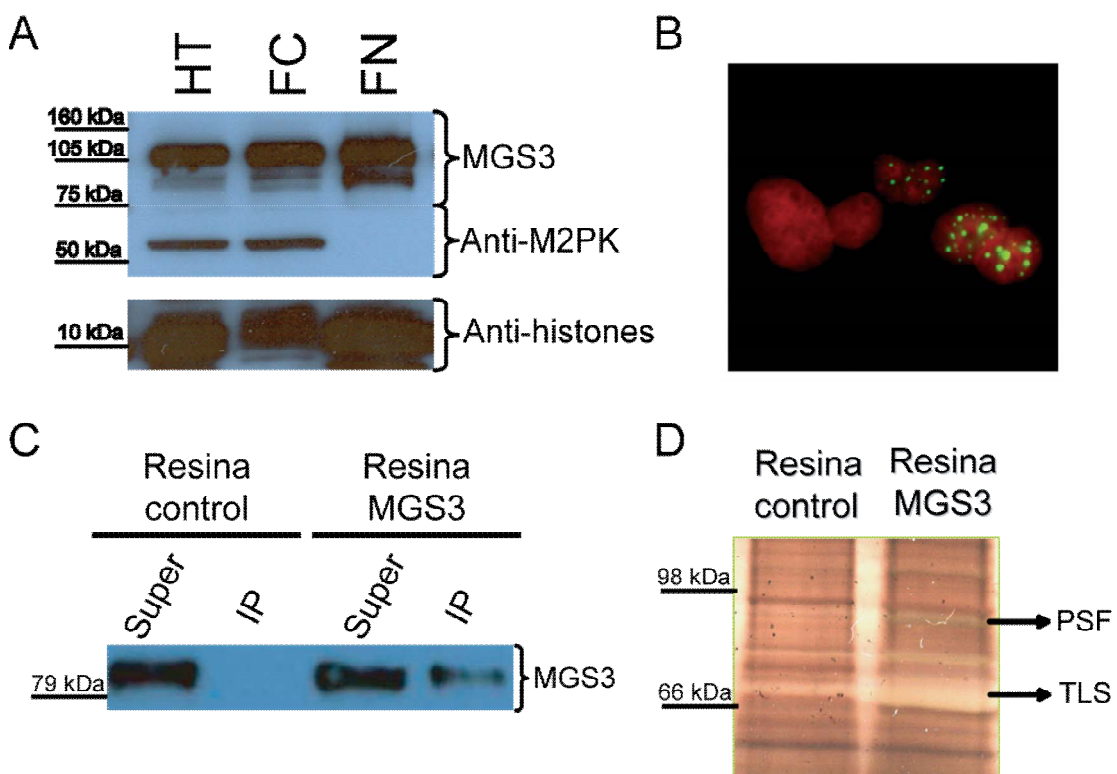


Figura 36. (A) Western blot de diferents fraccions del protocol de purificació de nuclis de cèl·lules HeLa que sobreexpressen la construcció GFP-HMGS. HT: Homogenat total. FC: Fracció citoplasmàtica. FN: Fracció nuclear. (B) Imatges de microscopia d'epifluorescència dels nuclis purificats. Verd: GFP-HMGS. Vermell: tinció nuclear. (C) Western blot contra MGS del sobrenedant (Super) i l'immunoprecipitat (IP) obtingut després de la immunoprecipitació amb resina sense o amb anticòs MGS3 conjugat de l'extracte nuclear de cèl·lules HeLa transfectades amb HMGS. (D) PAGE de la fracció immunoprecipitada. Les fletxes senyalen les bandes corresponents a PSF i TLS.

Una vegada establertes les condicions per a obtenir HMGS nuclear, vam infectar cèl·lules HeLa amb un adenovirus que codificava per l'HMGS salvatge. Després de deixar expressar la proteïna durant 24h i incubar les cèl·lules tota la

nit amb medi sense glucosa per a què l'HMGS transloqués al nucli (**Figura 36; B**), sotmetérem les cèl·lules al protocol de purificació de nuclis. Els nuclis purificats que s'obtingueren es van sonicar per tal d'obtenir-ne l'extracte que utilitzàrem per portar a terme el protocol d'immunoprecipitació emprant una resina Sepharose 4B que tenia unit anticòs MGS3, un anticòs policlonal contra la MGS. Després de la incubació i els diferents rentats de la resina, vam extreure'n les proteïnes unides bullint-la amb tampó de càrrega que contenia SDS. Analitzant el resultat per western blot (**Figura 36; C**), es veia que amb la immunoprecipitació s'aconseguí capturar una part de la MGS de l'extracte. La fracció immunoprecipitada es va sotmetre a SDS-PAGE i s'analitzà el resultat tenyint el gel amb reactiu de plata.

En el gel resultant s'observava que en el carril corresponent a la resina amb MGS3 unit apareixien un parell de bandes que no hi eren al carril control. Aquestes bandes es tallaren del gel, es tripsinitzaren i els pèptids obtinguts foren analitzats per espectrometria de masses per tal d'identificar les proteïnes d'origen (**Figura 36; D**). Aquestes bandes van ser identificades com TLS (Translocated in LipoSarcoma protein) i PSF (P-Splicing Factor).

4.2 Col·localització de l'HMGS nuclear, TLS, PSF i p54nrb

Per tal de comprovar si existia una relació entre aquestes proteïnes i l'HMGS, vam obtenir la seqüència codificant de TLS a partir d'una llibreria de cADNs de cèl·lules HeLa i vam clonar la seqüència en el vector pEGFP-N1, obtenint així un vector d'expressió en cèl·lules eucariotes de la proteïna de fusió TLS-GFP. Vam transfectar cèl·lules HeLa amb aquesta construcció. L'anàlisi de l'extracte d'aquestes cèl·lules per western blot amb un anticòs anti-GFP mostrava una banda del pes molecular desitjat.

Per a treballar amb PSF vam aconseguir un anticòs monoclonal contra la proteïna (Sigma). Està descrit que PSF es troba normalment formant un heterodímer amb la proteïna p54nrb (també anomenada NonO) (Shav-Tal and Zipori 2002). Per tal d'estudiar-la vam obtenir també la construcció GFP-p54nrb gràcies al laboratori del Dr. Angus I. Lamond (Wellcome Trust Biocentre, Dundee, Escòcia).

Vam transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions fluorescentes TLS-GFP o p54nrb-GFP i seguidament les vam infectar amb adenovirus AdHMGS (Gomis et al. 2002), que sobreexpressa la variant salvatge de l'HMGS. Després de deixar expressar les proteïnes durant 24h, vam incubar les cèl·lules tota la nit en absència de glucosa i les vam fixar. Seguidament vam sotmetre les cèl·lules a un protocol d'immunocitoquímica amb anticòs anti-MGS i tinció nuclear DAPI. Vam observar que MGS tenia el patró nuclear esperable després de la incubació sense glucosa, i que les proteïnes TLS-GFP i p54nrb-GFP co-localitzaven parcialment amb MGS (**Figura 37; A i B**).

Per tal d'estudiar si PSF també col·localitzava amb l'HMGS, vam transfectar cèl·lules HeLa amb la construcció GFP-HMGS. Després de deixar expressar la proteïna durant 24h, vam incubar les cèl·lules tota la nit en absència de glucosa i les vam fixar. Aleshores, mitjançant immunocitoquímica, vam marcar la PSF endògena amb anti-PSF i els nuclis amb DAPI. Vam observar, sota microscopi de fluorescència, que PSF i GFP-HMGS també col·localitzaven parcialment (**Figura 37; C**).

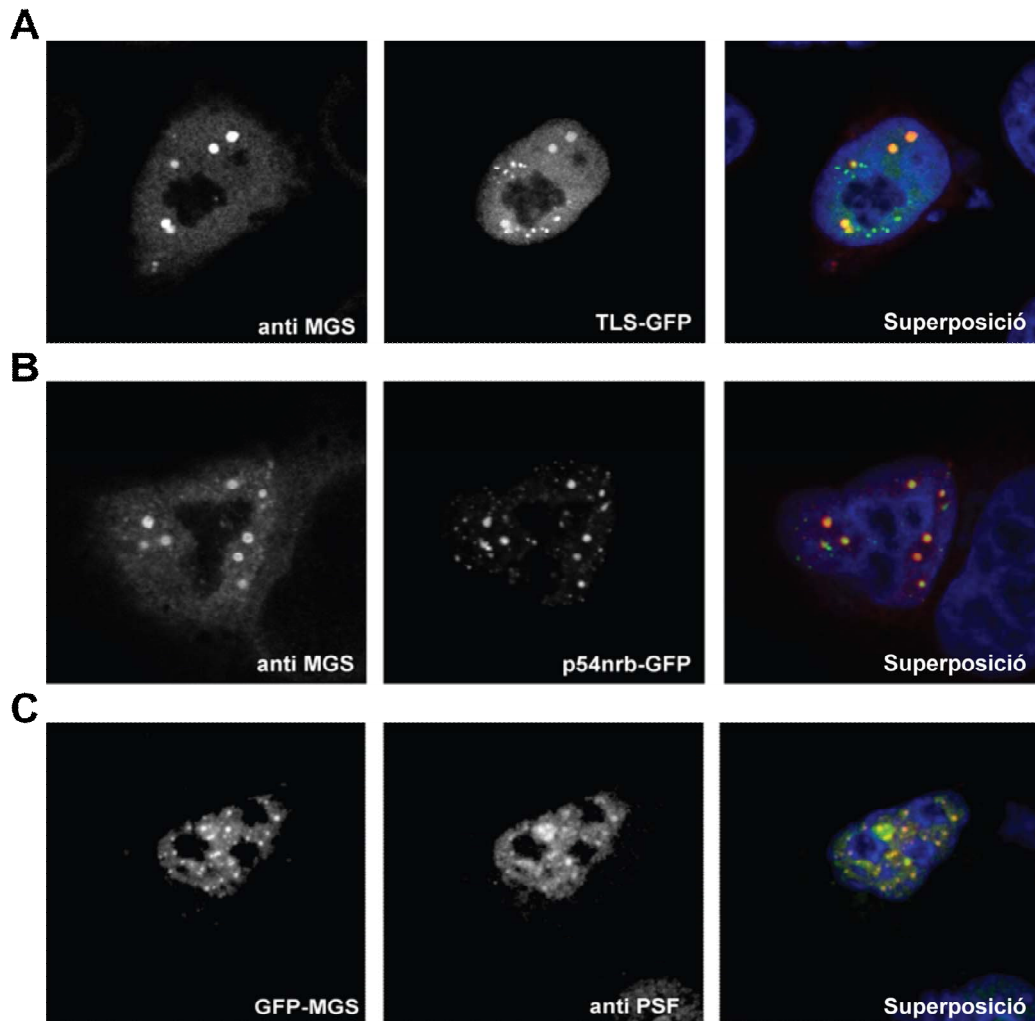


Figura 37. Cèl·lules HeLa transfectades, incubades sense glucosa durant la nit, fixades i sotmeses a immunocitoquímica. (A) Cèl·lules transfectades amb TLS-GFP (verd a la superposició) i infectades amb HMGS. Marcades amb anti-MGS (vermell a la superposició) i amb tinció nuclear DAPI (blau a la superposició). (B) Cèl·lules transfectades amb p54nrb-GFP (verd a la superposició) i infectades amb HMGS. Marcades amb anti-MGS (vermell a la superposició) i amb tinció nuclear DAPI (blau a la superposició). (C) Cèl·lules transfectades amb GFP-HMGS (vermell a la superposició). Marcades amb anti-PSF (verd a la superposició) i amb tinció nuclear DAPI (blau a la superposició).

4.3 Localització subcel·lular de l'HMGS nuclear, TLS, PSF i p54nrb durant l'arrest transcripcional per actinomicina D

Ja s'havia observat al nostre grup que els cossos nuclears formats per l'HMGS es disgregaven quan la cèl·lula era incubada 2h en presència

d'actinomicina D, un inhibidor de la transcripció i generació de mARNs. TLS, PSF i p54nrb són proteïnes amb dominis d'unió a ARN, raó per la qual vam voler estudiar l'efecte que tenia l'actinomicina D en aquestes proteïnes en presència de l'HMGS nuclear. Així, cèl·lules HeLa transfectades amb la construcció TLS-GFP o p54nrb i infectades amb AdHMGS, després de ser incubades tota la nit amb medi sense glucosa, es van incubar durant 4h en presència d'1 µg/ml actinomicina D i absència de glucosa, i es van fixar. Vam marcar la MGS amb anti-MGS i els nuclis amb DAPI. Vam poder observar com l'HMGS no només deixava de formar els cossos nuclears sinó que passava a formar part d'una estructura subnuclear anomenada tap nucleolar (*nucleolar cap*), un comportament que també mostren TLS-GFP i p54nrb-GFP (**Figura 38; A i B**).

Pel cas de PSF, es van transfectar cèl·lules HeLa amb la construcció GFP-HMGS. 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van incubar tota la nit en absència de glucosa i 4h en presència d'1 µg/ml actinomicina D i absència de glucosa. Les cèl·lules es van fixar i es va marcar la PSF endògena amb anti-PSF i els nuclis amb DAPI. L'observació d'aquestes cèl·lules va mostrar que GFP-HMGS també translocava als taps nucleolars juntament amb la PSF endògena (**Figura 38; C**).

Ja s'havia descrit la translocació de TLS (Zinszner et al. 1997a), PSF (Shav-Tal et al. 2001) i p54nrb (Shav-Tal et al. 2005) cap als taps nucleolars en situació d'arrest transcripcional. Aquesta és una estructura nuclear que s'observa en situacions d'inhibició de la transcripció (Journey and Goldstein 1961; Reynolds et al. 1964) i, tot i que inicialment es creia que les proteïnes que el composaven provenien únicament del procés de segregació del nuclèol que es dona quan s'inhibeix la transcripció, s'ha comprovat que també proteïnes localitzades al nucleoplasma es localitzen en aquests cossos (Andersen et al. 2002; Shav-Tal et al. 2001; Shav-Tal et al. 2005). La major part d'aquestes proteïnes nucleoplasmàtiques que es localitzen als taps nucleolars quan s'inhibeix la transcripció uneixen ARN (Shav-Tal et al. 2005). També cal

remarcar que aquesta translocació als taps nucleolars no és un comportament general de les proteïnes nuclears, ja que la major part de les proteïnes nucleoplasmàtiques no alteren la seva organització quan s'inhibeix la transcripció.

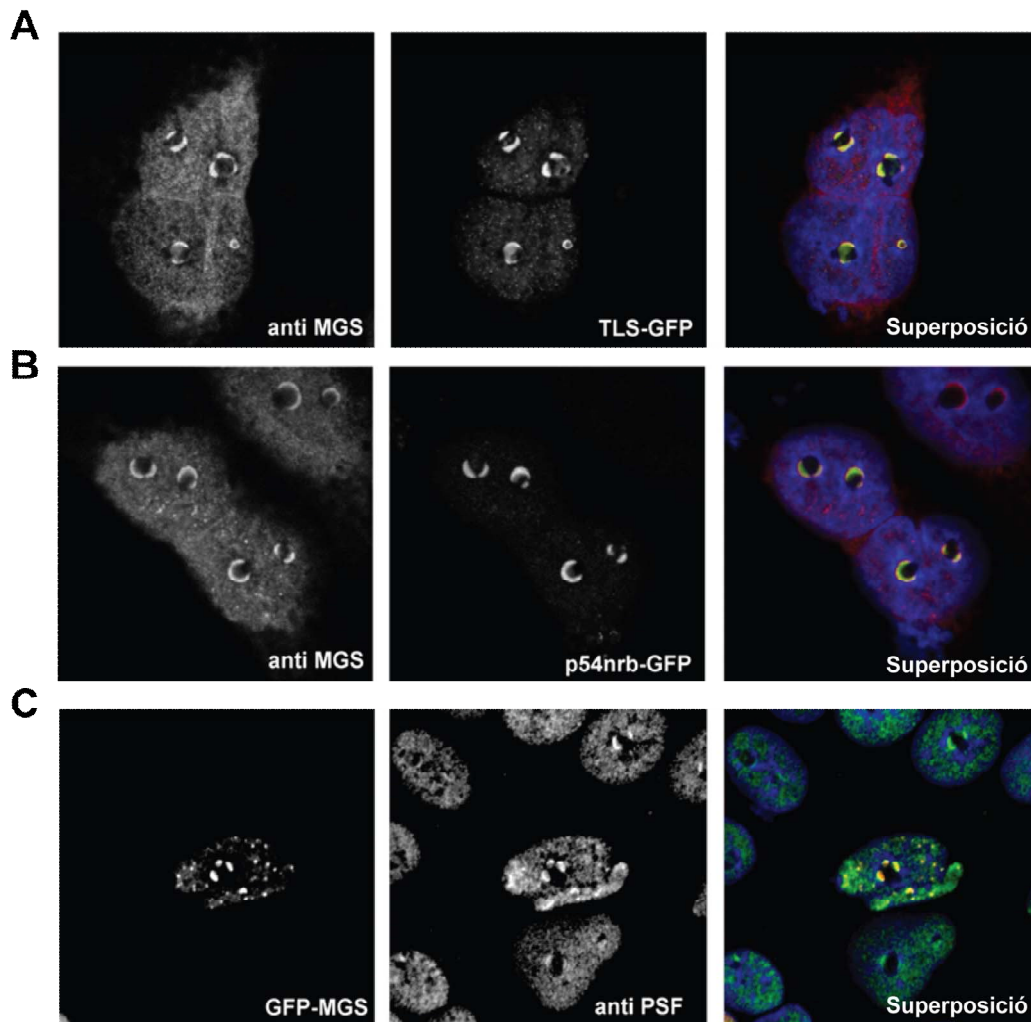


Figura 38. Cèl·lules HeLa transfectades, incubades sense glucosa durant la nit, tractades durant 4 hores amb 1 μ g/ml actinomicina D, fixades i sotmeses a immunocitoquímica. (A) Cèl·lules transfectades amb TLS-GFP (verd a la superposició) i infectades amb HMGS. Marcades amb anti-MGS (vermell a la superposició) i amb tinció nuclear DAPI (blau a la superposició). (B) Cèl·lules transfectades amb p54nrb-GFP (verd a la superposició) i infectades amb HMGS. Marcades amb anti-MGS (vermell a la superposició) i amb tinció nuclear DAPI (blau a la superposició). (C) Cèl·lules transfectades amb GFP-HMGS (vermell a la superposició). Marcades amb anti-PSF (verd a la superposició) i amb tinció nuclear DAPI (blau a la superposició).

4.4 Capacitat d'unió *in vitro* entre ARN i HMGS recombinant purificada

El fet que l'organització nuclear de l'HMGS depengués de la presència de mARN, així com que les proteïnes que es localitzen als taps nucleolars en absència de transcripció tinguin dominis d'unió a ARN, ens va fer pensar en la possibilitat que l'HMGS unís ARN. Per això, i gràcies a poder disposar de l'HMGS recombinant, vam portar a terme un assaig de canvi de mobilitat electroforètica (EMSA). En aquest assaig s'incuba quantitats creixents d'una proteïna en presència de ARN marcat radioactivament amb ^{32}P . La reacció es carrega en un gel nadiu de poliacrilamida i es porta a terme l'electroforesi. Finalment el gel es revela per autoradiografia. En un carril sense proteïna s'observa la senyal corresponent a la banda de ARN lliure. Si existeix interacció entre la proteïna assajada i l'ARN, quan afegim quantitats creixents de proteïna la senyal corresponent a la banda de ARN lliure anirà disminuint a la vegada que ha d'aparèixer senyal a major pes molecular corresponent al complex proteïna-ARN.

En el nostre cas vam carregar una mostra sense proteïna, on veure l'ARN lliure, mostres amb la proteïna d'unió U2AF com a control positiu i diferents reaccions incubant quantitats creixents de TAP-HMGS amb ^{32}P -ARN en presència i absència de tARN. Aquest tARN s'afegeix en excés a l'assaig per tal de bloquejar unions inespecífiques entre la proteïna assajada i l'ARN marcat.

En el nostre experiment vam observar com, incubant TAP-HMGS amb ^{32}P -ARN en presència de tARN, no hi havia pràcticament disminució de senyal en la banda de ARN lliure (**Figura 39**). Sorprenentment, realitzant l'assaig en absència de tARN, sí observàvem clarament aquesta baixada en la quantitat de ARN lliure. La senyal radioactiva del ARN lliure passava a observar-se en una zona del carril a major pes molecular i, sobretot, al pou de càrrega del carril. Aquest resultat suggeria que l'HMGS era capaç d'unir ARN, tot i que de forma inespecífica.

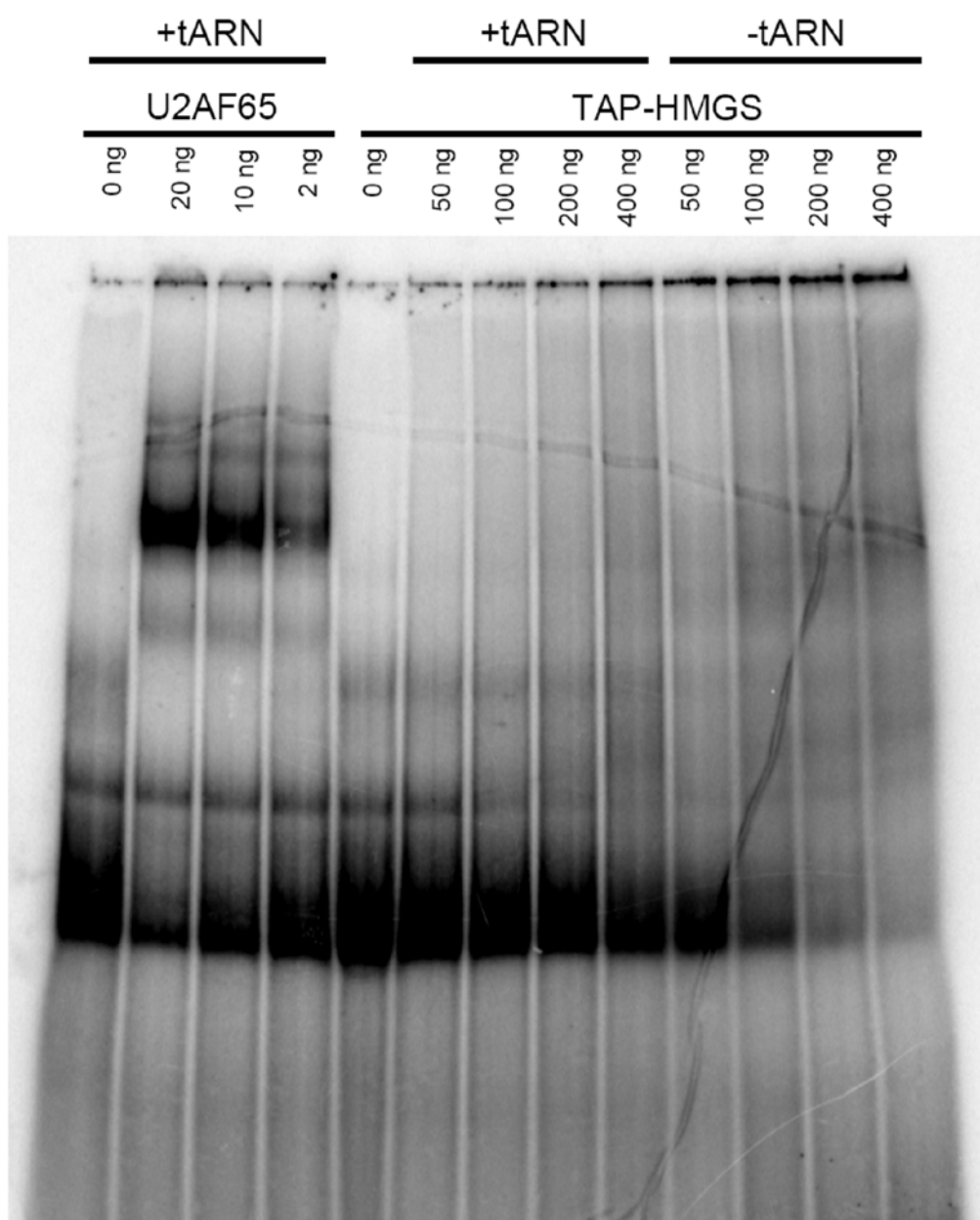


Figura 39. Autoradiografia d'un gel nadiu de poliacrilamida on s'han resolt mostres resultants de la incubació de diferents quantitats de les proteïnes U2AF65 o TAP-HMGS amb ARN marcat radioactivament. +tARN i -tARN indiquen, respectivament, la presència o absència de tARN durant la incubació.

4.5 Implicació del residu Trp143 en la translocació nuclear de l'HMGS

Als resultats obtinguts dels experiments de l'apartat 3.3 del capítol de resultats vam detectar un fet sorprenent: la construcció GFP-HMGS-hepGBD, on aminoàcids 135-144 de l'HMGS s'havien substituït pels aminoàcids 136-145 de l'HLGS no translocava al nucli tot i no localitzar-se als grans de glicogen, un signe de què la capacitat d'unió al glicogen estava disminuïda. En canvi, la construcció GFP-HLGS-muscGBD, on a la seqüència de l'HLGS se li havien substituït els aminoàcids 136-145 pels aminoàcids 135-144 de la seqüència de l'HMGS, tampoc s'unia a glicogen però sí translocava a dins el nucli cel·lular, un comportament inesperat per a la isoforma hepàtica de l'enzim.

Disposàvem de dos mutants de GFP-HMGS amb mutacions puntuals a alanina d'aminoàcids compresos dins la seqüència muscGBD, els mutants N138A i W143A. Ja havíem observat (apartat 2.8 de resultats) que aquests mutants no tenien alterada la seva capacitat d'unió al glicogen, així que vam estudiar si la capacitat de translocació nuclear de l'enzim seguia també intacta.

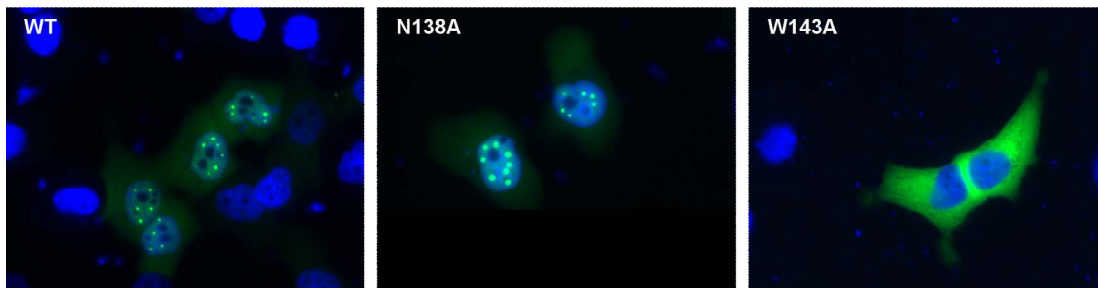


Figura 40. Imatges de microscòpia d'epifluorescència amb cèl·lules HeLa transfectades amb GFP-HMGS salvatge o els seus mutants N138A i W143A (senyal verda), fixades després d'incubar-les tota la nit en absència de glucosa i el marcatge nuclear DAPI (senyal blava).

Vam sembrar cèl·lules HeLa sobre cubreobjectes i les vam transfectar amb les variants salvatge, N138A o W143A de GFP-HMGS. Vam canviar el medi 24 hores després de la transfecció per DMEM sense glucosa i ho vam incubar

tota la nit. Al dia següent vam fixar les cèl·lules, vam marcar els nuclis amb DAPI i vam observar les cèl·lules amb microscòpia d'epifluorescència (**Figura 40**). Mentre el mutant N138A de GFP-HMGS es comportava com la variant salvatge, localitzant-se al nucli formant cossos nuclears i amb baixa fluorescència al citoplasma, el mutant W143A es localitza amb patró difós al citoplasma. No observem senyal fluorescent al nucli en les cèl·lules transfectades amb aquesta variant de GFP-HMGS, suggerint que W143A formaria part d'una seqüència aminoacídica de GFP-HMGS responsable de la translocació nuclear de l'enzim en absència de glicogen.

DISCUSSIÓ

La glicogen sintasa és l'enzim clau en la via de síntesi de glicogen i té una complexa regulació. Aquesta és un reflex del control precís al qual està sotmès el metabolisme del glicogen, enfocat a garantir que l'organisme disposi de glucosa una vegada l'absorció de carbohidrat provinent de la ingesta s'acaba. S'ha estudiat àmpliament la fina regulació de l'activitat de la GS mitjançant la unió de factors al·lostèrics, el principal dels quals és l'activador G6P, i mitjançant la fosforilació covalent. També es coneix com varia l'afinitat de l'enzim per la UDPG en funció de l'estat d'activació. En canvi, s'ha deixat sempre en un segon pla la interrelació entre la GS i el glicogen, l'altre substrat i, a la vegada, producte.

L'alta afinitat de la GS pel glicogen es coneix des de fa molt temps i constitueix un pas en els esquemes clàssics de purificació de l'enzim de fonts naturals (Takeda et al. 1975). Tot i així, fins fa poc res es coneixia de com interaccionava l'enzim amb la cadena de carbohidrats, encara que els resultats experimentals suggerien l'existència d'un segon lloc d'unió a carbohidrats a més del que uniria l'extrem de la cadena acceptora al centre actiu (Larner et al. 1976). Fa uns anys, la resolució d'estructures d'*EcGS* amb oligosacàrids units tant al centre actiu com lluny d'aquest (Sheng et al. 2009a) va donar força a la hipòtesi de l'existència de llocs d'unió fora del centre catalític, però encara es necessitava suport experimental per confirmar que els llocs d'unió descrits eren funcionals.

En aquesta tesi hem treballat a partir de la resolució al nostre laboratori d'una estructura de la glicogen sintasa d'arquea *PaGSmon* unida a una cadena de maltohexaosa. L'anàlisi cristal·logràfica del complex va permetre identificar un lloc d'unió a oligosacàrids al domini N-terminal de l'enzim, lluny del centre actiu. La cadena de carbohidrats es cargolava al voltant de la cadena lateral del residu Tyr174, i s'estabilitzava la unió amb la interacció d'altres residus amb la molècula de maltohexaosa. La situació del lloc d'unió a carbohidrats dins l'estructura global de la *PaGS* era similar a la dels llocs d'unió a maltooligosacàrids descrits per a la *EcGS* (Sheng et al. 2009a) i a la del lloc d'emmagatzematge de glicogen de la GP (Pinotsis et al. 2003). La semblança del plegament global i de

l'arquitectura del centre actiu de la GS i la GP ja s'havien descrit prèviament (Buschiazzo et al. 2004), i la presència d'un lloc d'unió a glicogen anàleg reforça encara més la noció de què aquests dos enzims deriven d'un ancestre comú.

La confirmació de què ens trobàvem davant un lloc d'unió a glicogen funcional va venir del resultat obtingut en l'experiment de cosedimentació amb glicogen. El mutant Y174A de *PaGSmon* no precipitava juntament amb el glicogen quan aquest es sotmetia a ultracentrifugació, indicant que l'alteració del residu central del lloc d'unió disminuïa la capacitat d'unió al glicogen. Ens trobàvem davant el primer lloc d'unió a glicogen funcional trobat en una GS. A més, aquest nou lloc tindria més afinitat que el lloc d'unió a la cadena acceptora del centre actiu, ja que, com demostra el resultat experimental, aquest per si sol és incapaç de mantenir l'enzim unit al glicogen.

La disruptió de la capacitat de la GS per a interaccionar amb el glicogen a través d'aquest lloc va tenir un efecte substancial sobre l'eficiència catalítica de l'enzim quan el glicogen, el seu substrat natural, s'utilitzava com a acceptor. En canvi, quan s'emprava maltohexaosa com a substrat, l'activitat del mutant Y174A era essencialment igual a la de la variant salvatge de l'enzim, indicant que la mutació no tenia cap efecte advers sobre el plegament global o el lloc catalític de l'enzim. És més, aquesta observació implicava també que la unió de l'oligosacàrid al nou lloc d'unió no tenia un efecte al·lostèric d'activació sobre l'enzim. Si fos així, l'activitat de la variant salvatge de *PaGS* amb maltohexaosa hauria mostrat major activitat que el mutant Y174A, ja que el lloc d'unió a glicogen estaria ocupat per l'oligosacàrid en l'enzim salvatge però no en el mutant. Tot plegat demostrava que la unió a glicogen és crítica per a l'eficiència catalítica de l'enzim, probablement perquè la unió de l'enzim al gra de glicogen localitza la GS directament sobre la font de cadenes acceptores, augmentant la concentració local de glucoses terminals i fent més fàcil que una d'aquestes d'uneixi i es pugui donar així la reacció enzimàtica.

Si comparem les mesures d'activitat glicogen sintasa a diferents temperatures, a mesura que aquesta s'apropa a 80 °C, la temperatura òptima de treball dels enzims de *Pyrococcus abyssi*, l'enzim està més actiu. Aquest efecte és molt visible en la variant salvatge, que manté la seva capacitat d'unió intacta, mentre que pel mutant Y174A l'activitat no augmenta tant amb la temperatura. La variant salvatge, gràcies al seu lloc d'unió a glicogen d'alta afinitat, es mantindria unida al substrat i podria realitzar diferents cicles catalítics abans de deixar-se anar. El mutant, en canvi, s'uniria al carbohidrat pel lloc d'unió a l'acceptor. Aquesta unió s'hauria de desfer per tal de deixar anar el producte i s'alliberaria del carbohidrat després de cada reacció enzimàtica. Aquest avantatge de la soca salvatge permetria que l'activació del centre catalític per la temperatura es traduís de forma més eficient en major activitat de l'enzim. Podria ser, aleshores, que ens trobéssim davant d'un enzim processiu. La processivitat és aquella capacitat de realitzar repetidament una reacció enzimàtica sense alliberar el substrat, i és típica d'enzims que actuen sobre substrats polimèrics.

Aquest lloc d'unió a glicogen està funcionalment conservat en les GSs eucariotes. El residu central del lloc d'unió a glicogen de la PaGS, Tyr174, s'alinea amb un residu de tirosina conservat als enzims eucariòtics, Tyr239 en HMGS, que a la vegada es troba en una regió altament conservada en eucariotes. Les mutacions Y239A i Y242A sobre HMGS afectaven a K_m per glicogen de l'enzim. La K_m aparent pel glicogen de la variant salvatge de l'HMGS va resultar ser 14 vegades menor que el valor obtingut pel mutant Y239A, mentre que el mutant Y242A mostrava un valor de K_m aparent quatre vegades major que la soca salvatge de l'enzim. L'activitat de totes les variants d'HMGS, utilitzant maltohexaosa com a substrat, romanía inalterada, indicant que les mutacions no afectaven al plegament o estructura del centre actiu. Per tant, la baixada en K_m era deguda purament a una disminució d'afinitat, suggerint que els residus Tyr239 i Tyr242 estaven implicats en la interacció de l'enzim amb el glicogen.

Les mutacions Y239A i Y242A tenien també un efecte en la distribució subcel·lular de l'enzim. A dins la cèl·lula i en presència de glucosa, l'HMGS presentava una distribució citoplasmàtica característica i col·localitzava amb el glicogen. En canvi, el mutant Y239A es distribuïa entre el citoplasma i el nucli de la cèl·lula i no col·localitzava amb el polisacàrid. El mutant Y239A, amb la seva menor afinitat pel glicogen, seria incapaç d'unir-se a glicogen, que actua com a factor de retenció citoplasmàtica (Cid et al. 2005), i translocaria de la mateixa forma que ho fa la variant salvatge de l'enzim quan no hi ha glicogen a la cèl·lula (Ferrer et al. 1997). Demostrem així que és purament el glicogen, i no cap factor unit al gra, el que reté l'HMGS al citoplasma a través de la forta afinitat que li confereix el lloc d'unió del qual formaria part el residu Tyr239, que ancoraria l'enzim al carbohidrat. Una última prova de què la mutació Y239A disminuïa l'afinitat de l'enzim pel glicogen la trobem en els experiments de Biacore, amb els quals vam observar directament com la capacitat d'unió de glicogen de l'HMGS recombinant purificada minvava amb la mutació Y239A. Demostrem així que el residu Tyr239 és un residu crític en la interacció entre el glicogen i l'HMGS, i formaria part del que seria el primer domini d'unió a glicogen funcional descrit per a aquest enzim, amb un paper cabdal en l'eficiència catalítica de l'enzim, així com en la determinació de la localització subcel·lular.

El mutant Y242A de l'HMGS mostra alteracions més lleugeres respecte a la variant salvatge de l'enzim que no pas el mutant Y239A. Del seu valor de K_m podríem deduir que l'afinitat pel glicogen estava lleugerament disminuïda. Això afectava a la seva distribució subcel·lular, de forma que una part de l'enzim encara romania unit i col·localitzant amb el gra de glicogen, però una altra fracció de l'enzim la trobàvem difosa al citoplasma i al nucli. Aquest efecte és atribuïble a la menor afinitat del mutant. Gràcies a què encara trobem aquesta variant unida al gra de glicogen, vam poder realitzar els experiments de FRAP, que ens van donar una mesura directa de l'afinitat de l'enzim pel glicogen. Vam observar que el l'HMGS té un recanvi entre la fracció lligada a glicogen i la fracció lliure baixíssim, reflex de l'altíssima afinitat entre HMGS i el glicogen, que fa que hi

romanguí ancorada. En canvi, el mutant Y242A mostra un alt intercanvi entre l'HMGS citoplasmàtica i la lligada al gra de glicogen, demostrant que la mutació provoca una disminució en l'afinitat que fa que l'enzim es deixi anar més fàcilment i disminueixi el seu temps de residència al gra. Tot indica que la Tyr242 es troba, juntament amb la Tyr239, en una regió responsable de l'alta afinitat de l'enzim pel glicogen. És remarcable que, tot i la baixa identitat entre les seqüències de les GSs d'arquea i eucariotes en aquesta regió, el lloc d'unió a glicogen està funcionalment conservat en aquests enzims.

Per a què una reacció enzimàtica es doni a un alt ritme l'enzim ha de ser capaç d'alliberar ràpidament els productes de reacció, que no han d'unir-se amb massa força al lloc catalític. Per a la GS i, en general els enzims que actuen sobre substrats polimèrics, existeix el problema de què el producte i el substrat de la reacció són essencialment el mateix. La manera que ha trobat la natura per superar aquest problema en la GS, i probablement en la GP si tenim en compte les similituds en l'arquitectura dels seus centres actius, consisteix en utilitzar un lloc d'unió a glicogen no catalític i d'alta afinitat que compensa la relativa baixa afinitat que el centre catalític mostra pel glicogen. El lloc d'alta afinitat convertiria a la GS en un enzim processiu que roman unit al seu substrat polimèric i realitzaria diferents rondes de catàlisi sense dissociar-se mentre encara és capaç d'alliberar el producte del seu centre actiu després de cada cicle catalític. L'avantatge d'una HMGS processiva sobre una de no processiva es mostra en els experiments en cèl·lules en cultiu. Hi ha una correlació entre l'afinitat pel glicogen i la capacitat d'acumular el polisacàrid *in vivo* de manera que una HMGS amb el lloc d'unió a glicogen intacte fa, després de dues hores d'incubació amb glucosa, dues o quatre vegades més glicogen que les variants Y242A i Y239A respectivament. Degut a què els enzims utilitzats en aquest experiment tenien els llocs fosforilables mutats a alanina, l'efecte no pot ser atribuït a una diferència en els estats d'activació de les diferents variants, sinó a la força amb la qual s'uneix al glicogen i a la processivitat de l'enzim.

Gràcies a la resolució de l'estructura de Gsy2p i a l'alta conservació entre la seqüència d'aquest enzim i l'HMGS, vam poder realitzar un model estructural aproximat de l'enzim humà. Vam concloure que la Tyr239 estaria situada a la superfície de l'enzim, amb capacitat d'interaccionar directament amb la cadena de glicogen. En canvi, la Tyr242 es trobaria dins el domini N-terminal, sense aquesta capacitat d'interacció directa. La mutació Y239A eliminaria una interacció directa entre el glicogen i l'enzim, explicant el seu efecte dràstic sobre l'afinitat. En canvi, la mutació Y242A podria distorsionar l'arquitectura del lloc d'unió a glicogen, però no eliminaria la possibilitat d'interacció, raó per la qual té un efecte menor sobre la interacció amb el glicogen.

El model estructural generat també va permetre predir quins aminoàcids es trobarien a la superfície de l'enzim, i per tant estarien en situació de poder interaccionar amb la cadena de glicogen. Amb els criteris bàsic de superficialitat i cadena lateral que permetés interaccionar amb la cadena de carbohidrats, vam aconseguir trobar nous aminoàcids la mutació dels quals altera la localització subcel·lular d'HMGS de la mateixa forma que ho fan les mutacions Y239A i Y242A. La mutació dels aminoàcids Asp230 i Arg246 va tenir el mateix efecte que quan ho vam fer per a la Tyr239, trobant l'enzim majoritàriament al nucli tot i la presència de glicogen al citoplasma, suggerint que les mutacions D230A i R246A disminuïrien dràsticament l'afinitat entre HMGS i glicogen. La localització subcel·lular del mutant E235A era semblant a la del mutant Y242A, fet que ens indueix a pensar que la mutació del Glu235 tenia un impacte més moderat sobre l'afinitat del glicogen. Aquests resultats ens permeten ampliar la zona de l'enzim que formaria part del lloc d'unió a glicogen, i indiquen que ens trobem davant un autèntic domini d'interacció a glicogen del qual en formarien part almenys els residus Asp230, Glu235, Tyr239 i Arg246, que crearien múltiples interaccions entre el domini N-terminal de l'enzim i la cadena de carbohidrat.

Tot i que en aquesta tesi no ens hem ocupat del tema, la capacitat de la GS per mantenir-se unida a glicogen indubtablement ha de tenir un impacte en els mecanismes reguladors que controlen els nivells de l'enzim (Vilchez et al.

2007) o la seva activitat. Els enzims relacionats amb aquests mecanismes reguladors, com la laforina o les subunitats reguladores de PP1, posseeixen mòduls d'unió a carbohidrats que faciliten la seva unió a la molècula de glicogen (P. T. Cohen 2002; Worby et al. 2008). Aquests mòduls són, aleshores, seqüències que dirigeixen l'enzim a l'orgànul subcel·lular desitjat, comparables a les seqüències de direccionament cap al nucli o mitocondri. La pròpia existència del glicogen seria un factor regulador de què diferents proteïnes es trobessin en una mateixa localització i poguessin interrelacionar-se, com podria ser la defosforilació d'HMGS per PP1, portada al grànul per una subunitat reguladora, o la degradació d'HMGS depenent de malina-laforina. Nous experiments s'haurien de portar a terme per tal d'intentar aclarir quina influència tindria la pèrdua d'afinitat pel glicogen, i la consegüent alteració de la localització subcel·lular, fosforilació i degradació de l'HMGS.

L'activació al·lostèrica per G6P sí tenia un impacte sobre l'afinitat de l'HMGS pel glicogen, augmentant la K_m de l'enzim per l'acceptor. Aquest efecte es perdia en la variant superactiva de l'enzim, que ja estava totalment activa, suggerint que aquesta disminució de l'afinitat estava lligada a l'activació de l'enzim i no a una competició de la G6P amb el glicogen pel mateix lloc d'unió. Considerant el reordenament estructural que produeix la unió de la G6P en l'estructura de Gsy2p (Baskaran et al. 2010), podríem pensar que la unió de G6P a l'HMGS també provoca un canvi similar, alliberant el domini N-terminal, on es troba el lloc d'unió a glicogen. Aquest reordenament augmentaria la mobilitat del domini N-terminal de l'HMGS i faria relativament menys estable la interacció. En canvi, amb l'enzim inactiu, el domini N-terminal tindria una mobilitat més restringida, fent més fàcil que s'establís la interacció entre glicogen i enzim. És interessant que l'enzim perdi afinitat pel glicogen en unes condicions que es donen quan hi ha síntesi de glicogen, fet que podria facilitar l'alliberament del producte i la unió d'una nova cadena acceptora.

Després d'estudiar a fons el cas de l'HMGS, ens va semblar interessant caracteritzar la unió entre l'HLGS i el glicogen. Aquest enzim va resultar ser

clarament menys afí pel glicogen que la isoforma muscular, ja fos mesurant la seva K_m aparent pel glicogen o mesurant el temps de residència de l'enzim al gra de glicogen mitjançant FRAP. Els valors obtinguts per l'HLGS serien semblants al cas de la variant Y242A de l'HMGS. Seguint aquest paral·lelisme, l'HLGS resultaria ser un enzim amb una processivitat i una eficiència catalítica menor que l'HMGS. Això faria de la isoforma hepàtica una GS que s'activaria menys davant l'augment de glicogen, mentre que l'HMGS arribaria a la seva activitat màxima amb menor concentració d'acceptor. Això seria consistent amb la funció per a la qual estan enfocats els tandems muscular o hepàtic d'enzims de la síntesi de glicogen. D'aquesta manera, les isoformes musculars de transportador de glucosa, hexoquinasa i glicogen sintasa estarien enfocades a permetre una ràpida activació de la via des d'un inici: la translocació de GLUT4, la ràpida entrada de glucosa gràcies a l'alta afinitat del transportador, la ràpida activació de l'hexoquinasa gràcies a la seva baixa K_m per glucosa i ja amb poc glicogen sintetitzat tindriem una alta ocupació del lloc d'unió del substrat acceptor en el centre catalític de l'HMGS. En el cas del tandem hepàtic, la resposta seria molt més progressiva a la concentració de glucosa en sang: entraria glucosa a través del transportador equilibratiu GLUT2 només quan la glicèmia és alta, situació en la que GK produiria G6P proporcionalment a la concentració de glucosa, i l'ocupació del lloc d'unió de l'acceptor de l'HLGS augmentaria, amb l'increment de la concentració de glicogen, de forma més gradual que en el cas de la isoforma muscular de l'enzim. En aquest sentit, la baixa K_m de l'HLGS per glicogen seria important per a una activitat més progressiva davant l'ampli ventall de concentracions de glicogen amb les quals es trobarà aquesta isoforma, ja que cal recordar que el fetge pot emmagatzemar major quantitat de glicogen que el múscul.

A més del possible sentit biològic de la menor afinitat per glicogen de l'HLGS, també ens interessava determinar quins eren els residus que determinaven la diferència d'afinitat entre isoformes. Ambdues són molt homòlogues, però vam trobar una sèrie de deu residus poc conservats que

estava estructuralment propera al domini d'unió a glicogen de l'HMGS, segons el model estructural (musGBD en HMGS, hepGBD en HLGS). Vam intentar alterar les propietats d'unió a glicogen mitjançant l'intercanvi d'aquestes seqüències entre els dos enzims, però les construccions resultants van perdre tota capacitat d'unió a glicogen, on cap de les dues mostraven un patró citoplasmàtic de concentració al voltant del glicogen, sinó un de totalment difós. En principi, la zona que es troba estructuralment al voltant de musGBD i hepGBD està molt conservada, i per tant semblava possible substituir una seqüència per l'altra sense perdre totalment la capacitat d'unió a glicogen, però no va ser així. Sembla que hi hauria alguns residus que no estarien conservats entre isoformes fora de les seqüències musGBD i hepGBD, i que serien crítics per a l'estructuració del lloc d'unió a glicogen de cada isoforma en particular.

El curiós és que l'intercanvi de musGBD per la seqüència hepGBD en l'HMGS produïa un enzim que, tot i no ser capaç d'unir-se a glicogen, tampoc es localitzava al nucli. Fins ara havíem vist, amb els mutants d'unió a glicogen de l'HMGS, que si l'enzim muscular no podia unir-se a glicogen translocava al nucli. D'altra banda, amb la construcció musGBD-HLGS vam detectar que, a més del patró citoplasmàtic difós, hi havia una clara senyal difosa a dins del nucli. Aquesta era una excepció única dins dels mutants que coneixem d'HLGS, que sempre han mostrat una localització subcel·lular purament citoplasmàtica. Tot plegat indicava que dins els deu aminoàcids que formen la seqüència que hem anomenat musGBD es troba la seqüència que determina que l'HMGS transloqui al nucli. Caldria afegir la seqüència musGBD a una proteïna menys homòloga a la GS de múscul per tal de veure si aquest és l'únic element necessari per a la localització nuclear o es complementa amb algun altre element de les glicogen sintases humanes. Disposàvem de dos construccions d'HMGS on mutaven a alanina un residu del musGBD, l'Asn138 o el Trp143. Havíem comprovat que aquesta mutació no afectava a la localització subcel·lular de l'enzim en presència de glucosa. En absència de glucosa, el mutant N138A mostrava el patró puntejat nuclear ja descrit per a la variant salvatge, mentre que el mutant W143A va

resultar tenir un patró citoplasmàtic difós i no translocava a dins del nucli. Amb aquests resultats podem fitar una regió de la seqüència d'HMGS responsable de la translocació nuclear de l'enzim, que es trobaria entre els aminoàcids 135-144, amb un paper destacat del residu Trp143 dins la senyalització que deriva en la concentració nuclear de l'enzim en absència de glicogen.

Aquests resultats globalment demostren que els determinants de localització subcel·lular es concentren al domini N-terminal. La desestructuració d'aquest impediria que en presència de glicogen l'HMGS s'hi unís, i potser tampoc es donaria el procés de translocació nuclear quan ja no hi haguessin reservoris a la cèl·lula. Amb aquestes dades ara podem reinterpretar antics resultats. El domini N-terminal està format, segons el model estructural d'HMGS, pels aminoàcids 1-280 i l'hèlix alfa formada pels aminoàcids 598-617. Dels mutants de deleció de GFP-HMGS estudiats en un treball previ del nostre laboratori (Cid et al. 2005), hi ha una alteració en la localització subcel·lular en aquells mutants on el domini N-terminal no està complet, com són HMGS Δ N1 (li falten els 133 primers aminoàcids de la seqüència de la GS muscular) i HMGS Δ CT1 (li falta el fragment C-terminal a partir del residu 554). A més, en el cas del primer tampoc hi ha un patró citoplasmàtic normal en presència de glucosa, probablement provocat per la desestructuració del lloc d'unió a glicogen derivada de la deleció.

A més dels determinants moleculars que permeten l'entrada de l'HMGS a dins del nucli, ens interessava molt entendre el per què d'aquesta translocació. La translocació de l'HMGS és un procés costós per la cèl·lula, ja que per a una molècula de més de 50 kDa aquest procés té un cost energètic. A més, el procés es porta a terme en una situació metabòlica concreta que es correspon amb l'exhauriment del principal reservori energètic cel·lular. Hom no pot evitar pensar que aquest procés pugui ser aprofitat per la cèl·lula per a senyalitzar l'entrada en una situació d'estrès metabòlic. La degradació del glicogen del citoplasma seria senyalitzada a dins del nucli cel·lular per l'HMGS, desencadenant la resposta d'adaptació cel·lular necessària.

Per tal d'aprofundir en si realment la translocació de la GS muscular desencadena una resposta cel·lular o només es tracta d'un procés per a localitzar l'enzim fora del citoplasma, on ja no és necessari, vam decidir investigar si hi havia proteïnes que interaccionessin amb aquesta proteïna a dins del nucli i que ens poguessin donar pistes sobre la seva funció. Vam aconseguir identificar dues proteïnes que immunoprecipitaven juntament amb l'HMGS nuclear: TLS i PSF. Vam investigar si aquestes dues proteïnes, juntament amb p54nrb, una proteïna que té alta homologia amb PSF i que forma heterodímers amb aquesta, realment s'interrelacionaven amb l'HMGS. Vam observar col·localització d'HMGS nuclear amb construccions fluorescents de TLS i p54nrb, així com amb la PSF endògena. Es reforçava així el resultat de la immunoprecipitació i es suggeria l'existència d'una interacció entre aquestes proteïnes i l'HMGS. El fet que totes quatre canviïn la seva localització subnuclear i transloquin als taps nucleolars quan inhibim la transcripció encara dóna més força a l'existència d'una interrelació entre elles.

TLS, PSF i p54nrb tenen múltiples funcions dins la cèl·lula. S'ha descrit la intervenció de TLS en processos de regulació de la transcripció (Powers et al. 1998; Uranishi et al. 2001), transport de mARN al citoplasma (Zinszner et al. 1997b) i manteniment de la integritat del DNA genòmic (Kuroda et al. 2000). També participa en el processament post-transcripcional de mARN, principalment en processos de splicing (Hallier et al. 1998; Wu and Green 1997; Yang et al. 1998; Zinszner et al. 1994). Per la seva banda, s'han descrit diferents funcions pel complex p54nrb-PSF en processos d'splicing, transcripció i poliadenilació (Liang and Lutz 2006; Mathur et al. 2001; Patton et al. 1993; Rosonina et al. 2005). A més, són components principals dels cossos nuclears anomenats paraspeckles (Fox and Lamond 2010), la funció dels quals és la retenció nuclear d'ARNs que després s'alliberen al citoplasma sota certs estímuls.

Donada la gran varietat de processos a on intervenen les tres proteïnes, se'ns va fer impossible deduir-ne una per a l'HMGS nuclear. Sí ens vam adonar

que p54nrb, TLS i PSF tenien a la seva seqüència dominis RRM d'unió a ARN, necessaris per a portar a terme les diferents funcions. Són probablement aquests dominis els que porten aquestes proteïnes als taps nucleolars quan incubem amb actinomicina D, perquè aquest compost inhibeix preferencialment l'ARN polimerasa II, encarregada de la transcripció i generació de mARNs. Aleshores, les proteïnes amb capacitat d'unió a ARN només trobaran ARNs als quals unir-se al nucleol, on hi ha els ARNs ribosòmics que produeixen les altres ARN polimerases.

El fet que l'HMGS també transloqui als taps nucleolars quan incubem les cèl·lules amb actinomicina D va fer que ens preguntéssim si l'enzim era també capaç d'unir ARN o, per el contrari, era la seva interacció amb alguna altra proteïna amb aquesta qualitat la que portava l'enzim a la perifèria del nucleol quan inhibíem la transcripció. El resultat d'incubar HMGS recombinant amb ARN marcat radioactivament i la posterior detecció del complex en un gel nadiu semblava confirmar la capacitat de l'HMGS per interaccionar amb l'ARN. Obteníem una disminució en la quantitat d'ARN lliure proporcional a la quantitat d'enzim amb el qual l'incubàvem,, i vam detectar un augment de senyal provinent de l'ARN en el carril d'incubació i sobretot al pou. Tot això suggereix l'existència d'una interacció HMGS-ARN. La major part de l'enzim pràcticament no entraria a dins del gel, ja sigui perquè la seva mobilitat en un gel nadiu és molt petita, per la creació d'un complex d'alt pes molecular o per una agregació de la proteïna. Tot i així sí sembla que una part d'aquest complex entraria, explicant l'augment de senyal radioactiva al carril, però seria un complex de mida no fixa, ja que no obtenim cap banda clara com sí dona, per exemple, el control d'U2AF65. La unió entre l'HMGS i l'ARN assajat seria inespecífica, ja que pot ser desplaçada quan a la mescla d'incubació hi afegim tRNA sense marcar. Nosaltres només vam assajar un sol ARN, però caldria assajar altres tipus d'oligonucleòtids marcats per tal d'intentar aclarir si l'HMGS té o no una especificitat per alguna seqüència en concret.

Tot plegat, els resultats d'aquesta tesi amplien el coneixement de la GS i la seva capacitat d'unió a molècules polimèriques. S'han establert les bases estructurals i el paper funcional de la llargament coneguda afinitat de la GS pel seu substrat. La presència d'un lloc d'ancoratge a glicogen d'alta afinitat confereix a l'enzim propietats que són determinants per a la seva eficiència catalítica, el seu comportament intracel·lular i, possiblement, la seva regulació en el gra de glicogen. A més, la diferent afinitat podria ser un element que s'ha aprofitat en l'evolució per a modular les característiques enzimàtiques de cada isoforma de les GSs humanes, adaptant-les a la síntesi de glicogen dels teixits on s'expressen. Aquesta diferent afinitat entre isoformes també respondria a la necessitat d'una retenció citoplasmàtica de l'HMGS mentre hi hagi glicogen i evitar la translocació nuclear de l'enzim, la translocació del qual ve senyalitzada per una seqüència aminoacídica que estaria al voltant del residu Trp143. Aquest canvi de localització sempre s'ha lligat a una resposta a estrès metabòlic per la degradació de totes les reserves de glicogen. Ara coneixem proteïnes que interaccionarien amb l'HMGS nuclear, així com la seva capacitat d'unió a ARN. Tot plegat obre noves possibilitats en l'estudi d'una funció nuclear d'aquest enzim.

Durant l'escriptura d'aquesta tesi va ser publicada l'estructura de Gsy2p formant un complex amb diferents oligosacàrids (Baskaran et al. 2011). En aquest article, a partir de l'anàlisi de cristalls de diferents variants de Gsy2p en presència de maltooctaosa, es descriuen quatre nous llocs d'unió a carbohidrats a la superfície d'aquest enzim que es troben fora del centre catalític. Un està al domini N-terminal (lloc 1, format per residus que es troben entre els 117-121, 145-156 i 182-184), mentre que els altres es troben al domini C-terminal (lloc2, entre els residus 365-367 i 439-465; lloc 3, entre els residus 333-340 i 461-463; lloc 4, entre els residus 208-211, 324 i 507-561). Els residus que interaccionen amb les cadenes de carbohidrats es corresponen amb aminoàcids altament conservats entre les GSs eucariotes. També demostren experimentalment els

llocs 1 i 2 són llocs d'unió a glicogen funcionals, la mutació dels quals disminueix la K_m per glicogen i l'eficiència catalítica de l'enzim.

El lloc d'unió a glicogen descrit en aquesta tesi no correspon a cap dels descrits per a l'enzim de llevat. No hi ha cap contacte enzim-carbohidrat entre els residus de Gsy2p equivalents als 230-246 de l'HMGS. El lloc 1 de Gsy2p, l'únic al domini N-terminal, es troba en una zona més exterior del domini. Tant els residus corresponents als llocs d'unió a carbohidrats descrits per a Gsy2p com els descrits en aquesta tesi per a HMGS estan altament conservats en ambdós. Tot i així, sembla que el lloc d'unió a glicogen de l'HMGS és propi d'aquest enzim i que li conferiria una major afinitat pel glicogen, com es veu si comparem els valors de K_m per glicogen dels dos enzims. Mentre els valors de K_m aparent per glicogen de l'HMGS es mouen entre 0.014 i 0.074 mg/ml segons les condicions, la K_m aparent per glicogen de Gsy2p es mou entre 0.12 i 0.29 mg/ml. En publicacions anteriors del mateix grup de recerca, aquest valors per a Gsy2p es situaven entre 1.1 i 3.4 mg/ml (Pederson et al. 2000). La pressió evolutiva derivada de la necessitat de dotar de certes característiques a la isoforma muscular de la GS humana hauria propiciat l'aparició d'un nou lloc d'unió a glicogen de major afinitat. Caldria estudiar si s'ha conservat la funcionalitat dels diferents llocs d'unió a glicogen de Gsy2p en l'HMGS, així com també seria interessant identificar els residus d'HMGS que determinen la diferent afinitat entre HMGS i Gsy2p, i que potser també explicarien la diferent afinitat entre les dues isoformes de GS humana.

Els resultats obtinguts ens permeten aprofundir en el coneixement de la glicogen sintasa i ens endinsen dins la complexitat dels sistemes biològics. Són l'exemple de com una sola peça de l'engranatge cel·lular necessita una àmplia varietat de mecanismes de control a múltiples nivells per tal de portar a terme la seva tasca de forma eficient. Una tasca que, a més, pot variar segons les condicions amb les quals s'hagi d'enfrontar la cèl·lula. Són els aminoàcids que formen la proteïna, amb la seva combinació única i precisa, els que li confereixen

les seves propietats singulars. I és la comprensió de la relació entre la seqüència aminoacídica i la funció que se'n deriva un dels més fascinants reptes de la biologia.

CONCLUSIONS

- La glicogen sintasa de *Pyrococcus abyssi* (PaGS) té un domini d'unió a glicogen al seu domini N-terminal, lluny del centre actiu. En aquest lloc la cadena de carbohidrats es cargola al voltant del residu Tyr174 i la unió s'estabilitza per formació de ponts d'hidrogen amb els residus Lys157, Leu171, Asp176, Asp178 i Thr182, així com per interaccions de Van der Waals amb els residus Pro173, Tyr174, His181 i Tyr185.
- El residu Tyr174 de la PaGS és crític per a la interacció entre l'enzim i el glicogen. El trencament d'aquesta interacció per mutació d'aquest residu a alanina disminueix la capacitat de l'enzim de romandre unit al gra de glicogen, així com l'eficiència catalítica de l'enzim quan el glicogen s'utilitza com a substrat acceptor.
- El lloc d'unió a glicogen no catalític de PaGS està funcionalment conservat en la glicogen sintasa muscular humana (HMGS). Aquest lloc d'unió de l'HMGS està en una zona de l'enzim que inclou, com a mínim, els residus Asp230, Tyr239, Arg246, Glu235 i Tyr242, situats al domini N-terminal de l'enzim. Els tres primers estableixen interaccions crítiques per a la unió de l'HMGS al glicogen.
- La pèrdua d'afinitat de l'HMGS pel glicogen, mitjançant l'alteració del lloc d'unió no catalític, té un fort impacte negatiu sobre l'eficiència catalítica de l'enzim quan aquest utilitza glicogen com a substrat acceptor: augmenta la Km pel glicogen, disminueix l'activitat específica i, tot plegat, es tradueix en una menor capacitat de síntesi de glicogen *in vivo*.
- El lloc d'unió a glicogen confereix a l'HMGS una alta afinitat pel carbohidrat. Això fa que, *in vivo*, l'enzim romangui llargament unit al gra de glicogen i faci

de l'HMGS un enzim processiu. L'alteració del lloc d'unió redueix aquest temps de residència i afectaria negativament a la processivitat de l'enzim.

- El glicogen és el factor de retenció citoplasmàtic de l'HMGS, que evita la translocació nuclear de l'enzim mitjançant la forta interacció que s'estableix entre ambdós a través del lloc d'unió a glicogen no catalític de l'enzim. L'alteració d'aquest domini, amb la consegüent pèrdua d'afinitat, provoca un canvi de la distribució subcel·lular de l'enzim.
- L'activació de l'HMGS a través de la unió del seu activador al·lostèric glucosa-6-fosfat disminueix l'afinitat de l'enzim pel glicogen.
- La glicogen sintasa hepàtica humana té menora afinitat pel glicogen que la isoforma muscular, mostrant així una major K_m pel glicogen i un menor temps de residència en el gra de glicogen *in vivo*.
- L'HMGS nuclear interacciona amb les proteïnes TLS, p54nrb i PSF. En situació d'arrest transcripcional, l'HMGS transloca a la perifèria nucleolar. Això suggereix una capacitat d'unió a ARN, una suposició recolzada per la capacitat de l'HMGS d'interaccionar amb ARN *in vitro*.
- En la zona compresa entre els aminoàcids 135 i 144 de l'HMGS es troben residus responsables de la seva translocació nuclear, un dels quals és el residu Trp143. En canvi, la mutació del residu Asn138 no té cap efecte en la translocació nuclear de l'enzim.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

1.1. Reacció en cadena de la polimerasa

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al. 1988) es va usar en diverses estratègies:

1.1.1 Amplificació d'ADN a partir de plasmidis

Per tal d'amplificar un fragment d'ADN a partir de plasmidis que contenen un l'ADN d'interès es va fer servir la polimerasa de *Thermococcus kodakaraensis* o KOD (*KOD DNA polymerase*, Merck). Aquesta polimerasa es caracteritza per una alta fidelitat i una alta processivitat (2 kbp/min).

La barreja de reacció sempre tenia un volum final de 50 µl, i es composava de 0.5 µg de l'ADN plasmídic d'interès, 1.5 µl d'encebadors sentit a una concentració de 10 µM, 1.5 µl d'encebadors antisentit a 10 µM, 5µl d'una barreja dels 4 deoxiribonucleòtids (dNTP's) a 2 mM, 5 µl de tampó 10x, 3 µl de MgSO₄ 25 mM i 1 unitat de KOD.

El resultat de la reacció es resolia en un gel d'agarosa, i es visualitzava mitjançant un aparell de llum d'ultraviolat. Si es necessitava recuperar l'ADN, es tallava la banda que el contenia amb l'ajuda d'un bisturí, i s'extreia de l'agarosa mitjançant l'ús de columnes de purificació d'ADN en matriu d'agarosa (*Illustra GFX PCR DNA and Gel band Purification*, GE Healthcare).

1.1.2 Mutagènesi dirigida

Aquesta estratègia s'utilitzà per tal de reemplaçar nucleòtids concrets d'un gen d'interès. Degut a què els encebadors eren totalment complementaris entre ells (**Taula V**), la reacció era sempre aritmètica, i no pas exponencial. Els

encebadors contenen la mutació que volíem introduir aproximadament a la meitat de la seqüència.

Per realitzar la mutagènesi dirigida hem utilitzat el kit Quickchange (Stratagene). La reacció tenia un volum final de 50 µl, i es composava de 10 ng de l'ADN plasmídic d'interès, 1.25 µl d'encebadors sentit a una concentració de 10 µM, 1.25 µl d'encebadors antisentit a 10 µM, 1 µl de dNTP's, 5 µl de tampó 10x i 2.5 U de PfuUltra HGS ADN Polimerasa.

MUTACIÓ	ENCEBADORS
Tyr 239 Ala	Sentit: GGGGAGAGGCAGATCGCCCACCGATACTGCATG Antisentit : CATGCAGTATCGGTGGGCGATCTGCCTCTCCCC
Tyr 242 Ala	Sentit: CAGATCTACCACCGAGCCTGCATGGAAAGGGCG Antisentit : CGCCCTTTCCATGCAGGCTCGGTGGTAGATCTG
Lys 231 Ala	Sentit: GAACCTCAACGTGGACGCGGAAGCAGGGGAGAGG Antisentit : CCTCTCCCCTGCTTCCGCGTCCACGTTGAAGTTC
Trp 143 Ala	Sentit: CAACATCGGAGTGCCGGCGTACGACCGCGAGGCC Antisentit : GGCCTCGCGGTCTGTACGCCGGCACTCCGATGTTG
Asn 138 Ala	Sentit: GCTCTGGGATACCTGCGCCATCGGAGTGCCGTGG Antisentit : CCACGGCACTCCGATGGCGCAGGTATCCCAGAGC
Gln 237 Ala	Sentit: GGAAGCAGGGGAGAGGGCGATCTACCACCGATAC Antisentit : GTATCGGTGGTAGATCGCCCTCTCCCCTGCTTCC
Asp230Ala	Sentit: GAGAACTTCAACGTGGCCAAGGAAGCAGGGGAG Antisentit : CTCCCCTGCTTCCTTGGCCACGTTGAAGTTCTC
Glu235Ala	Sentit: GACAAGGAAGCAGGGGCGAGGCAGATCTACCAC Antisentit : GTGGTAGATCTGCCTCGCCCCTGCTTCCTTGTC
Arg246Ala	Sentit: CGATACTGCATGGAAGCGGCGGCAGCCCACTGC Antisentit : GCAGTGGGCTGCCGCCGCTTCCATGCAGTATCG
His250Ala	Sentit: GAAAGGGCGGCAGCCGCCTGCGCTCACGTCTTC Antisentit : GAAGACGTGAGCGCAGGCGGCTGCCGCCCTTTC

Taula V. Llistat d'encebadors usats en la mutagènesi de la HMGS.

El resultat de la reacció es va digerir amb 1 µl de l'enzim de restricció DpnI (*Promega*), que talla ADN metilat, en aquest cas els plasmidis metilats motlle que es van amplificar en bacteris i que per tant estaven metilats. La digestió es va incubar durant una hora a 37 °C. Uns un microlitre del producte de la digestió es van transformar en 50 µl bacteris competents.

S'obtenien els plasmidis mitjançant extracció de plasmidis de bacteris i es va comprovar mitjançant seqüenciació que havien incorporat la mutació.

1.1.3 Detecció d'ADN

Per determinar la presència o absència d'un fragment d'ADN concret es va fer servir aquesta estratègia. Per a tal propòsit, s'amplificà l'ADN d'interès amb la polimerasa de *Termophilus Aquaticus* o Taq (*Taq DNA polymerase Master Mix, Promega*). Aquest tipus de polimerasa es caracteritza per incorporar mutacions a un ritme de $8,0 \times 10^{-6}$ mutacions/pb, per tant presenta una menor fidelitat que la KOD polimerasa, però la velocitat d'incorporació és major.

La reacció tenia un volum final de 25 µl, i es composava de 100 ng del l'ADN d'interès, 2 µl d'encebadors sentit a una concentració de 10 µM, 2 µl d'encebadors antisentit a 10 µM, 12.5 µl del mix de tampó amb dNTP's i Pfu polimerasa ja preparats.

1.2 Clonació d'ADN

Per a clonar una seqüència codificant d'una proteïna a dins un plasmidi hem utilitzat els sistemes comercials In-Fusion (Clontech) i Gateway (Invitrogen).

1.2.1 In-Fusion

Amb el sistema In-Fusion clonem un producte de PCR a dins del plasmidi desitjat directament per recombinació. Aquest plasmidi ha estat prèviament tallat amb enzims de restricció seleccionats. El punt determinant del sistema són els encebadors utilitzats per a fer la PCR, ja que, quan amplifiquem, afegixen als extrems de l'insert una seqüència complementària a la dels extrems del plasmidi linearitzat. Això permet que amb el disseny dels encebadors poguem clonar la seqüència d'ADN que vulguem en qualsevol plasmidi on no seria possible fer-ho mitjançant les tècniques clàssiques de biologia molecular.

Posàvem 150 ng de vector tallat, el doble de quantitat d'insert en relació molar, ajustàvem fins a 8 µl amb aigua, afegim 2 µl de tampó de reacció 5x i 1 µl de la mescla d'enzims. Incubàvem 15 min a 37 °C i 15 min a 50 °C. Ho posàvem en gel i afegim 40 µl de tampó TE. Transformàvem 3 µl d'aquest producte en bacteris competents.

1.2.2 Gateway

Gateway és un sistema de clonatge comercial distribuït per l'empresa Invitrogen. L'avantatge d'aquest sistema és que, una vegada clonat l'ADN desitjat en el plasmidi pDONR, podem ràpidament clonar-ho a altres plasmidis amb múltiples aplicacions amb una senzilla reacció de recombinació. En aquest cas els encebadors utilitzats per a amplificar l'insert que hem de clonar afegixen unes caixes de recombinació als extrems. Un altre avantatge és que la selecció de les colònies bacterianes transformades amb el plasmidi que conté l'insert és fàcilment seleccionable, ja que en el cas que el vector no s'hagi recombinat s'expressa una proteïna que impedeix el desenvolupament de la colònia. Així, totes les colònies que obtenim després de la transformació contenen plasmidi recombinat.

En la clonació per Gateway primerament feiem la clonació al vector pDONR 221. S'incubaven 150 ng de vector pDONR amb una quantitat d'insert, que estaven en una relació molar 1:3. Portàvem la reacció a un volum total de 8 µl amb tampó TE i afegíem 2 µl de BP Clonase Enzyme Mix. Incubàvem una hora a temperatura ambient i transformàvem 1 µl de la reacció en bacteris competents.

Una vegada teníem el nostre insert en el plasmidi pDONR podíem clonar-ho dins un altre vector que contingués la seqüència de recombinació adient. En el nostre cas es va utilitzar el vector pDEST/N-SFTAP. S'incubaven 150 ng del vector pDONR origen amb 150 ng del vector destinació, portàvem la reacció a 8 µl amb tampó TE i afegíem 2 µl de LR Clonase Enzyme Mix. Incubàvem una hora a temperatura ambient i transformàvem 1 µl de la reacció en bacteris competents.

1.3 Electroforesi d'ADN

Permet separar les diferents molècules d'ADN en funció de la mida (Sambrook et al. 1989). Es dipositaven les molècules d'ADN en un gel d'agarosa submergit en la fase mòbil, el tampó d'electroforesi TBE (Tris base 89 mM, Àcid Bòric 89 mM a pH 8.3 i Na₂EDTA 2 mM), i es sotmetien a un camp elèctric continu. L'acceleració és en funció del quocient càrrega/massa. La càrrega ve donada pels fosfats de l'enllaç fosfoéster entre nucleòtids, així doncs com més llarga sigui una molècula més càrrega presenta, i per tant el quocient és constant. La diferent mida de les molècules fa que pateixin més o menys fregament amb la matriu del gel d'agarosa, fent d'aquest factor el que finalment determina la mobilitat electroforètica de cada banda d'ADN.

El gel d'agarosa generalment es van preparar a l'1% (p/v), i contenien bromur d'etidi, el que permetia veure l'ADN d'interès, doncs s'intercala entre les

bases de l'ADN i emet fluorescència taronja quan s'excita amb llum ultraviolada. Per preparar el gel es pesaven 0.5 g d'agarosa d'alta puresa que es dissolien en 50 ml de tampó d'electroforesi TBE mitjançant l'ús de microones. Es deixava refredar una mica, s'afegien 10 µl de bromur d'etidi (0.2 µg/ml) i es dipositava en un motlle que contenia pintes per a crear els pous del gel.

L'ADN es barrejava amb tampó de càrrega (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM pH 8.0, i blau de bromofenol 0.25% (v/v)), que servia per donar densitat i color a la mostra, en una relació 1:5 (v/v). La barreja es carregava en els pous del gel d'agarosa, que es trobava situat en una cubeta plena de tampó d'electroforesi. Com a marcadors dels fragments d'ADN, es va fer servir una digestió del fag λ, amb els enzims de restricció *EcoRI* i *HindIII* (λ EcoRI-HindIII, Promega). Aquest marcador de ADN presenta mides entre 21000 i 125 pb. L'electroforesi es feia a 100 V i a temperatura ambient. Després de separar els fragments el ADN, el resultat va ser visualitzat sota la llum d'ultraviolat, gràcies a la presència de bromur d'etidi en el gel.

1.4 Quantificació d'ADN

Per quantificar l'ADN, es tenia en compte que una unitat d'absorbància a 260 nm, mesurada en cubeta de quars de 100 µl, equival a una concentració de 50 µg/ml aproximadament. Així doncs es seguia la següent fórmula:

$$DNA [\mu g / \mu l] = OD_{260} \times \frac{Volum \text{ final}}{Volum \text{ DNA problema}} \times \frac{50 \mu g / ml}{1 UA_{260}} \times \frac{1 ml}{1000 \mu l}$$

La qualitat de l'ADN es va mesurar com la relació entre l'absorbància a 260 nm, pròpia de l'ADN, entre l'absorbància a 280 nm, pròpia de les proteïnes. S'acceptava una qualitat suficient de l'ADN quan la relació era igual o major a 1.8.

1.5 Generació de cèl·lules competents

Per generar bacteris competents s'agafaven 50 µl de bacteris *Escherichia coli* soca *DH5α* i els dipositàvem a un erlenmeyer de 250 ml que contenia 30 ml de medi LB autoclavat. El medi *Luria Bertani* es preparava dissolent 10 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat i 10 g de clorur sòdic (NaCl) per litre d'aigua MilliQ. Un cop dissolt, es dipositava en erlenmeyer i s'autoclavava, per tal d'eliminar qualsevol microorganisme.

Deixàvem créixer els bacteris a 18 °C durant 48 hores amb agitació vigorosa. Quan s'obtenia una densitat òptica de 0.1 mitjançant la lectura de l'absorbància a 550 nm fent servir com a blanc medi LB, es transferia el cultiu a un erlenmeyer d'un litre de capacitat que contenia 70 ml de medi LB autoclavat. Deixàvem créixer a 37°C amb agitació vigorosa. Quan tornàvem a observar un valor proper a 0.1, transferíem el cultiu a un erlenmeyer d'un litre de capacitat que contenia 100 ml de medi LB autoclavat. Deixàvem créixer a 37 °C amb agitació vigorosa un altre cop. Quan s'arribava a una OD₅₅₀ de 0.4 a 0.5, es retirava el cultiu, i es refredava ràpidament en un bany de gel i sal comuna. A partir d'aquest moment es treballava sempre a 4 °C. Repartíem els 200 ml de cultiu en 4 tubs estèrils de 50 ml de capacitat a -20 °C. Centrifugàvem els tubs a 1125xg durant 5 minuts a 4 °C. Els sobrenedants es descartaven i els pellets es solubilitzaven amb 15 ml de solució estèril TFB-I (30 mM acetat de potassi, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol), mantenint sempre una temperatura de 4 °C. Centrifugàvem a 1125xg durant 5 minuts a 4 °C. Els sobrenedants es descartaven, i a cada pellet s'afegien 2 ml de solució estèril TFB-II (30 mM NaMOPS, 10 mM RbCL, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol). Es feien alíquotes de 50 µl en tubs autoclavats de 1.5 ml refrigerats a -20 °C, que es congelaven ràpidament en nitrogen líquid.

1.6 Transformació de bacteris

La transformació és una tècnica mitjançant la qual s'introdueixen plasmidis d'interès en cèl·lules procariotes, basada en una alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana de les cèl·lules competents, el que facilita l'entrada de l'ADN (Sambrook et al. 1989). En aquest projecte la transformació sempre s'ha dut a terme pel mètode del xoc tèrmic.

Es descongelava una alíquota de bacteris competents d'uns 50 µl, sempre la soca *E.Coli DH5α* (*Life Technologies Invitrogene*), i es barrejava amb l'ADN plasmídic en una proporció no major a 10:1 (v/v). La barreja es mantenia durant 30 min en gel, i s'incubava a 42 °C durant 1 minut. Passat aquest minut, es deixava refredar durant 5 minuts a 4 °C i es procedia a dipositar 500 µl de medi LB autoclavat. Es deixava creixent en agitació el cultiu a 37 °C durant 1 hora, on els bacteris tenien temps de sintetitzar les proteïnes de resistència codificades pel plasmidi. Uns 100 µl dels bacteris transformats es plaquejaven sobre una placa de LB més agar que incorporava l'antibiòtic corresponent. La placa es deixava creixent invertida durant 14 hores a 37 °C, temps en el qual si els bacteris havien incorporat els plasmidis formaven colònies.

1.7 Obtenció de l'ADN plasmídic

1.7.1 Miniprep

Protocol que permetia l'obtenció de plasmidis a baixa concentració, amb l'ajuda del sistema de columnes *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN).

Una colònia bacteriana es picava mitjançant l'ús d'una punta autoclavada, i es deixava créixer en agitació un tub estèril que contenia 5 ml de medi LB amb l'antibiòtic de selecció a una temperatura de 37 °C, durant unes 12-14 hores

aproximadament. Sobre 1 ml d'aquest cultiu es passava a un tub d'1.5 ml autoclavat, i es centrifugava a 3300xg durant 1 minut a temperatura ambient, per tal de sedimentar els bacteris. El pellet bacterià, un cop descartat el sobrenedant, es resuspenia en 250 µl de tampó (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA i 100 µg/ml d'ARNsa A). S'afegien 250 µl de solució de lisi (200 mM NaOH i 1% SDS) i s'invertia suaument 3 o 4 vegades, 5 min a temperatura ambient deixant per a què es produís la lisi bacteriana. Després, s'afegien 350 µl de solució neutralitzadora (0.9 M d'acetat potàssic i 4.2 M Gu-HCl a pH 4,8), i es centrifugava a 15700xg durant 10 minuts a temperatura ambient, per fer caure totes les restes cel·lulars, l'ADN cromosòmic i les proteïnes desnaturalitzades. El sobrenedant que contenia els plasmidis es feia passar per una columneta d'intercanvi iònic que reté només el ADN. Es centrifugava durant 1 minut a 15700xg, i es netejava amb 750 µl de solució de rentat (5 M Gu-HCl i 30% etanol), finalment s'obtenien els plasmidis mitjançant incubació amb 50 µl d'aigua MilliQ i centrifugació durant 2 minuts a una velocitat de 16000xg.

1.7.2 Maxiprep

Protocol que permetia l'obtenció de grans quantitats de plasmidis, sobre 500 µg, amb l'ajuda del sistema de columnes *NucleoBond Xtra Maxi* (Macherey-Nagel). El mètode també es basa en una lisi alcalina del cultiu cel·lular amb una posterior purificació de l'ADN per cromatografia d'intercanvi iònic en columna.

Es partia d'un cultiu propi per fer miniprep, és a dir, una colònia bacteriana crescuda en agitació en 5 ml de medi LB amb l'antibiòtic de selecció, durant 6 hores a 37 °C, aproximadament. Aquest pre-cultiu es passava a un erlenmeyer que contenia 200 ml de medi LB i els antibiòtics apropiats, es deixava créixer en agitació a 37 °C durant 12 hores. Es centrifugava a 3300xg durant 15 minuts a 4 °C, per tal de sedimentar els bacteris. El pellet bacterià, un cop descartat el sobrenedant, es dissolia en 12 ml de tampó (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml ARNsa A) i es passava a un tub estèril de 50 ml de capacitat.

S'afegien 12 ml de solució de lisi (200 mM NaOH i 1% SDS) i s'invertia suaument 3 o 4 vegades, deixant la lisi 5 minuts a temperatura ambient. Després, s'afegien 12 ml de solució neutralitzadora (0,9 M d'acetat potàssic i 4,2 M Gu-HCl a pH 4,8). S'invertia el tub uns 3 cops, i s'aplicava a una columna equilibrada que contia un filtre. Un cop el lisat havia passat pel filtre, dipositàvem 15 ml de solució d'equilibri al filtre de la columna (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100). Quan aquest volum havia passat pel filtre, el descartàvem. Afegiem 25 ml de solució de rentat (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol) a la columna sense el filtre. Els plasmidis s'obtenien amb 15ml de solució final (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5, 15% isopropanol). Es precipitava l'ADN amb 12.5 ml d'isopropanol. Aquests 27,5 ml totals els passàvem per una xeringa que contenia un filtre que retenia l'ADN. Un cop passat tot el volum, netejàvem amb 10 ml d'etanol al 70%, es deixava assecar el filtre, passant aire per la xeringa. Finalment d'elüïen els plasmidis amb 500 µl de TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA).

1.8 Seqüenciació de l'ADN

El mètode emprat és el descrit per Sanger (Sanger and Coulson 1975) però modificat per Prober (Prober et al. 1987) on es duu a terme una reacció de PCR amb l'ADN que es vol comprovar. La reacció es fa en presència de dideoxinucleòtids (ddNTP) marcats, cada un d'ells, amb un indicador fluorescent de longitud d'ona diferent. Aquests ddNTP acaben l'elongació de la cadena, doncs no tenen el grup 3'-OH necessari per a la formació de l'enllaç fosfodiéster entre dos nucleòtids. Quan s'incorpora un ddNTP en la cadena naixent d'ADN s'acaba la seva extensió. Així doncs, la reacció produeix diversos fragments de longitud variable. Posteriorment, aquestes cadenes són precipitades i analitzades per electroforesi en un sistema acoblat a fluorimetria.

La reacció de PCR tenia un volum final de 10 µl, i es composava de 100 ng del ADN plasmídic d'interès, 2 µl d'encebadors sentit o antisentit a 2 µM, 3 µl d'aigua MilliQ i 3 µl de la barreja de seqüenciació, *Big Dye v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), que ja incorporava l'ADN polimerasa, els dNTPs i els ddNTPs marcats en tampó adequat.

Un cop finalitzada la reacció, l'ADN es precipitava i s'analitzava per electroforesi en un sistema acoblat a fluorimetria. Aquesta última part es duia a terme al servei de seqüenciació dels Serveis Científico-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona (UB), mitjançant el seqüenciador *ABI-PRISM 377 automatic ADN sequencer* (Perkin Elmer Applied Biosystems).

1.9 Transfecció de línies cel·lulars

Mitjançant la transfecció aconseguim introduir plasmidis a dins les cèl·lules eucariotes. En el nostre cas hem transfectat plasmidis que codifiquen per una proteïna d'interès darrera d'un promotor eucariota potent per tal de sobreexpressar-la. Segons la línia cel·lular hem utilitzat una tècnica o altra.

1.9.1 Transfecció amb polietilenimina

Aquesta tècnica és utilitzada preferentment en cèl·lules fàcilment transfectables. En el nostre cas ho vam emprar amb la línia cel·lular HEK293. Per transfectar una placa de 150 mm de diàmetre amb cèl·lules HEK293 confluents mantingudes en medi DMEM complet mesclàvem 20 µg d'ADN plasmídic i 175 µl 1 mg/ml polietilenimina (PEI; Polysciences) en 2.5 ml de 150 mM NaCl estèril. Vortejàvem la mescla durant 5 segons i deixàvem incubar la mescla a temperatura ambient durant 15 minuts. Passat aquest temps afegíem la solució al medi cel·lular, agitàvem la placa i ho incubàvem tota la nit a 37 °C,

5% CO₂. Al dia següent ja podíem canviar el medi cel·lular pel medi escaient a la tècnica a fer.

1.9.2 Tranfecció amb lipofectamina

Aquesta transfecció es realitza amb el reactiu comercial Lipofectamine 2000 (Invitrogen) i s'utilitza amb cèl·lules difícilment transfectables. En el nostre cas ho vam emprar amb la línia cel·lular HeLa. Durant el procés de transfecció s'ha d'evitar la presència d'antibiòtic o FBS als medis. Així, per transfectar una placa de 100 mm de diàmetre amb cèl·lules HeLa en medi complet primer mesclàvem en un tub 5 µg del ADN plasmídic a transfectar en 250 µl de medi DMEM complementat amb glucosa i glutamina. Mentrestant afegíem 12.5 µl de lipofectamina en 250 µl del mateix DMEM i deixàvem incubar 5 minuts. Passat aquest temps mesclàvem el contingut dels dos tubs, vortejàvem i incubàvem a temperatura ambient durant 15 minuts. Mentrestant treiem el medi de les cèl·lules, fèiem un rentat amb PBS i les deixàvem en 6 ml de DMEM amb glucosa i glutamina.

Finalment afegíem al medi cel·lular el resultat de la incubació de ADN amb lipofectamina. Agitàvem la placa i incubàvem durant 4 hores a 37 °C i 5% CO₂. Passat aquest temps retiràvem el medi i deixàvem les cèl·lules en el medi escaient per a la tècnica a realitzar a continuació.

2. CULTIU CEL·LULAR DE LÍNIES ESTABLES

2.1 Cèl·lules HEK293A

Línia cel·lular que procedeix de ronyó d'embrió humà (*ATCC CRL 1573*), també anomenada senzillament 293A. Aquesta línia cel·lular és emprada per a la generació i amplificació d'adenovirus no replicatius, doncs presenten de manera

estable el gen AdE1A de l'adenovirus tipus 5 (Graham et al. 1977). Aquest gen, que per estratègia, manca en els diferents adenovirus generats, és necessari per a la replicació vírica. El medi de manteniment d'aquesta línia és el medi complet, que es tracta del medi DMEM DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementat amb 25 mM Glucosa, 10% de sèrum fetal boví (FBS), 2 mM glutamina, 100 mg/ml estreptomicina i 100 unitats/ml penicil·lina (S/P).

2.2 Cèl·lules HeLa

Fibroblast humà. La primera línia cel·lular humana cultivada in vitro amb èxit. El medi de manteniment d'aquest línia és DMEM amb 25 mM Glucosa, 10% de FBS i S/P.

2.3 Manteniment de cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars es mantenen en incubadors a 37 °C, al 5% de CO₂ i 95% d'humitat. Quan s'arribava a un 80-90% de confluència, es tripsinitzaven i plaquejaven per tal d'assegurar la seva viabilitat. La tripsinització consisteix en la disgregació de les cèl·lules mitjançant un tractament amb tripsina al 0.25% i EDTA 1 mM. Prèviament les cèl·lules han de ser rentades amb tampó PBS, per tal d'eliminar qualsevol resta de sèrum del medi de cultiu que pot interferir amb la digestió. Un cop disgregades, les cèl·lules es recollien i centrifugaven a 405xg durant 5 minuts, s'eliminava el medi amb tripsina i el pellet cel·lular es disgregava amb medi de manteniment nou. Les cèl·lules es plaquejaven en noves plaques de cultiu, de 150, 100 o 60 mm de diàmetre segons les necessitats, a una densitat de 60000 cèl·lules/cm² aproximadament.

La congelació de les cèl·lules es realitzava després de la tripsinització, però el pellet cel·lular es resuspenia amb 1 ml de FBS amb un 10% de DMSO

com agent crioprotector. Aquesta suspensió cel·lular es dipositava en criotubs i es realitzava una congelació progressiva en un contenidor de cèl·lules a -80 °C. Finalment els criotubs es desaven en tancs de nitrogen líquid. Quan les cèl·lules havien d'ésser descongelades per al seu ús, es procedia a escalfar-les en un bany a 37 °C i dipositar-les en un tub amb medi de manteniment, el qual es centrifugat durant 5 minuts a 1000 rpm. El pellet cel·lular es disgregava amb medi de cultiu propi de cada línia cel·lular, es plaquejava en plaques de 100mm de diàmetre i es mantenien en un incubador en ambient a 37 °C, al 5% de CO₂ i 95% d'humitat

3. PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

3.1 Glicogen sintasa monomèrica de *Pyrococcus abyssi*

La sintasa monomèrica de *Pyrococcus abyssi* va ser expressada en *Escherichia coli* de la soca BL21 (DE3)/pG-Tf2 (TaKaRa). Les cèl·lules transformades amb el plasmidi pColdI, que contenia la seqüència codificant per la PaGS, es van cultivar a 37 °C amb 34 µg/ml de cloramfenicol i 50 µg/ml d'ampicilina fins arribar a una densitat òptica 1.0 mesurada a 600nm. Aleshores el cultiu va ser refrigerat fins als 15 °C durant 30 min, i l'expressió de la proteïna va ser induïda amb 0.4 mM d'isopropil β-tiogalactopiranòsid i es va incubar addicionalment durant 24 hores a 15 °C. Els bacteris van ser separats per centrifugació a 6000xg i es van resuspendre en 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, complementat amb 1 mM PMSF i 5 mM 2-mercaptoetanol. Es van tractar les cèl·lules amb 1mg/ml de lizozim a 4 °C durant 1 hora i es va completar la lisi cel·lular mitjançant un cicle de congelació-descongelació. Es va afegir ADNsa I (0.05 mg/ml) i 1 mM MgCl₂ a l'homogenat i, després d'una hora d'agitació, la fracció soluble es va separar per centrifugació a 15000xg i es va filtrar a través d'una membrana de 0.22 µm de mida de porus (Millipore). L'extracte cel·lular es va carregar en una columna d'afinitat de níquel (HisTrap HP, GeHealthcare) a

temperatura ambient equilibrada amb 50 mM Tris-HCl pH 7.4 complementat amb 5 mM 2-mercaptoetanol. Després de la càrrega es va netejar la columna i finalment es va eluir la proteïna recombinant amb un gradient lineal de 0-150 mM d'imidazole. Les fraccions que contenien l'enzim es van ajuntar en una sola que va ser concentrada amb Centriprep YM-30 (Millipore) i carregada en una columna d'intercanvi aniònic MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare). L'enzim va ser eluït amb un gradient lineal de 0-1 M NaCl, concentrat i carregat en una columna de gel-filtració Superdex 200 (GE Healthcare). Les diferents fraccions eluïdes de la columna van ser analitzades per SDS-PAGE. Es van ajuntar les fraccions amb major concentració d'enzim i es va concentrar la mostra resultant.

3.2 Glicogen sintasa muscular humana

Es van sembrar plaques de 150 mm de diàmetre amb cèl·lules 293A (Invitrogen). Aquestes es van transfectar amb la construcció pDESN/N-SF-TAP amb la HMGS clonada en pauta. El primer dia post-transfecció es renovava el medi complet. Dos dies després canviàvem a medi DMEM complementat amb 1% FBS i sense glucosa i ho incubàvem tota la nit per tal de deplecionar les cèl·lules de glicogen. Al dia següent l'enzim recombinant expressat per les cèl·lules es va purificar emprant una variació del mètode prèviament descrit (Gloeckner et al. 2007), que consistia en treure el medi de les plaques i afegir sobre les cèl·lules 1 ml de medi de lisi fred (30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet-P40, 1 mM benzamidina, 1 mM fluorur de fenilmetilsulfonil, 25 nM àcid okadaïc, 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml aprotinina, and 10 µg/ml pepstatina, 20% glicerol). Les cèl·lules es van recollir rasant les plaques i es van deixar incubant en un tub amb el medi de lisi durant 20 min en un agitador orbital a 4 °C a baixa velocitat. El tub es va centrifugar durant 10 min a 5000xg i 4 °C i es va recollir el sobrenedant. Aquest es va passar per un filtre de 0.45 µm, s'hi va afegir 400 µl de resina Strep-Tactin Superflow (IBA Tool) i es va incubar tota la nit a 4 °C en un agitador orbital. Al dia següent es va centrifugar l'extracte a 1000xg i 4 °C durant 5 minuts, es va retirar el sobrenedant i la resina es va

transferir a un tub Eppendorf, on es va netejar 5 vegades utilitzant 1 ml de tampó de neteja fred (30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet-P40, 20% glicerol). Es va passar la resina a una columna Microspin Column (GE Healthcare) i es van realitzar cinc rentats més amb 500 µl de tampó TBSG (30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 20% glicerol). Finalment es va eluir la proteïna amb la incubació de la resina durant 10 minuts amb el tampó d'elució (2.5 mM destiobiotina, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 20% glicerol), la centrifugació d'1 minut a 10000xg i la recolecció de la solució. A la proteïna eluïda se li incrementa la quantitat de glicerol i sal fins al 50% de glicerol i 1 M NaCl i en fem alíquotes que es congelen en nitrogen líquid i es conserven a -80 °C.

En el cas de la HMGS superactiva, al mètode de purificació se li afegeix un pas extra, ja que amb la incubació nocturna sense glucosa no s'eliminava tot el glicogen cel·lular. En aquest cas, una vegada recol·lectades les cèl·lules en tampó de lisi, s'hi afegia α -amilasa fins a una concentració de 22 U/ml i s'incubava l'extracte cel·lular durant 2 hores a temperatura ambient amb agitació orbital per tal de degradar tot el glicogen que pogués haver-hi a l'extracte cel·lular. Després d'aquest pas el protocol es seguia com amb la resta de variants de HMGS.

4. OBTENCIÓ DEL CRISTALL DE *PaGS* MONOMÈRICA I DETERMINACIÓ DE LA SEVA ESTRUCTURA

Es van obtenir cristalls de la forma monomèrica de *PaGS* per co-cristal·lització amb 10 mM d'UDPG i 10 mM maltohexaosa utilitzant el mètode de difusió de vapor de la gota assentada a 4 °C. Les gotes van ser preparades amb un robot (Cartesian) en una placa de cristal·lització de 96 pous mitjançant la mescla d'una solució d'enzim a 5 mg/ml amb una solució 2.2 M sulfat d'amoni i 0.2 M NaCl. Els cristalls van aparèixer després de dotze dies i van seguir

creixent durant dos mesos. Passat aquest temps es van congelar per immersió en nitrogen líquid utilitzant 20% glicerol a la solució mare com a crioprotector.

Es van recollir les dades de difracció de rajos X a la línia BM16 del sincrotró de Grenoble (ESRF, European Synchrotron Radiation Facility). Les reflexions van ser integrades amb el programa MOSFLM i escalades amb SCALA de CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4) (CCP4 1994).

Es va determinar l'estructura per reemplaçament molecular, utilitzant les coordenades de l'estructura trimèrica de *PaGS* (Horcajada et al. 2006). Usant MOLREP (CCP4 1994) es va fer la cerca, emprant inicialment el domini N-terminal de *PaGS* (residus 1-217) i completant-la després amb el domini C-terminal (residus 218-413). El model es va millorar per refinament de cos rígid i cicles alternatius de refinament automàtic i manual fins obtenir un R_{cryst} de 19.8% (R_{free} de 22.8%, calculat amb un 5% de les dades seleccionades a l'atzar) a una resolució de 2.6 Å. Les molècules de solvent van ser generades automàticament utilitzant ARP/wARP (CCP4 1994) i revisat visualment amb COOT (Emsley and Cowtan 2004). Al final es va fer també un refinament TLS per subunitats i dominis. L'estructura final mostrava una bona estereoquímica quan la vam analitzar PROCHECK (Laskowski and W. 1993). Les figures estructurals es van fer utilitzant PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA).

5. DETERMINACIÓ I SEPARACIÓ DE PROTEÏNES

5.1 Concentració proteica

La valoració de la concentració proteica es va realitzar mitjançant el Mètode de Bradford (Bradford 1976). El mètode està basat en el canvi del blau brillant de Coomassie en resposta a diferents concentracions de proteïna. En

una solució àcida, el blau brillant de Coomassie, quan es lliga a proteïnes, canvia el màxim d'absorbància de 465 nm a 595 nm.

Les mostres a analitzar es van diluir en aigua MilliQ fins a un volum final de 50 µl. Com a patrons es van utilitzar diferents dilucions d'albúmina de sèrum boví (BSA) a unes concentracions finals de 1, 2, 5, 10, 15 i 20 µg/µl. En tots els casos es va afegir 1 ml de reactiu de Coomassie (dilució 1:5 del colorant comercial *Bio-Rad protein assay*). Després de 5 minuts d'incubació, i mai excedint 60 minuts, es va mesurar l'absorbància de les mostres a 595 nm, fent servir com a blanc d'assaig 50 µl d'aigua MilliQ i 1ml de reactiu. Els resultats s'expressaven en µg de proteïna per µl.

5.2 SDS-PAGE

La separació de proteïnes d'un extracte es va dur a terme amb una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). L'extracte proteic es va tractar amb un tampó que contenia SDS i per tant conferia càrrega negativa a les proteïnes, mantenint constant la relació càrrega-massa. Les proteïnes es feien córrer en una malla del polímer acrilamida-bisacrilamida per acció d'un camp elèctric. La malla era de dos tipus, el primer gel, de porus grans, era concentrador i permetia l'acumulació de les proteïnes en una banda discreta abans de passar pel segon gel, que presentava porus més petits, i permetia la separació de les diferents proteïnes pel seu pes molecular.

L'extracte proteic dissolt en tampó de càrrega (glicerol 20% v/v, 2-mercaptoetanol 4% v/v, blau de bromofenol 60 µg/ml i Tris-HCl 125 mM pH 7.8) s'escalfava a 100 °C durant 5 minuts per a facilitar la seva aplicació en el gel. Es carregava la mateixa quantitat total de proteïna en cada pou. Els gels usats eren de 10x8 cm, 0,75 mm de gruix i al 8 o 10% d'acrilamida, preparats usant l'aparell *miniprotean* (*Bio-Rad*). La diferència de potencial usada era de 150-200 V i el

tampó d'electroforesi estava compost per Tri-HCl 25 mM, glicina 0.192 M, SDS 0.2% a pH 8.3.

5.3 Western blot

La tècnica de transferència usada es va descriure per Gershoni i Palade (Gershoni and Palade 1983). Implicava un muntatge en el qual una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF), prèviament activada uns segons en metanol, es dipositava sobre el gel, i el conjunt es comprimia. La transferència de les proteïnes des del gel a la membrana es va realitzava per electroforesi a un voltatge fix de 100 V durant 30 minuts, amb presència de gel per tal de refredar. El tampó usat estava format per Tris/HCl 20 mM, glicina 150 mM i metanol al 20% (v/v) a pH 8.3. Un cop finalitzada la transferència, les membranes es tenyien amb una solució de vermell de *Ponceau* (0.5 g vermell Ponceau, 2.5 ml àcid acètic glacial i aigua MQ fins 250 ml). Amb aquesta tinció de les proteïnes es comprovava que la transferència havia funcionat correctament. Les membranes es destenyien mitjançant un rentat amb PBS amb Tween-20 0.05% (v/v, *Sigma*) a pH 7.4.

Per a la immunodetecció es realitzaven les següents passes:

- a) Bloqueig: Incubació de la membrana amb solució de al 3% (p/v) en PBS, Tween-20 0.05% durant 30 minuts.
- b) Incubació amb anticòs primari: A la solució de bloqueig nova s'aplica l'anticòs específic per a la proteïna d'interès a la dilució recomanada per la casa comercial. La membrana s'incuba per un període mínim d'1 hora a temperatura ambient a un període màxim de 12 hores a 4 °C. Per tal d'extreure les restes d'anticòs no unit es procedeix a fer un mínim de tres rentats amb PBS, Tween-20 0.05% (v/v) de 10 minuts de duració.

- c) Incubació amb anticòs secundari: A la solució de bloqueig nova s'aplica l'anticòs secundari conjugat a la peroxidasa de rave (*Horseradish peroxidase*, *HRP*) i que reconeix específicament l'espècie de l'anticòs primari. La membrana s'incuba per un període mínim de 30 minuts a un període màxim d'1 hora a temperatura ambient. Per extreure les restes d'anticòs secundari no unit a l'anticòs primari es procedeix a fer un mínim de tres rentats amb PBS, Tween-20 0.05% (v/v) de 10 minuts de duració.
- d) Detecció: La detecció de les bandes corresponents a la proteïna d'interès s'aconseguia mitjançant un mètode fotomètric. El revelat de les membranes es va dur a terme amb una incubació de 5 minuts amb una solució de luminol (Immobilon Western, Millipore), doncs la reacció de detecció es basava en la seva oxidació. Així doncs la peroxidasa de rave catalitzava l'oxidació del luminol en presència de peròxid d'hidrogen, i això desencadenava una reacció quimioluminiscent que amb l'ús de films de radiografia ens permetia visualitzar la presència de les diferents bandes corresponents a les proteïnes d'interès.

Els anticossos primaris que es van fer servir van ésser: anticòs policlonal de conill MGS3, que reconeix la MGS (Cid et al. 2005), anticòs policlonal de conill L1, que reconeix la LGS (Garcia-Rocha et al. 2001), anticòs policlonal de conill que reconeix la GFP (Immunokontakt), anticòs monoclonal de ratolí que reconeix l' α -actina (Sigma), anticòs monoclonal de ratolí que reconeix l'epítot FLAG (Sigma), anticòs monoclonal de ratolí que reconeix histones (Chemicon), anticòs monoclonal de ratolí que reconeix la isoforma muscular de la piruvat quinasa (Schebo) i anticòs monoclonal de ratolí que reconeix la proteïna PSF (Sigma).

Els anticossos secundaris conjugats a la peroxidasa de rave usats varen ésser: anticòs que reconeix anticossos primaris de conill (Amersham) i de ratolí (DakoCytomation).

5.4 Tinció de gels de SDS-PAGE

Per al revelat general de proteïnes en gels de poliacrilamida s'han emprat dues metodologies: la tinció amb blau de Coomassie i la tinció amb nitrat de plata. La primera és menys sensible i se sol emprar amb la garantia de què, si s'observa proteïna, aquesta estarà en quantitat suficient per a aplicacions posteriors. La segona és la més sensible de les dues.

5.4.1 Tinció amb blau de Coomassie

La tinció inespecífica de proteïnes d'un gel de SDS-PAGE amb reactiu de Coomassie es va realitzar amb el producte comercial InstantBlue (Expedeon). El gel s'incubava amb aquest reactiu durant almenys 1 hora amb agitació orbital suau. Amb un sol pas s'aconseguia fixar les proteïnes del gel i tenyir-les. Una vegada incubat el temps necessari, es realitzaven diferents rentats amb aigua destil·lada fins a eliminar el fons blau de les zones del gel no ocupades per proteïna.

5.4.2 Tinció de proteïnes amb nitrat de plata

La tinció inespecífica de proteïnes d'un gel de SDS-PAGE amb reactiu de plata es va realitzar mitjançant el producte comercial Silver Stain Plus (BioRad). El mètode consistia en un primer pas de fixació del gel incubant-ho en una mescla metanol 50% i àcid acètic 10% en aigua complementada amb un potenciador de la fixació durant 20 minuts. Després d'uns passos de neteja amb aigua destil·lada s'incubava el gel amb un reactiu de tinció i revelat. Quan s'arribava al nivell desitjat de revelat s'afegia una solució de 5% àcid acètic per tal d'aturar el procés i s'incubava així durant 15 minuts. Finalment es netejava repetidament el gel amb aigua destil·lada.

5.5 Espectrometria de masses MALDI-TOF

La banda d'interès es retallava del gel de poliacrilamida amb l'ajuda d'un bisturí i es trossejava en petits fragments. Es feien tres rentats dels fragments amb NH_4HCO_3 25 mM / acetonitril (1:1) i un últim rentat amb NH_4HCO_3 25 mM. Per tal d'aliquil·lar els residus de cisteïna es feia un tractament de 30 minuts amb DTT 10 mM a 56 °C i posteriorment amb iodoacetamida 55mM durant 45 minuts a temperatura ambient. Es feien tres rentats amb NH_4HCO_3 25 mM, un amb acetonitril i un altre amb NH_4HCO_3 25 mM i finalment es repetien aquests dos darrers rentats. S'assecaven els fragments de gel i es tractaven amb una dilució 1/30 de 0.5 mg/ml tripsina (Promega) en NH_4HCO_3 25 mM durant tota la nit a 37 °C. Per aturar la tripsinització s'afegia àcid fòrmic i es recollien els pèptids resultants mitjançant extraccions amb diferents solucions d'àcid fòrmic en un bany d'ultrasons: una de 10 minuts amb àcid fòrmic 10%, una altra amb aigua/acetonitril (1:1)/àcid fòrmic 10% i una última amb acetonitril. S'ajuntaven les tres extraccions i s'assecaven al buit. Es resuspenien els pèptids en 6 µl d'acetonitril al 50%/TFA al 0.1% i es dipositava 1 µl en la placa de MALDI juntament amb 1 µl de matriu ACH a 2 mg/ml.

5.6 Obtenció d'un extracte nuclear

Per tal de d'obtenir l'extracte nuclear vam partir de plaques de cèl·lules HeLa. Les vam netejar amb PBS i les vam incubar durant 20 min a 37 °C amb DMEM complementat amb DSP 1 mM (*cross-linker* proteïna-proteïna hidrofòbic de 12 Å), glutamina i S/P. Passat el temps d'incubació vam tripsinitzar les plaques i vam recollir les cèl·lules amb medi DMEM complet. Vam separar les cèl·lules mitjançant la centrifugació a 4 °C i 1200 rpm i les vam netejar amb PBS fred. Vam repetir dues vegades més el cicle de centrifugació i neteja amb PBS fred. Finalment resuspeníem les cèl·lules en tampó NB (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , inhibidors de proteases i fosfatases). Aquest tampó

és hipotònic i fa que, amb la incubació de les cèl·lules en gel durant 10 min, aquestes augmentin el seu volum i la membrana citoplasmàtica es tensi. Vam trencar les cèl·lules mitjançant un homogeneïtzador Dounce i vam obtenir l'homogenat total. Es va centrifugar l'homogenat a 220xg durant 5 min a 4 °C i vam resuspendre el pellet en 4 ml de solució S1 (Sacarosa 0.25 M, 10 mM MgCl₂, inhibidors de proteases i fosfatases). Aquesta suspensió la vam disposar amb molta cura sobre 4 ml de solució S2 (Sacarosa 0.88 M, 10 mM MgCl₂, inhibidors de proteases i fosfatases) que prèviament havíem posat en un tub de plàstic. Les solucions S1 i S2 no s'han de mesclar, quedant així dues fases amb diferents densitat. Centrifuguem a 1450xg durant 5 min a 4 °C i observem un precipitat al fons, que és la fracció de nuclis. Descartem la resta, on han quedat les restes de membranes, orgànuls i citoplasma. El pellet nuclear es resuspèn en tampó de laboratori (Tris 10 mM, EDTA 15 mM, KF 150 mM, Sacarosa 0.2 g/ml, inhibidors de proteases i fosfatases) i es sonica, per tal de trencar els nuclis, alliberar el seu contingut i obtenir l'extracte nuclear, així com per a trencar la cromatina i disminuir la densitat de l'extracte.

5.7 Immunoprecipitació

En un tub eppendorf vam preincubar extracte nuclear de cèl·lules HeLa amb 150 µl de resina Sepharose 4B (Amersham Biosciences) durant 1.5 h a 4 °C i amb agitació orbital. Amb aquest pas extrèiem de l'homogenat proteïnes que es poguessin unir inespecíficament a la resina.

Vam centrifugar el tub durant 5 minuts a 1000xg i vam dividir el sobrenedant resultant. Vam incubar una part amb resina Sepharose 4B (Resina control) i l'altra amb resina Sepharose 4B amb anticòs IgG-MGS3 conjugat (Resina MGS3) duran 16 h a 4 °C. Acabat el temps d'incubació vam centrifugar els tubs durant 5 minuts a 1000xg i vam separar el sobrenedant. El pellet es va rentar 5 vegades amb solució d'immunoprecipitació i finalment es van extreure

les proteïnes immunoprecipitades de la resina bullint-la durant 5 minuts amb tampó de càrrega 2x (100mM Tris-HCl pH 6.8, DTT 20mM, SDS 4%, Blau de Bromofenol 0.2%, 20%).

6. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

6.1 Determinació de l'activitat GS

L'activitat enzimàtica fou determinada mesurant la incorporació d'UDP- $[^{14}\text{C}]$ -glucosa a glicogen (Thomas et al. 1968).

L'activitat GS es pot mesurar en absència i presència de G6P. Per determinar l'activitat glicogen sintasa en absència de G6P s'utilitzava una solució d'assaig composta d'UDP- $[^{14}\text{C}]$ -glucosa 2000 cpm/ μl , UDP-glucosa 6.7 mM, glicogen 10 mg/ml, KF 25 mM, EDTA 20 mM, i Tris 50 mM ajustat a pH 7.8 amb HCl. Si es determinava en presència de G6P es preparava la mateixa solució però canviant la concentració d' UDP- $[^{14}\text{C}]$ -glucosa a 1000 cpm/ μl i s'hi afegia G6P 10.8 mM. En el nostre cas s'ha de tenir en compte que el reactiu d'assaig canvia quan determinem la K_m de la GS per glicogen, preparant diferents solucions d'assaig amb quantitats variables de glicogen.

Per a realitzar l'assaig, es dipositaven 40 μl de la solució d'assaig en un tub eppendorf i el col·locàvem bloc sec a la temperatura desitjada. Tot seguit, s'hi afegien 20 μl de mostra i la barreja es deixava incubar 10 minuts. Una vegada passats aquests minuts, s'extreien 50 μl de la barreja de reacció i es dipositaven en un tros de paper 31-ET (*Whatman*). El glicogen es precipitava en el paper per immersió d'aquest en etanol 66% a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 10 minuts. És aquest canvi de temperatura el que provocava la precipitació i fixació al paper del glicogen present en la barreja. Després de dos rentats de 10 minuts amb d'etanol 66% a temperatura ambient, els papers es submergien en acetona per desplaçar l'etanol 66% i poder assecar-los

completament. Els papers secs s'introduïen en vials que contenen líquid de centelleig *Ecolite* (MP). La radioactivitat es comptava amb un comptador de centelleig *Rack BETA 1217* (LKB). L'activitat GS s'expressava com a mU per mg de proteïna.

6.2 Determinació de l'activitat glicosiltransferasa per fluorescència

Aquest mètode ha estat desenvolupat i validat durant la realització d'aquesta tesi. És un mètode on es mesura l'activitat glicosiltransferasa de la glicogen sintasa independentment del substrat acceptor que emprem i està basat en la mesura de l'UDP alliberat en la reacció i no la de la quantitat de residus glicosil transferits.

Per portar a terme aquest mètode es preparava el següent reactiu d'assaig: 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 9 mM UDPG, 13.2 mM G6P, 33 mM MgCl₂, 133 mM KCl, 33 mU/ml nucleòsid-difosfat quinasa (NDPK) i 400 µM ATP.

Situàvem una placa de 386 pous de fons negre en un bany calefactor a 37 °C i deixàvem temperar. S'introduïen 10 µl del reactiu d'assaig a cada pou i 5 µl de maltohexaosa 200 mM, que era l'acceptor de la reacció glicosiltransferasa que volíem emprar. També fèiem alguns pous on afegíem aigua enlloc de substrat acceptor i que ens servien de blanc de la tècnica. Es deixava uns minuts a 37°C per a què tot es temperés.

Finalment s'anava afegint 5 µl de la dilució de GS que volíem mesurar (al voltant de 0.6 ng/µl pel cas d'HMGS) a cada pou de forma seqüencial i cada 15 segons. S'incubava durant 10 minuts a 37 °C, durant els quals es produïa la reacció glicosiltransferasa catalitzada per la GS i es generava UDP. Per cada

molècula d'UDP generada, l'acció de l'NDPK produeix una molècula d'ADP, que és el metabòlit realment mesurat. Passats 10 minuts des de l'inici de la reacció al primer pou, s'afegien 10 µl del reactiu A i 20 µl del reactiu B del kit ADP Hunter Plus (Discoverx), un kit de mesura d'ADP, que paraven la reacció de NDPK i generaven una molècula del fluoròfor resorufina per cada molècula d'ADP. L'addició dels reactius del kit de mesura d'ADP als diferents pous també es fa de forma seqüencial i cada 15 segons, de forma que a cada pou s'hagi donat la reacció de GS i NDPK durant exactament 10 minuts.

Passats 15 minuts després de l'addició dels reactius A i B del kit ADP Hunter Plus, s'afegien 5 µl d'una solució d'aturada de les reaccions de generació de resorufina que estabilitzava la mesura. Finalment es mesurava la fluorescència a longitud d'ona d'excitació a 530 nm i longitud d'ona d'emissió a 590 nm en un lector de fluorescència en plaques.

Durant la reacció també es feia una corba patró d'UDP. Es posaven 10 µl de diferents patrons amb concentracions compreses entre 2 µM i 300 µM i s'afegien 10 µM del reactiu d'assaig. Passat 10 minuts es seguia el protocol igual que amb les mostres, afegint tots els reactius del kit de mesura d'ADP i mesurant la fluorescència.

7. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS

7.1 Determinació de la quantitat de glicogen

Es va determinar el glicogen d'extractes cel·lulars preparats a partir de plaques de cèl·lules congelades a -80 °C. Per determinar el glicogen d'extractes cel·lulars es van afegir 100 µl d'una solució de KOH al 30% per placa de 60 mm de diàmetre mantinguda a 4 °C, i amb l'ajut d'una rascleta es recuperava tot el contingut. Els extractes alcalins es van incubar a 100 °C durant 15 minuts, i la

quantificació del glicogen es va fer utilitzant l'assaig de l'amiloglucosidasa (Chan and Exton 1976). Els extractes es van aplicar sobre paper 31-ET (*Whatman*), i un cop assecats, els papers es van submergir en etanol al 66 % a -20 °C durant 10 minuts per tal de precipitar el glicogen. Es feien dos rentats de 10 minuts amb etanol al 66% a temperatura ambient, es passaven els papers per acetona per extreure l'aigua que hi pogués quedar i es deixaven assecar. Els papers es van dipositar en tubs on hi havia 1 ml d'una solució amb amiloglucosidasa (25 U/l) preparada en tampó d'acetat de sodi 100 mM a pH 4.8, i es van incubar a 37 °C durant 90 minuts en agitació. Aquest període d'incubació permetia que l'amiloglucosidasa hidrolitzés el glicogen donant lloc a molècules de glucosa. Aquestes molècules de glucosa són les que es mesuraven en els diferents tubs, mitjançant la tècnica de l'hexoquinasa-G6P deshidrogenasa (Bergmeyer 1974) disponible en forma d'assaig comercial (*Glucose HK CP, ABX Pentra*) i adaptat a l'autoanalitzador Cobas Bio (*ABX Diagnostics*). Els resultats s'expressaven com a µg de glicogen mg de proteïna en el cas de la determinació del glicogen acumulat en cèl·lules.

8. TÈCNIQUES D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

8.1 Immunofluorescència. Cèl·lules crescudes sobre cobreobjectes

Els cobreobjectes de 10-12 mm de diàmetre que contenen les cèl·lules crescudes en monocapa a analitzar es tractaven amb una solució fixadora de paraformaldehid al 4% en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient. Passat el temps d'incubació, es procedia a fer dos rentats amb tampó PBS de 10 minuts, i els cobreobjectes es mantenien en PBS 1X amb azida 0.05% a 4 °C fins el moment del seu ús per evitar la possible contaminació per fongs. La manipulació d'aquests cobreobjectes sempre es duia a terme amb pinces invertides (*A. Dumont & Fils*).

El protocol usat sempre es realitza a temperatura ambient i consisteix en els següents passos:

- a) Reducció: incubació amb una solució de NaBH_4 en PBS (1mg/ml, *Merck*) durant 10 minuts per a reduir les restes de paraformaldehid.
- b) Permeabilització: incubació amb una solució de Tritó X-100 0.2% en PBS (v/v).
- c) Bloqueig: per tal de bloquejar les unions no específiques es tractaven amb una solució de BSA al 3% (p/v) en PBS, Tritó X-100 al 0.2% durant 10 minuts.
- d) Incubació amb anticòs primari : L'anticòs específic per a la proteïna d'interès es dilueix en una solució BSA al 3% (p/v) en PBS a la dilució recomanada per la casa comercial. Els anticòssos primaris usats van ser l'anticòs de ratolí monoclonal específic per a glicogen (cedit pel Dr. Otto Baba), anticòs de ratolí monoclonal contra PSF (Sigma) i l'anticòs policlonal de conill MGS3 contra MGS (Cid et al. 2005). Sempre es feien servir controls de l'especificitat de l'anticòs primari, que consistien en cobreobjectes amb cèl·lules fixades que no eren tractats amb l'anticòs primari. Els cobreobjectes s'incubaven per un període mínim de 45 minuts amb aquesta solució. Passat aquest període es procedia a fer un mínim de tres rentats amb PBS, de 10 minuts de duració.
- e) Incubació amb anticòs secundari : A una solució BSA al 3% (p/v) en PBS s'aplicava l'anticòs secundari específic conjugat algun fluoròfor. En el nostre cas vam utilitzar TRITC Goat Anti-Mouse (*Chemicon*) i TRITC Goat Anti-Rabbit (Jackson), que reconeixen específicament l'espècie de l'anticòs primari. A la solució amb anticòs secundari hi afegíem DAPI (0,01 mg/ml) per tal de visualitzar els nuclis cel·lulars. La incubació amb anticòs secundari és de 30 minuts. Per extreure les restes d'anticòs secundari no unit a l'anticòs primari es procedia a fer un mínim de tres rentats amb PBS, de 10 minuts de duració.

- f) Assecat i Muntatge: Els cobreobjectes es rentaven seqüencialment amb aigua MilliQ i amb etanol al 96% i es deixaven eixugar a l'aire fins al seu muntatge sobre portaobjectes de vidre. Es col·locaven els diferents cobreobjectes sobre una gota de Mowiol (*Aldrich-Sigma*) en els portaobjectes, pressionàvem per eliminar les restes de resina de muntatge i desàvem els portaobjectes a 4 °C fins a la seva visualització.

9. MICROSCÒPIA

9.1 Microscòpia confocal

Les imatges de microscòpia de fluorescència van ésser obtingudes en un microscopi confocal invertit amb detecció espectral *Leica TCS SP5 o SPE* (*Leica Microsystems*). L'objectiu usat era de lent 63x/1.4 amb oli d'immersió. Hem utilitzat un diode ultraviolat que emet a una freqüència de 405 nm per observar la tinció nuclear DAPI, un làser d'argó que emet a 488 nm per observar la fluorescència de GFP i un làser de HeNe que emet a 543 nm útil per observar el fluoròfor TRITC.

9.2 Microscòpia d'epifluorescència

Les imatges de microscòpia d'epifluorescència es van obtenir amb un microscopi vertical Nikon E1000. De la llum provinent d'una làmpada de mercuri es seleccionaven les diferents longituds d'ona a emprar gràcies a un joc de filtres. Vam utilitzar els filtres UV-2A (excitació 330-380 nm; emissió 420 nm) per visualitzar la tinció nuclear DAPI, el filtre FITC (excitació 465-480 nm; emissió 515-555 nm) per a GFP i el filtre G2A (excitació 510-560 nm; emissió 590 nm) per a TRITC. Es va utilitzar un objectiu de lent 60x/1.4 amb oli d'immersió. Es

van prendre les imatges utilitzant una càmera Cool Snap fx (Photometrics) i els software Metamorph v6.3r0 (Olympus).

10. TÈCNIQUES D'AVALUACIÓ DE LA UNIÓ ENTRE LA GLICOGEN SINTASA I EL GLICOGEN

En aquesta tesi s'ha estudiat àmpliament la unió entre la glicogen sintasa i el glicogen. Per avaluar aquesta afinitat ha estat necessari utilitzar tot un ventall de tècniques més enllà del càlcul de la K_m de l'enzim pel glicogen. Aquestes tècniques ens han permès detectar la interacció directa entre la GS i el glicogen *in vitro* així com la dinàmica d'interacció *in vivo* mitjançant tècniques de fluorescència amb cèl·lules vives que expressaven diferents construccions de GS fluorescents.

10.1 Cosedimentació amb glicogen

Per tal d'avaluar si el residu Tyr174 de la PaGSmon era important en la capacitat d'unió a glicogen de l'enzim vam realitzar una cosedimentació amb glicogen de la PaGSmon salvatge purificada i de la seva variant Y174A. Es va utilitzar una modificació d'un protocol prèviament descrit (Wang et al. 2002).

En un tub de policarbonat es van afegir 4 µg d'enzim PaGSmon en 0.4ml de tampó de cosedimentació (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0.1 mg/ml albúmina de sèrum boví) amb o sense 10 mg/ml de glicogen hepàtic. La mescla es va incubar a 4 °C durant 30 min i amb agitació orbital. Després els tubs es van ultracentrifugar a 100000xg i 4 °C durant 90 minuts. Es va separar el sobrenadant i el precipitat de glicogen es va incubar amb 200 µl d'amilasa 22 U/ml a 30 °C durant 1 hora per tal de degradar-ho.

Al final obtenim mostres de la mescla inicial, el sobrenadant i el precipitat degradat. Aquestes es carreguen en un gel de SDS-PAGE i el gel resultant es revela amb blau de Coomassie per tal de veure les bandes de proteïnes de cada fracció.

10.2 Recuperació de la fluorescència després del fotoblanquejament (FRAP)

10.2.1 Introducció al FRAP

El mètode de recuperació de la fluorescència després del fotoblanquejament (FRAP; de l'anglès *Fluorescence recovery after photobleaching*) utilitza el fenomen del fotoblanquejament de sondes fluorescents per mesurar paràmetres relacionats amb la mobilitat d'una molècula. El fotoblanquejament és un fenomen que es dona en microscòpia de fluorescència on, durant la presa d'imatges, la fluorescència del fluoròfor va minvant progressivament quan és excitat pel làser.

En els experiments de FRAP s'utilitza aquest fenomen, normalment indesitjat, per al fotoblanquejament d'una àrea específica mitjançant un pols de làser d'alta intensitat. Aleshores la cinètica de recuperació de fluorescència en aquesta àrea es registra mitjançant la presa d'imatges en intervals de temps regulars utilitzant el làser amb baixa intensitat. El mètode va ser inicialment desenvolupat per a mesurar difusió en dos dimensions de proteïnes de membrana (Axelrod et al. 1976).

En cèl·lules no blanquejades les molècules fluorescents estan en equilibri. Blanquejar una fracció del les molècules fluorescents en una regió del nostre interès (ROI) destorba aquest equilibri (**Figura 41; A**). El moviment de les

proteïnes a la cèl·lula fa que hi hagi un intercanvi entre la zona blanquejada i la resta de la cèl·lula, que implica una sortida de cèl·lules blanquejades de la ROI i una entrada de cèl·lules fluorescents, que resulta en una recuperació de la fluorescència en la zona blanquejada. La senyal de fluorescència s'estabilitzarà quan arribem a una nova situació d'equilibri. En condicions òptimes, la cinètica de recuperació de la fluorescència en la ROI depèn només de la mobilitat de la molècula investigada (el coeficient de difusió efectiva i la cinètica d'unió a estructures macromoleculars).

Les corbes de recuperació de fluorescència s'ajusten a un model exponencial (**Figura 41; B**):

$$y(t) = A \cdot (1 - e^{-t/\tau})$$

A partir d'aquest ajustament podem calcular paràmetres que són característics de cada proteïna, com la fracció mòbil (A) i el temps mig de recuperació ($\tau_{1/2}$):

- La fracció mòbil és el tant per cent de fluorescència que es recupera en la ROI. Si la fracció mòbil és del 100% vol dir que al final de l'experiment totes les proteïnes blanquejades han estat recanviades per molècules fluorescents de fora de la ROI. En el cas que la fracció mòbil sigui menor al 100% significa que hi ha una part de la proteïna que està unida a una estructura immòbil, raó per la qual al final de l'experiment no ha intercanviat el seu lloc per una molècula fluorescent.
- El temps mig de recuperació és el temps després del blanquejament al qual tenim una recuperació que és la meitat de la recuperació final que obtindrem. Aquest valor s'obté a partir del paràmetre τ , calculat a partir de l'ajustament de la corba experimental al model exponencial.

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 0.5}{-\tau}$$

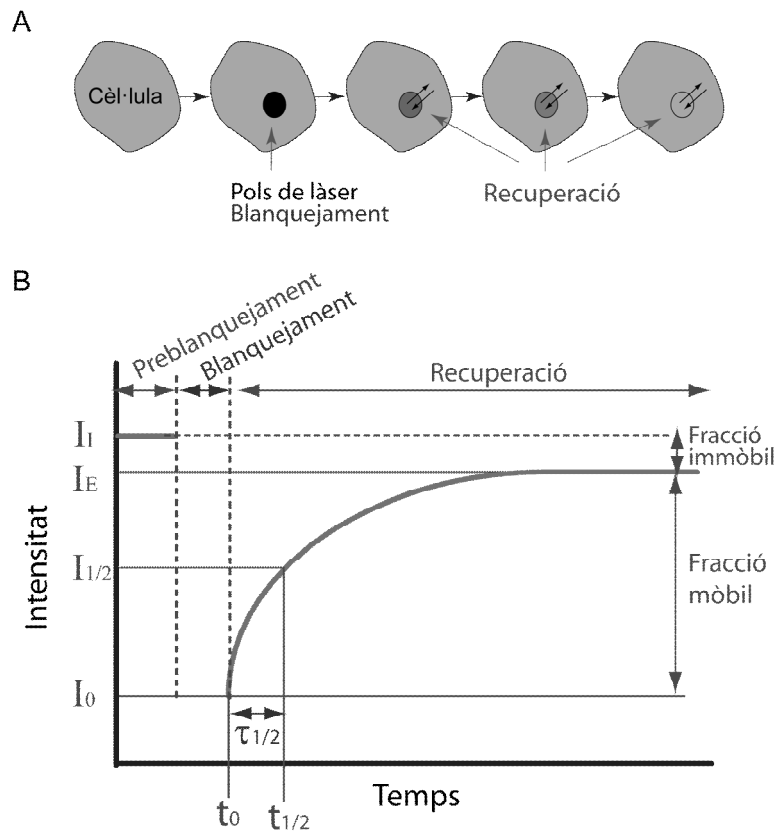


Figura 41. (A) Esquema del procés que es dona en un experiment de FRAP. Adaptat de (Sprague and McNally 2005). (B) Exemple de corba de recuperació de fluorescència (verd), indicant els diferents paràmetres que se'n poden extreure. A la part de dalt s'indiquen les diferents fases de l'experiment. Adaptat de <http://www.embl.de/eamnet/frap/>.

En el nostre cas el fluoròfor utilitzat és la molècula fluorescent GFP. Aquesta compleix una condició necessària per al FRAP: que és fotoblanquejada amb el làser a alta potència però mostra un baix fotoblanquejament quan la intensitat de làser utilitzada per a prendre les imatges.

Durant la captació d'imatges després del fotoblanquejament de la ROI, com en tota la microscòpia de fluorescència, hi ha blanquejament no desitjat. Per aquesta raó no només enregistrem la ROI, sinó la cèl·lula sencera. Això és necessari per a poder realitzar un procés de normalització de les mesures de fluorescència. Durant els càlculs eliminarem la influència del blanquejament produït durant la presa d'imatges de les nostres mesures.

El FRAP es pot portar a terme tant en microscopis d'epifluorescència com en microscopis confocals. Mentre que els primers han de ser adaptats, ja que normalment no tenen un sistema per a regular la intensitat dels làsers, els segons sí vénen ja amb un mòdul de regulació d'intensitat de làser que permet un canvi ràpid entre l'alta intensitat necessària per a realitzar el fotoblanquejament i la baixa intensitat emprada en la presa d'imatges. També s'ha de tenir en compte que com major sigui la mobilitat de la molècula, major ha de ser la velocitat de presa d'imatges del microscopi.

No hi ha unes condicions úniques per a realitzar el FRAP. Normalment s'ha d'optimitzar la resolució de les imatges, la velocitat a la qual es prenen i la intensitat del làser. Per a una velocitat ràpida d'enregistrament d'imatges aquestes s'han de prendre a la mínima resolució necessària i a la major intensitat de làser possible sempre que no ens doni un blanquejament excessiu durant la presa d'imatges.

10.2.2 Protocol de FRAP per a la glicogen sintasa

Per als nostres experiments de FRAP hem utilitzat cèl·lules HeLa en plaques MatTek amb fons de vidre. Van ser transfectades amb el constructe fluorescent desitjat i es van realitzar els experiments de FRAP 24 hores després de la transfecció en un microscopi confocal Leica SP5. Durant l'experiment les cèl·lules es van mantenir en el medi de cultiu en una cambra a 37 °C i 5% CO₂. Vam emprar un làser d'argó de 488 nm i un objectiu amb una lent 63x/1.4, utilitzant oli d'immersió pel contacte entre l'objectiu i la placa. Es van prendre imatges de 512x512 píxels a 1000Hz, amb line average x4, obertura de pinhole de 4 airy i un temps mínim de captació per imatge de 1.1 s.

Per a avaluar l'afinitat del constructe de GS pel glicogen es fotoblanquejava una partícula sencera de glicogen i, per tant, la proteïna fluorescent que hi estigues unida. La seqüència de FRAP estàndard que vam

seguir consistia en 10 imatges abans del blanqueig a 1.1 s/imatge (intensitat relativa del làser de 5%), un pols de fotoblanqueig de 1.1 s fent zoom sobre la ROI (intensitat relativa del làser del 100%), 100 imatges post-blanqueig a 1.1 s/imatge (intensitat relativa del làser de 5%) i 50 imatges a 5 s/imatge (intensitat relativa del làser de 5%). Es va corregir el moviment i la rotació de la cèl·lula o el gra de glicogen utilitzant ImageJ (W. Rasband, NIH) complementat amb l'extensió "Stack Reg" (Thevenaz et al. 1998). La intensitat de fluorescència va ser quantificada en la ROI i en altres regions d'interès, a les quals se'ls va sostreure la fluorescència de fons. Les corbes obtingudes es van normalitzar (Phair et al. 2004) i ajustar al model exponencial utilitzant el software IgorPRO6 complementat amb la novena versió del procediment K_FRAPcalc (KotaMiurea, EMBL-Heidelberg, Germany).

10.3 Biacore

10.3.1 Introducció al Biacore

Biacore és el nom comercial d'una empresa sueca i la seva gama de tecnologia per a mesurar interaccions a través del fenomen físic de la ressonància superficial de plasmó (SPR; de l'anglès *surface plasmon resonance*).

La SPR és un fenomen que es dona en una pel·lícula fina conductora a la interfase entre medis amb diferent índex de refracció. En el sistema de Biacore s'utilitza un xip sensor que es posa en contacte amb una fase líquida mòbil. Els medis amb diferent índex de refracció són el vidre del xip sensor i la solució assajada, i la pel·lícula conductora es una fina capa d'or a la superfície del xip sensor. En el Biacore es fa incidir llum d'una certa longitud d'ona sobre el vidre de forma que sigui reflectida. Però hi ha un angle precís al qual es dona el fenomen de la SPR, que crea plasmons a la superfície del film d'or. Els

plasmons són ones electromagnètiques que es propaguen de forma paral·lela a la làmina de metall. A la vegada que es dona aquest fenomen de SPR, hi ha una baixada en la intensitat de llum reflectida respecte a altres angles. Així, en el Biacore es mesura l'angle d'incidència al qual hi ha el mínim reflexió de la llum (**Figura 42; A**).

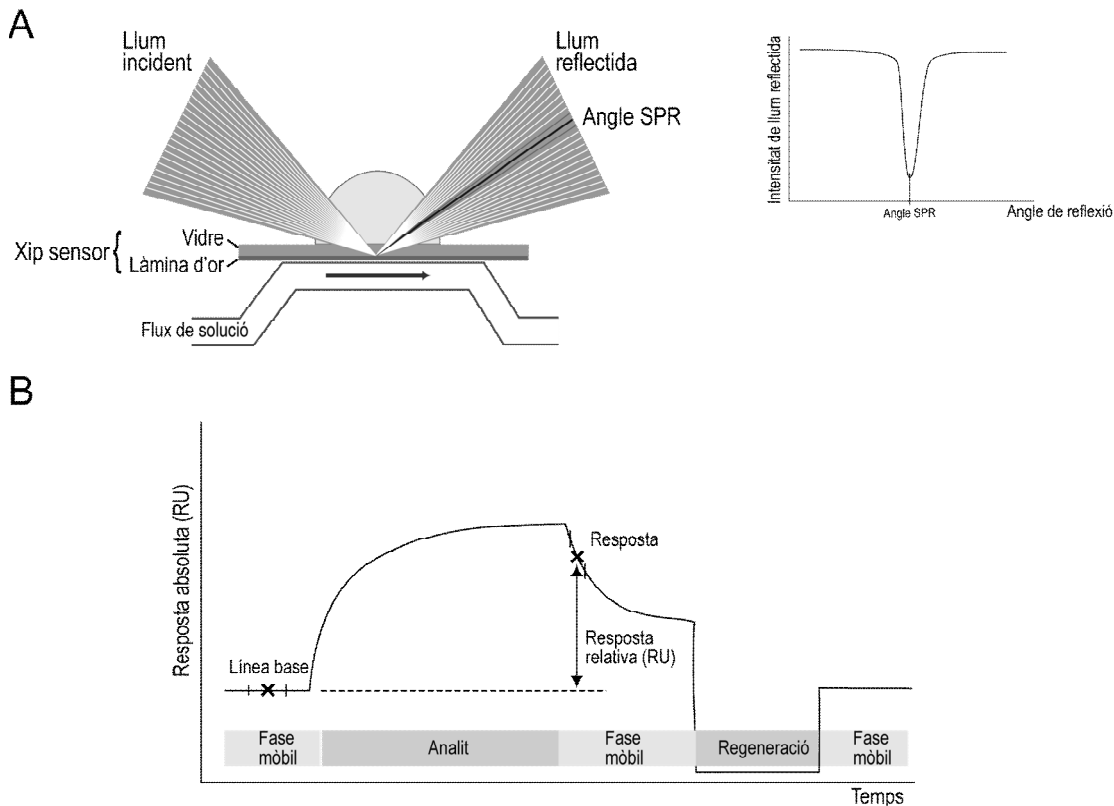


Figura 42. (A) Representació esquemàtica de com es dona el principi de SPR en un xip sensor de Biacore. (B) Exemple de sensograma, indicant a sota les diferents solucions que passem a través del xip. Ambdues imatges adaptades de Biacore Sensor Surface Handbook, Edition AB.

Les condicions per a aquest efecte ressonant són molt sensibles a l'índex de refracció dels medis a banda i banda del film d'or. Canvis en la concentració de solut a la superfície del xip sensor causa canvis en l'índex de refracció de la solució que es poden mesurar pel desplaçament de l'angle d'incidència que desencadena el fenomen de SPR. Aquest desplaçament es dona en unitats de ressonància (RU).

Als experiments de Biacore s'analitza la capacitat i cinètica d'interacció entre dues molècules, que anomenarem lligand i analit. El lligand s'uneix covalentment a la superfície del xip. Hi ha gran quantitat de xips amb diferents superfícies que permeten ajustar l'estratègia d'unió covalent a la naturalesa química del lligand. Una vegada tenim unit el lligand, fem passar sobre la superfície del xip una fase líquida mòbil que tindrà una concentració coneguda d'analit. Si hi ha interacció entre el lligand i analit, l'analit quedarà retingut al xip. Aquesta unió canviarà les propietats de la superfície del xip i desplaçarà l'angle al qual es dona la SPR. Aquest desplaçament és proporcional a la massa. Així, a major massa unida a la superfície del xip, major és la quantitat de RU que llegeix l'aparell. Com que la mesura s'obté de forma contínua en el temps, s'acaba obtenint un sensograma que permet seguir la cinètica d'unió de forma precisa (**Figura 42; B**).

Una vegada la unió entre analit i lligand arriba a un estat estacionari es passa fase líquida sense analit. A partir d'aquest moment el lligand deixarà anar l'analit amb una cinètica depenent de l'afinitat entre ambdós, disminuint la massa unida al xip i per tant la lectura de RU. Podrem seguir així la cinètica de desunió entre l'analit i el lligand.

Al final de cada cicle d'unió-desunió hi ha un pas de regeneració del xip, en què es generen les condicions per a alliberar tot l'analit i poder començar un nou cicle, normalment amb una nova concentració d'analit.

A l'hora de triar quina de les dues molècules que volem assajar ha de ser lligand i quina analit, hem de tenir en compte que la resposta en aquesta tècnica és directament proporcional al pes molecular de l'analit i inversament proporcional al pes molecular del lligand. És per aquesta raó que, en cas que les dues molècules tinguin un pes molecular molt diferent, la que el té més baix s'utilitza com a lligand i la que el té més alt com a analit.

Els xips tenen quatre canals i se'n poden emprar un, dos o quatre en cada experiment. Normalment se n'utilitzen dos com a mínim, ja que és cabdal per a una mesura acurada tenir un canal que enregistra la senyal de fons.

10.3.2 Protocol de Biacore per a HMGS

A l'hora de triar una estratègia per a poder mesurar la interacció entre HMGS i el glicogen vam haver de tenir en compte la diferència de pes entre ambdós, la capacitat d'unió d'HMGS a carbohidrats i la capacitat que teníem de desfer la interacció entre lligand i analít.

El factor del pes molecular va fer que ens decantéssim per emprar l'enzim com a lligand. Per tant, el xip havia de tenir capacitat d'unió de proteïnes. La major part del xips que uneixen proteïnes estan basats en una matriu de dextrà amb gran nombre de grups carboxils terminals, que són derivats i activats per tal d'unir el lligand. La utilització de dextrà augmenta molt la superfície reactiva, però és un carbohidrat, i per tant existia la possibilitat que l'HMGS hi interaccionés. Per aquesta raó ens vam decantar per l'ús del xip C1. Aquest xip no té cap matriu de dextrà sinó que té grups carboximetil directament units al film d'or. Per tal d'unir proteïna es deriven els carboxils a ésters de succinimida, un grup que reaccionarà amb amines i altres grups nucleofílics formant un enllaç covalent (**Figura 43**)

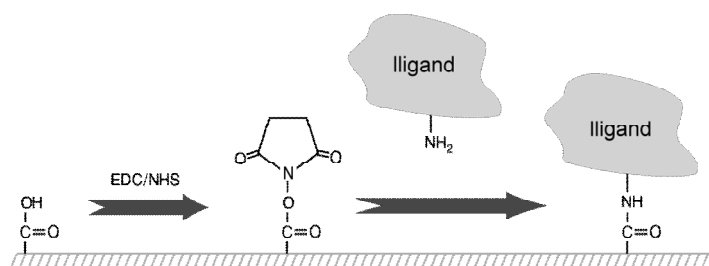


Figura 43. Esquema de l'activació del grup carboxil de la superfície del xip i la unió d'un lligand a través d'una amina (EDC és 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida; NHS és N-hidroxisuccinimida).

Una vegada triat el xip i l'estratègia d'unió de l'HMGS, faltava pensar en la manera de portar a terme el cicle de regeneració. Calia que després de cada cicle fóssim capaços de trencar la interacció entre glicogen i HMGS per tal d'alliberar el carbohidrat i en el següent cicle poder passar-ne una nova concentració. El problema és que aquesta unió és molt forta i no coneixíem cap manera de trencar la interacció d'una forma suau per a què l'HMGS no es desnaturalitzés. Per aquesta raó vam decidir aprofitar que la HMGS purificada té un epítot FLAG. Lligaríem l'anti-FLAG al xip per a després unir-hi l'HMGS, que interacciona fortament a l'anticòs, i després hi passaríem la solució de glicogen per a enregistrar la interacció entre l'enzim i el glicogen. Aquest disseny solucionava la fase de regeneració, ja que la interacció entre l'anti-FLAG i l'epítot que s'hi uneix es pot trencar passant una solució de 10 mM glicina pH 2.2. Així eliminaríem tant l'enzim com el glicogen i l'anticòs quedaria a disposició d'un nou cicle d'unió d'enzim i analit.

Una vegada decidida l'estratègia vam passar a preparar el xip. Després de deixar-lo temperar durant 30 minuts es va carregar en un aparell Biacore T100 (Biacore, GE Healthcare). L'aparell es controla amb un ordinador a través del programa Biacore T100 Control Software (Biacore, GE Healthcare). La fase mòbil durant tot el procés va ser tampó HBSN (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl). Vam realitzar les següents passes per a preparar tot el xip:

- Vam passar dues vegades una solució d'hidratació 0.1M glicina pH12 amb 0.3% Tritó X-100 durant 2 minuts.
- Un pas de normalització del xip, passant glicerol 70% durant nou minuts.

Una vegada preparat el xip fem una prova d'unió de l'anticòs a diferents pHs. Aquest assaig ha de fer-se amb totes les proteïnes per a determinar quin és el pH òptim d'unió entre el xip i l'anticòs. Aquest assaig es fa sense activar els grups carboxils del xip, ja que encara no volem unir l'anticòs de forma covalent sinó detectar a quin pH hi ha una major adsorció, que normalment es sol

correspondre amb la reactivitat que tindrà després amb els grups carboxils activats. Vam passar l'anticòs diluït en diferents tampons (maleat pH 8.5, acetat pH 6 i acetat pH 4) i finalment el pH 4 va resultar ser l'òptim.

Tot seguit vam procedir a fer la immobilització de l'anti-FLAG. Ho vam fer per a dos canals, ja que pels assajos n'havíem d'emprar un com a control i l'altre per a unir HMGS. Entre les diferents fases del protocol contínuament es feia passar fase mòbil a un flux de 15 µl/min, que era el flux emprat per defecte:

- Activació dels grups carboxils passant una solució 0.2 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) i 50 mM N-hidroxisuccinimida en aigua durant 7 minuts.
- Pas d'una dilució 30 µg/ml d'anti-FLAG en tampó acetat pH4 durant 7 minuts a un flux de 5 µl/min. Ho repetíem 3 vegades. En aquest pas l'anticòs s'unia covalentment al xip.
- Finalment passavem una solució 1 M d'etanolamina-HCl en 0.1 M fosfat de sodi a pH7. Amb l'etanolamina segellàvem tots els grups carboxils activats que no van immobilitzar anticòs.

Vam unir una massa d'anticòs que va fer pujar la lectura basal del xip unes 1000 RU. Aquesta mesura ens permetia comparar immobilitzacions de diferents experiments.

Una vegada tenim el xip amb anticòs unit en dos canals, podem començar els cicles de mesura de la interacció entre HMGS i el glicogen. L'única diferència entre els dos canals era el substrat que unim a l'anti-FLAG. En el cas del primer canal, que ens servia de control, es va unir pèptid FLAG de forma que quan passéssim el glicogen ens donés la mesura derivada del pas de la solució de glicogen. En el segon canal es va unir HMGS a l'anti-FLAG, de forma que la mesura era derivada del pas de la solució de glicogen juntament amb la unió que es donés entre glicogen amb la HMGS unida al xip. Una vegada acabada la

mesura vam poder sostreure els valors del canal control al canal on havíem fet l'assaig d'unió i obtenir així la mesura que resultava estrictament de la unió del glicogen a HMGS.

Al començament de l'assaig es va fer un preconditionament del xip, necessari per a establir la mesura a l'inici de la mesura. Es repetia tres vegades el següent cicle:

- Bloqueig de l'anti-FLAG. Pas d'una solució 5 µg/ml de pèptid FLAG en tampó TBSG (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 20% glicerol) amb un flux de 10 µl/min durant 6 minuts.
- Regeneració del xip. Pas d'una solució 10mM glicina pH 2.2 a 30 µl/min durant 2 minuts. Dissociàvem el pèptid de l'anticòs.

Seguidament repetíem el mateix esquema de cicle. En cada cicle mesuràvem una concentració de glicogen en particular i una variant d'HMGS, ja sigui la salvatge o el mutant Y239A, fins a obtenir un conjunt de dades complet per a cada variant d'HMGS en un rang de concentracions de glicogen. Cada cicle es composava de les següents passes que es feien simultàniament en els dos canals excepte en el pas de captura:

- Pas de captura. Mentre que pel canal control passàvem una solució 5 µg/ml de pèptid FLAG en tampó TBSG (30 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 20% glicerol), pel canal d'assaig es passava una solució 10 µg/ml de HMGS en TBSG. Tot es feia amb un flux de 10 µl/min durant 3 minuts. Després passàvem tampó HBSN durant 3 minuts per a establir la mesura.
- Associació de l'analít. Pas d'una solució de glicogen en tampó HBSN de concentració desitjada a 30 µl/min. Es van assajar concentracions entre 0 i 0.4 mg/ml de glicogen. En un experiment el temps de contacte va ser de 2 minuts i en un altre ho vam allargar fins a 5 minuts.

- Dissociació de l'analit. Pas de tampó HBSN 30 µl/min durant 2 minuts per enregistrar com es dissocia el glicogen unit en el pas anterior. Aquest pas durava el mateix temps que l'anterior.
- Regeneració del xip. Pas d'una solució 10mM glicina pH 2.2 a 30 µl/min durant 2 minuts. Així eliminàvem tant la HMGS com el pèptid FLAG units al xip juntament amb el glicogen que hi quedés unit.

Una vegada acabada la regeneració podíem tornar a començar el cicle. Quan ja vam tenir enregistrats tots els sensogrames els vam analitzar amb el software Biacore T100 Evaluation Software (Biacore, GE Healthcare).

11. ASSAIG DE CANVI DE MOBILITAT ELECTROFORÈTICA

L'assaig de canvi de mobilitat electroforètica (EMSA; de l'anglès *Electrophoretic mobility shift assay*) és un assaig utilitzat per a detectar interaccions proteïna-ADN i proteïna-ARN. L'àcid nucleic assajat ha d'estar marcat, normalment amb un radioisòtop, de forma que funcioni com a sonda.

Esquemàticament, en aquesta tècnica s'incuba una proteïna en presència de la sonda marcada. Després carreguem en un gel nadiu de poliàcrilamida una mostra amb sonda sola i una mostra amb el resultat de la incubació, i fem l'electroforesi per resoldre-les en gel. En cas que hi hagi interacció, es crearà un complex proteïna-sonda. Aquest complex tindrà major mida que la sonda sola i per tant menor mobilitat electroforètica. Així, si quan revelem el gel veiem que al carril on hem carregat el resultat de la incubació la sonda ha migrat menys que en el carril amb sonda sola, podem deduir que s'ha format un complex i que per tant hi ha interacció entre els dos compostos.

En el nostre cas vam decidir assajar la capacitat d'interacció entre HMGS i l'ARN. Vam utilitzar com a sonda el minigen AdML transcrit amb ³²P-UTP per tal

de marcar-lo radioactivament. Aquest minigen era una seqüència de 90 nucleòtids que contenia un lloc acceptor d'*splicing*.

Vam fer el gel nadiu de poliacrilamida mesclant 4.5 ml de 30% poliacrilamida:bis-acrilamida (80:1), 1.25 ml TBE 10x (89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2 mM EDTA), 19.25 ml H₂O i 150 µl 10% APS. Vam afegir 30 µl de TEMED, vam introduir amb cura el líquid entre dos vidres i vam deixar polimeritzar, posant abans una pintura per generar els pous on posar la mostra.

Una vegada fet el gel vam passar a fer les incubacions. Vam preparar incubacions per assajar la unió de HMGS amb ARN. Com a control positiu vam utilitzar una proteïna amb gran afinitat per l'ARN com és U2AF65. A més, també vam preparar mostres sense proteïna per a detectar la mobilitat de la sonda lliure. Aquests assajos normalment es fan en presència de tARN bacterià sense marcatge radioactiu, de forma que competeix amb la sonda per unions inespecífiques a ARN. Com que nosaltres no volíem assajar especificitat sinó únicament capacitat d'unió, vam fer l'assaig en absència i en presència de t'ARN.

Cada incubació tenia un volum total de 9 µl on hi posàvem:

- 0.1 µl d'inhibidor d'ARNases RNAsin.
- 0.1 µl de 270 mM MgCl₂.
- 5.8 µl de tampó BD (20 mM HEPES pH 8, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 20% glicerol, 0.125% NP-40).
- 1 µl de 10000 cpm/µl ³²P-ARN.
- 1 µl d'H₂O o 1 µl 1 µg/µl tARN bacterià segons s'escaigui.
- 1 µl de proteïna o H₂O e el cas del control negatiu.

Es van incubar les mostres durant 20 minuts a 30 °C i es van carregar al gel. Les mostres tenien un elevat contingut de glicerol, així que no era necessari

posar tampó de càrrega, evitant també qualsevol efecte que pogués tenir sobre la interacció assajada. Per tal de seguir el front electroforètic amb blau de bromofenol sí posàvem una mica de tampó en un dels pous del gel que quedaven lliures. Vam realitzar l'electroforesi en tampó TBE 0.5x a 200 V durant 30 minuts i a 250 V durant 2 hores i mitja. Després es va desmuntar el sistema d'electroforesi, es va treure el gel i es va assecar durant una hora al buit a 50 °C. Finalment es va exposar una pantalla de PhosphorImager durant tota la nit i el resultat es va escanejar al dia següent.

12. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els valors obtinguts s'expressaven com la mitjana $\pm$ D.E.M. (desviació estàndard de la mitjana).

BIBLIOGRAFIA

- Andersen, J. S., et al. (2002), 'Directed proteomic analysis of the human nucleolus', *Curr Biol*, 12 (1), 1-11.
- Armstrong, C. G., et al. (1997), 'PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1', *FEBS Lett*, 418 (1-2), 210-4.
- Axelrod, D., et al. (1976), 'Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics', *Biophys J*, 16 (9), 1055-69.
- Baskaran, S., et al. (2010), 'Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (41), 17563-8.
- Baskaran, S., et al. (2011), 'Multiple glycogen binding sites in eukaryotic glycogen synthase are required for high catalytic efficiency toward glycogen', *J Biol Chem*.
- Belanger, A. E. and Hatfull, G. F. (1999), 'Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of *Mycobacterium smegmatis*', *J Bacteriol*, 181 (21), 6670-8.
- Bergmeyer, H. U. (1974), *Methods of Enzymatic Analysis / Methoden der enzymatischen Analyse* (New York: Academic Press).
- Berman, H. K., 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), 26421-5.
- Bollen, M. (2001), 'Combinatorial control of protein phosphatase-1', *Trends Biochem Sci*, 26 (7), 426-31.
- Bollen, M., Keppens, S., and Stalmans, W. (1998), 'Specific features of glycogen metabolism in the liver', *Biochem J*, 336 (Pt 1), 19-31.

- Bonafonte, M. A., et al. (2000), 'The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in salmonella enteritidis', *FEMS Microbiol Lett*, 191 (1), 31-6.
- Bouskila, M., et al. (2010), 'Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle', *Cell Metab*, 12 (5), 456-66.
- 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, 248-54.
- Brady, M. J., et al. (1997), 'Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity', *J Biol Chem*, 272 (32), 20198-204.
- Brown, A. M., Baltan Tekkok, S., and Ransom, B. R. (2004), 'Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen', *Neurochem Int*, 45 (4), 529-36.
- Browner, M. F., Fauman, E. B., and Fletterick, R. J. (1992), 'Tracking conformational states in allosteric transitions of phosphorylase', *Biochemistry*, 31 (46), 11297-304.
- Buschiazzo, A., et al. (2004), 'Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation', *EMBO J*, 23 (16), 3196-205.
- Campbell, J. A., et al. (1997), 'A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities', *Biochem J*, 326 (Pt 3), 929-39.
- Campbell, J. A., et al. (1998), 'A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities', *Biochem J*, 329 (Pt 3), 719.

- Cantarel, B. L., et al. (2009), 'The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics', *Nucleic Acids Res*, 37 (Database issue), D233-8.
- Cao, Y., et al. (1993), 'Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function', *J Biol Chem*, 268 (20), 14687-93.
- Cardell, R. R., Jr., et al. (1985), 'SERGE, the subcellular site of initial hepatic glycogen deposition in the rat: a radioautographic and cytochemical study', *J Cell Biol*, 101 (1), 201-6.
- Carling, D. and Hardie, D. G. (1989), 'The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase', *Biochim Biophys Acta*, 1012 (1), 81-6.
- Cartee, G. D., et al. (1991), 'Stimulation of glucose transport in skeletal muscle by hypoxia', *J Appl Physiol*, 70 (4), 1593-600.
- Cavanagh, J. B. (1999), 'Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases', *Brain Res Brain Res Rev*, 29 (2-3), 265-95.
- CCP4 (1994), 'The CCP4 suite: programs for protein crystallography', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50 (Pt 5), 760-3.
- Cid, E., et al. (2000), 'Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase', *J Biol Chem*, 275 (43), 33614-21.
- Cid, E., et al. (2005), 'Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase', *FEBS J*, 272 (12), 3197-213.
- Cohen, P. and Hardie, D. G. (1991), 'The actions of cyclic AMP on biosynthetic processes are mediated indirectly by cyclic AMP-dependent protein kinase', *Biochim Biophys Acta*, 1094 (3), 292-9.

- Cohen, P. T. (2002), 'Protein phosphatase 1--targeted in many directions', *J Cell Sci*, 115 (Pt 2), 241-56.
- Cross, D. A., et al. (1995), 'Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B', *Nature*, 378 (6559), 785-9.
- Chan, T. M. and Exton, J. H. (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.
- Cheng, A., et al. (2007), 'A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease', *Genes Dev*, 21 (19), 2399-409.
- Dela, F., et al. (1995), 'Insulin-stimulated muscle glucose clearance in patients with NIDDM. Effects of one-legged physical training', *Diabetes*, 44 (9), 1010-20.
- Dent, P., et al. (1990), 'The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle', *Nature*, 348 (6299), 302-8.
- Doherty, M. J., et al. (1995), 'Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding (GL)-subunit of protein phosphatase-1', *FEBS Lett*, 375 (3), 294-8.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004), 'Coot: model-building tools for molecular graphics', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60 (Pt 12 Pt 1), 2126-32.
- Eydallin, G., et al. (2007), 'Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in Escherichia coli K-12', *FEBS Lett*, 581 (16), 2947-53.
- Fernandez-Novell, J. M., et al. (1997), 'Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes', *Biochem J*, 321 (Pt 1), 227-31.

- Ferrer, J. C., Baque, S., and Guinovart, J. J. (1997), 'Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose', *FEBS Lett*, 415 (3), 249-52.
- Ferrer, J. C., et al. (2003), 'Control of glycogen deposition', *FEBS Lett*, 546 (1), 127-32.
- Flotow, H. and Roach, P. J. (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), 9126-8.
- Fox, A. H. and Lamond, A. I. (2010), 'Paraspeckles', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2 (7), a000687.
- Fukuda, T., et al. (2006), 'Autophagy and lysosomes in Pompe disease', *Autophagy*, 2 (4), 318-20.
- Garcia-Rocha, M., et al. (2001), 'Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes', *Biochem J*, 357 (Pt 1), 17-24.
- Gershoni, J. M. and Palade, G. E. (1983), 'Protein blotting: principles and applications', *Anal Biochem*, 131 (1), 1-15.
- Gloeckner, C. J., et al. (2007), 'A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes', *Proteomics*, 7 (23), 4228-34.
- Gomis, R. R., et al. (2002), 'Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase', *J Biol Chem*, 277 (26), 23246-52.
- Graham, F. L., et al. (1977), 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *J Gen Virol*, 36 (1), 59-74.

- Granzow, C., Kopun, M., and Zimmermann, H. P. (1981), 'Role of nuclear glycogen synthase and cytoplasmic UDP glucose pyrophosphorylase in the biosynthesis of nuclear glycogen in HD33 Ehrlich-Lettre ascites tumor cells', *J Cell Biol*, 89 (3), 475-84.
- Green, A. R., et al. (2004), 'The glycogenic action of protein targeting to glycogen in hepatocytes involves multiple mechanisms including phosphorylase inactivation and glycogen synthase translocation', *J Biol Chem*, 279 (45), 46474-82.
- Guillen, D., Sanchez, S., and Rodriguez-Sanoja, R. (2010), 'Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles', *Appl Microbiol Biotechnol*, 85 (5), 1241-9.
- Hallier, M., et al. (1998), 'The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS', *J Biol Chem*, 273 (9), 4838-42.
- Horcajada, C., et al. (2006), 'Crystal structure of an archaeal glycogen synthase: insights into oligomerization and substrate binding of eukaryotic glycogen synthases', *J Biol Chem*, 281 (5), 2923-31.
- Hubbard, M. J. and Cohen, P. (1989a), 'Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates', *Eur J Biochem*, 186 (3), 711-6.
- Hubbard, M. J. and Cohen, P. (1989b), 'Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 1. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase at site 2 releases catalytic subunit from the glycogen-bound holoenzyme', *Eur J Biochem*, 186 (3), 701-9.
- Hubbard, M. J. and Cohen, P. (1993), 'On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation', *Trends Biochem Sci*, 18 (5), 172-7.

- Jiang, S., Wells, C. D., and Roach, P. J. (2011), 'Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1', *Biochem Biophys Res Commun.*
- Jiang, S., et al. (2010), 'Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism', *J Biol Chem*, 285 (45), 34960-71.
- Johnson, L. N., et al. (1988), 'Protein-oligosaccharide interactions: lysozyme, phosphorylase, amylases', *Curr Top Microbiol Immunol*, 139, 81-134.
- Journey, L. J. and Goldstein, M. N. (1961), 'Electron microscope studies on HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D', *Cancer Res*, 21, 929-32.
- Kiel, J. A., et al. (1994), 'Glycogen in *Bacillus subtilis*: molecular characterization of an operon encoding enzymes involved in glycogen biosynthesis and degradation', *Mol Microbiol*, 11 (1), 203-18.
- Kuroda, M., et al. (2000), 'Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice', *EMBO J*, 19 (3), 453-62.
- Laemmli, U. K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227 (5259), 680-5.
- Larner, J., Takeda, Y., and Hizukuri, S. (1976), 'The influence of chain size and molecular weight on the kinetic constants for the span glucose to polysaccharide for rabbit muscle glycogen synthase', *Mol Cell Biochem*, 12 (3), 131-6.
- Laskowski, R. A. and W., MacArthur M. (1993), 'PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.', *J Appl Crystallogr*, (26), 283-91.

- Lawrence, J. C., Jr. and Roach, P. J. (1997), 'New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin', *Diabetes*, 46 (4), 541-7.
- Leloir, L. F., et al. (1959), 'Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose', *Arch Biochem Biophys*, 81 (2), 508-20.
- Liang, S. and Lutz, C. S. (2006), 'p54nrb is a component of the snRNP-free U1A (SF-A) complex that promotes pre-mRNA cleavage during polyadenylation', *RNA*, 12 (1), 111-21.
- Lillie, S. H. and Pringle, J. R. (1980), 'Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation', *J Bacteriol*, 143 (3), 1384-94.
- Lund, S., et al. (1995), 'Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (13), 5817-21.
- Martin, M. C., et al. (1997), 'A glgC gene essential only for the first of two spatially distinct phases of glycogen synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *J Bacteriol*, 179 (24), 7784-9.
- Mathews, Cristopher K. and Van Holde, K. E. (1990), *Biochemistry* (xixx: Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings Pub. Co.).
- Mathur, M., Tucker, P. W., and Samuels, H. H. (2001), 'PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors', *Mol Cell Biol*, 21 (7), 2298-311.
- McBride, A., et al. (2009), 'The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor', *Cell Metab*, 9 (1), 23-34.

- Melendez, R., et al. (1998), 'Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach', *Biophys J*, 75 (1), 106-14.
- Mueckler, M., et al. (1985), 'Sequence and structure of a human glucose transporter', *Science*, 229 (4717), 941-5.
- Munro, S., 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), 1478-89.
- Newgard, C. B., Hwang, P. K., and Fletterick, R. J. (1989), 'The family of glycogen phosphorylases: structure and function', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 24 (1), 69-99.
- Nimmo, H. G., Proud, C. G., and Cohen, P. (1976), 'The purification and properties of rabbit skeletal muscle glycogen synthase', *Eur J Biochem*, 68 (1), 21-30.
- Orho, M., et al. (1995), 'Isolation and characterization of the human muscle glycogen synthase gene', *Diabetes*, 44 (9), 1099-105.
- Ozen, H. (2007), 'Glycogen storage diseases: new perspectives', *World J Gastroenterol*, 13 (18), 2541-53.
- Parker, G. J., et al. (2007), 'AMP-activated protein kinase does not associate with glycogen alpha-particles from rat liver', *Biochem Biophys Res Commun*, 362 (4), 811-5.
- Patton, J. G., et al. (1993), 'Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor', *Genes Dev*, 7 (3), 393-406.
- Pautsch, A., et al. (2008), 'Molecular recognition of the protein phosphatase 1 glycogen targeting subunit by glycogen phosphorylase', *J Biol Chem*, 283 (14), 8913-8.

- Pederson, B. A., 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), 27753-61.
- Pescador, N., et al. (2010), 'Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1', *PLoS One*, 5 (3), e9644.
- Pessin, J. E., et al. (1999), 'Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!', *J Biol Chem*, 274 (5), 2593-6.
- Phair, R. D., Gorski, S. A., and Misteli, T. (2004), 'Measurement of dynamic protein binding to chromatin in vivo, using photobleaching microscopy', *Methods Enzymol*, 375, 393-414.
- Pinotsis, N., et al. (2003), 'The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies', *Protein Sci*, 12 (9), 1914-24.
- Powers, C. A., et al. (1998), 'TLS (translocated-in-liposarcoma) is a high-affinity interactor for steroid, thyroid hormone, and retinoid receptors', *Mol Endocrinol*, 12 (1), 4-18.
- Printen, J. A., Brady, M. J., and Saltiel, A. R. (1997), 'PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism', *Science*, 275 (5305), 1475-8.
- Prober, J. M., et al. (1987), 'A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides', *Science*, 238 (4825), 336-41.
- Reynolds, R. C., Montgomery, P. O., and Hughes, B. (1964), 'Nucleolar "Caps" Produced by Actinomycin D', *Cancer Res*, 24, 1269-77.
- Roach, P. J. (1990), 'Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation', *FASEB J*, 4 (12), 2961-8.

- Roach, P. J., Takeda, Y., and Larner, J. (1976), 'Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. I. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties', *J Biol Chem*, 251 (7), 1913-9.
- Roach, P. J., DePaoli-Roach, A. A., and Larner, J. (1978), 'Ca²⁺-stimulated phosphorylation of muscle glycogen synthase by phosphorylase b kinase', *J Cyclic Nucleotide Res*, 4 (4), 245-57.
- Rosonina, E., et al. (2005), 'Role for PSF in mediating transcriptional activator-dependent stimulation of pre-mRNA processing in vivo', *Mol Cell Biol*, 25 (15), 6734-46.
- Rybicka, K. K. (1996), 'Glycosomes--the organelles of glycogen metabolism', *Tissue Cell*, 28 (3), 253-65.
- Saiki, R. K., et al. (1988), 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239 (4839), 487-91.
- Salavert, A., et al. (1979), 'Multiple phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-1. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties', *FEBS Lett*, 106 (2), 279-83.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975), 'A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase', *J Mol Biol*, 94 (3), 441-8.
- Scheepers, A., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2004), 'The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function', *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 28 (5), 364-71.
- Shav-Tal, Y. and Zipori, D. (2002), 'PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins', *FEBS Lett*, 531 (2), 109-14.

- Shav-Tal, Y., et al. (2001), 'Nuclear relocalization of the pre-mRNA splicing factor PSF during apoptosis involves hyperphosphorylation, masking of antigenic epitopes, and changes in protein interactions', *Mol Biol Cell*, 12 (8), 2328-40.
- Shav-Tal, Y., et al. (2005), 'Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition', *Mol Biol Cell*, 16 (5), 2395-413.
- Shearer, J. and Graham, T. E. (2004), 'Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise', *Exerc Sport Sci Rev*, 32 (3), 120-6.
- Sheng, F., et al. (2009a), 'Oligosaccharide binding in Escherichia coli glycogen synthase', *Biochemistry*, 48 (42), 10089-97.
- Sheng, F., et al. (2009b), 'The crystal structures of the open and catalytically competent closed conformation of Escherichia coli glycogen synthase', *J Biol Chem*, 284 (26), 17796-807.
- Sillje, H. H., et al. (1999), 'Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*', *J Bacteriol*, 181 (2), 396-400.
- 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 (41), 25534-42.
- Skurat, A. V., Dietrich, A. D., and Roach, P. J. (2000), 'Glycogen synthase sensitivity to insulin and glucose-6-phosphate is mediated by both NH₂- and COOH-terminal phosphorylation sites', *Diabetes*, 49 (7), 1096-100.
- Skurat, A. V., Dietrich, A. D., and Roach, P. J. (2006), 'Interaction between glycogenin and glycogen synthase', *Arch Biochem Biophys*, 456 (1), 93-7.

- Spatafora, G., et al. (1995), 'A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo', *Infect Immun*, 63 (7), 2556-63.
- Sprague, B. L. and McNally, J. G. (2005), 'FRAP analysis of binding: proper and fitting', *Trends Cell Biol*, 15 (2), 84-91.
- Stalmans, W. (1976), 'The role of the liver in the homeostasis of blood glucose', *Curr Top Cell Regul*, 11, 51-97.
- Stapleton, D., et al. (2010), 'Analysis of hepatic glycogen-associated proteins', *Proteomics*, 10 (12), 2320-9.
- Strange, R. E. (1968), 'Bacterial "glycogen" and survival', *Nature*, 220 (5167), 606-7.
- Tagliabracci, V. S., et al. (2011), 'Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease', *Cell Metab*, 13 (3), 274-82.
- Takeda, Y., Brewer, H. B., Jr., and Lerner, J. (1975), 'Structural studies on rabbit muscle glycogen synthase. I. Subunit composition', *J Biol Chem*, 250 (23), 8943-50.
- Takeuchi, T., Iwamasa, T., and Miyayama, H. (1978), 'Ultrafine structure of glycogen macromolecules in mammalian tissues', *J Electron Microsc (Tokyo)*, 27 (1), 31-8.
- Tang, P. M., et al. (1991), 'Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase', *J Biol Chem*, 266 (24), 15782-9.
- Thevenaz, P., Ruttimann, U. E., and Unser, M. (1998), 'A pyramid approach to subpixel registration based on intensity', *IEEE Trans Image Process*, 7 (1), 27-41.

- 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 (1), 486-99.
- Thorens, B. and Mueckler, M. (2010), 'Glucose transporters in the 21st Century', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298 (2), E141-5.
- Thorens, B., et al. (1990), 'Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (17), 6492-6.
- Toole, B. J. and Cohen, P. T. (2007), 'The skeletal muscle-specific glycogen-targeted protein phosphatase 1 plays a major role in the regulation of glycogen metabolism by adrenaline in vivo', *Cell Signal*, 19 (5), 1044-55.
- Toyoda, Y., et al. (1994), 'Evidence for glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes', *Biochem Biophys Res Commun*, 204 (1), 252-6.
- Uranishi, H., et al. (2001), 'Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator', *J Biol Chem*, 276 (16), 13395-401.
- Valles-Ortega, J., et al. (2011), 'Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease', *EMBO Mol Med*.
- van de Werve, G. and Jeanrenaud, B. (1987), 'Liver glycogen metabolism: an overview', *Diabetes Metab Rev*, 3 (1), 47-78.
- Van Schaftingen, E. (1989), 'A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate', *Eur J Biochem*, 179 (1), 179-84.

- Van Schaftingen, E., Detheux, M., and Veiga da Cunha, M. (1994), 'Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein', *FASEB J*, 8 (6), 414-9.
- Vestergaard, H., et al. (1994), 'Pre- and posttranslational upregulation of muscle-specific glycogen synthase in athletes', *Am J Physiol*, 266 (1 Pt 1), E92-101.
- Vilchez, D., et al. (2007), 'Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy', *Nat Neurosci*, 10 (11), 1407-13.
- Villar-Palasi, C. (1991), 'Substrate specific activation by glucose 6-phosphate of the dephosphorylation of muscle glycogen synthase', *Biochim Biophys Acta*, 1095 (3), 261-7.
- Villar-Palasi, C. and Guinovart, J. J. (1997), 'The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase', *FASEB J*, 11 (7), 544-58.
- Wang, J., et al. (2002), 'A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen', *J Biol Chem*, 277 (4), 2377-80.
- Wilson, W. A., et al. (2005), 'Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (46), 16596-601.
- Worby, C. A., Gentry, M. S., and Dixon, J. E. (2008), 'Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG)', *J Biol Chem*, 283 (7), 4069-76.
- Wu, S. and Green, M. R. (1997), 'Identification of a human protein that recognizes the 3' splice site during the second step of pre-mRNA splicing', *EMBO J*, 16 (14), 4421-32.
- Yang, L., et al. (1998), 'Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing', *J Biol Chem*, 273 (43), 27761-4.

- Zibrova, D., et al. (2008), 'Inhibition of the interaction between protein phosphatase 1 glycogen-targeting subunit and glycogen phosphorylase increases glycogen synthesis in primary rat hepatocytes', *Biochem J*, 412 (2), 359-66.
- Zimmermann, H. P., Granzow, V., and Granzow, C. (1976), 'Nuclear glycogen synthesis in Ehrlich ascites cells', *J Ultrastruct Res*, 54 (1), 115-23.
- Zinszner, H., Albalat, R., and Ron, D. (1994), 'A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP', *Genes Dev*, 8 (21), 2513-26.
- Zinszner, H., et al. (1997a), 'A topogenic role for the oncogenic N-terminus of TLS: nucleolar localization when transcription is inhibited', *Oncogene*, 14 (4), 451-61.
- Zinszner, H., et al. (1997b), 'TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling', *J Cell Sci*, 110 (Pt 15), 1741-50.