

Impacte Metabòlic de l'Activació de la Glicogen Sintasa Hepàtica

Susana Ros Domínguez

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.tesisenxarxa.net) 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.tesisenred.net) 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.tesisenxarxa.net) 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.

Impacte metabòlic de l'activació de la glicogen sintasa hepàtica

SUSANA ROS DOMÍNGUEZ
Barcelona, Juny del 2009

RESULTATS I DISCUSSIÓ: CAPÍTOL 1

PAPER DE LA FOSFORILACIÓ EN L'ACTIVITAT I DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR DE LA GLICOGEN SINTASA HEPÀTICA

1.1 Introducció

La GS, l'enzim limitant en la síntesi de glicogen, està altament regulada per fosforilació en múltiples residus, el que comporta la seva inactivació.

Com s'ha comentat prèviament en la introducció, l'activitat de la MGS està controlada per nou residus serina, en canvi el nombre de residus serina que controlarien l'activitat de la LGS serien només set (*Fig.1*), si es comparen les seqüències de les dues isoformes de la GS, doncs la LGS no conté els llocs de fosforilació 1a i 1b degut a que l'extrem carboxil és més llarg en la MGS (Hanashiro and Roach 2002).

La importància relativa dels llocs de fosforilació en la MGS en termes d'activitat enzimàtica, acumulació de glicogen i distribució subcel·lular, ha estat objectiu de nombrosos estudis (Skurat, Wang et al. 1994; Skurat and Roach 1995; Skurat and Roach 1996; Cid, Cifuentes et al. 2005; Wilson, Skurat et al. 2005), no essent així per a la LGS.

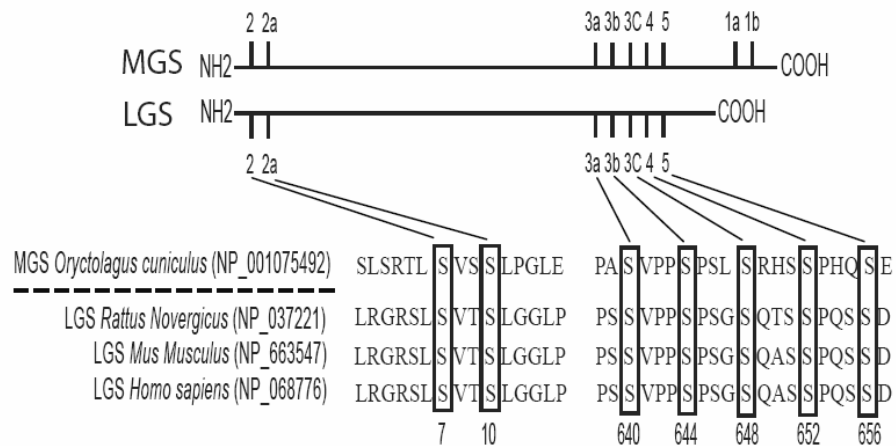


Fig.1 Comparació esquemàtica dels centres de fosforilació de les isoformes muscular i hepàtica de la glicogen sintasa de mamífer. Les línies verticals representen la localització relativa dels llocs de fosforilació, en les seqüències de la GS muscular (MGS) i l'hepàtica (LGS) indicades per una línia horitzontal. Només set de les nou serines presents en la seqüència de la MGS són presents en la seqüència de la LGS. L'alineament específic per a les seqüències de la GS de múscul de conill (*Oryctolagus cuniculus*), la GS hepàtica de rata (*Rattus Norvegicus*), ratolí (*Mus musculus*) i humana (*Homo sapiens*) mostra que aquestes set serines es troben conservades en aquestes espècies; entre parèntesi es mostra el número d'accés del NCBI. La seqüència de la LGS és més curta i no conté els llocs de fosforilació 1a i 1b.

Els residus de serina de la MGS poden ésser fosforilats *in vitro* per múltiples quinases (**Fig.2**). El lloc 2 és fosforilat per la PKA (Huang and Krebs 1977; Proud, Rylatt et al. 1977; Embi, Parker et al. 1981; Cohen and Hardie 1991), tot i que també es proposen la AMPK (Carling and Hardie 1989) i la PhK (Roach, DePaoli-Roach et al. 1978; Embi, Rylatt et al. 1979). El lloc 2a és fosforilat per la CK-I, que necessita d'una fosforilació prèvia ja que reconeix motius del tipus S(P)-X-X-S. De fet, la mutació de la serina del lloc 2 per alanina provoca la pèrdua de la fosforilació tant del mateix lloc 2 com el del 2a, reforçant aquesta hipòtesi (Skurat, Wang et al. 1994). Els llocs 3a i 3b sembla que són principalment fosforilats per la GSK-3, tot i que d'altres quinases també els podrien fosforilar (Skurat and Roach 1995; Skurat and Roach 1996; Wilson, Skurat et al. 2005). La fosforilació per part de la GSK3 d'aquests residus, implicaria una fosforilació prèvia per part de la CK-II en el lloc 5, aquest fosfat seria necessari per a que la GSK-3 es

posicioni a la part C-terminal i comenci a fosforilar seqüencialment les altres quatre serines adjacents, 4, 3c, 3b, i finalment 3a (Picton, Aitken et al. 1982; Roach 1986; Fiol, Mahrenholz et al. 1987; Roach 1990; Zhang, DePaoli-Roach et al. 1993). La fosforilació dels llocs 1a i 1b, es produeix per l'acció de la PKA principalment, i es desconeix quina pot ésser la funció específica d'aquests llocs que només estan presents en la MGS (Huang and Krebs 1977; Proud, Rylatt et al. 1977; Embi, Parker et al. 1981; Skurat, Wang et al. 1994). Els estudis sobre la importància dels nou llocs de fosforilació comentats en l'activitat de la MGS demostren que cap mutació d'un sol residu, substitució d'un residu de serina per alanina, produeix un increment substancial en l'activitat enzimàtica. Només les mutacions combinades en els llocs 2 i 3a o 2 i 3b produeixen un increment significatiu en l'activitat de la MGS en cèl·lules COS (Skurat, Wang et al. 1994).

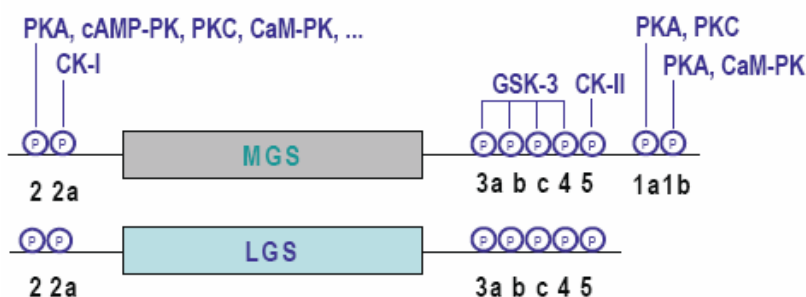


Fig.2 Comparació esquemàtica de la seqüència de les isoformes de GS muscular i hepàtica i descripció de les quinases implicades en la fosforilació de la MGS. S'indiquen els llocs on la MGS es fosforila i les quinases responsables.

Tanmateix, la LGS també pot ésser fosforilada en múltiples llocs per efectes d'agents glucogenolítics com l'adrenalina, el glucagó i els esters de forbol (Arino, Mor et al. 1984; Arino and Guinovart 1986), i pot ésser fosforilada *in vitro* per múltiples quinases, incloent la PKA, la PhK, la PKC, la CK-II, la GSK-3 i la AMPK (Roach 1986; Roach 1990). De fet, però només es coneix una forma mutant de la LGS en la que sis de les set serines homòlogues a les presents en MGS han estat substituïdes per alanines (llocs 2, 3a,

3b, 3c, 4, 5) (Kadotani, Fujimura et al. 2007). Aquest mutant és constitutivament actiu i la seva sobreexpressió provoca un augment en l'acumulació de glicogen en cultius primaris d'hepatòcits de rata. No obstant, manca l'estudi del control que exerceix cadascun d'aquests residus en l'activitat de la LGS.

A més, les dos isoformes de GS canvien la seva distribució subcel·lular en resposta a un increment en la concentració de glucosa, el que és un mecanisme addicional de control de l'enzim. Sembla que la fosforilació no juga un paper rellevant en la translocació de la MGS des del nucli al citoplasma en resposta a glucosa (Ferrer, Baque et al. 1997; Cid, Cifuentes et al. 2005). Aquesta distribució depèn però d'un clúster d'arginines involucrat en l'activació al·lostèrica de l'enzim (Cid, Cifuentes et al. 2005). Tanmateix, el mecanisme molecular que controla la distribució subcel·lular de la LGS es desconeix. La LGS presenta una diferent distribució subcel·lular de la MGS, es troba difusa en el citoplasma en absència de glucosa, i es concentra en el còrtex cel·lular en presència d'aquesta, essent aquí on s'inicia la síntesi de glicogen en cultius primaris d'hepatòcits de rata (Fernandez-Novell, Bellido et al. 1997; Garcia-Rocha, Roca et al. 2001; Fernandez-Novell, Lopez-Iglesias et al. 2002). Estudis previs del nostre laboratori demostren que l'activació covalent de l'enzim no és capaç de promoure el canvis en la seva localització, doncs la incubació de cultius primaris d'hepatòcits amb LiCl, un inhibidor de la GSK-3, no condueix a l'acumulació de la LGS a la perifèria cel·lular (Garcia-Rocha, Roca et al. 2001). De tota manera, manquen d'altres estudis involucrant els altres residus de fosforilació, que en principi no són diana de la quinasa GSK-3, per descartar que el control de la localització intracel·lular de l'enzim no està regulat per fosforilació.

Així doncs, el primer capítol d'aquesta tesi es centra en l'estudi de la importància relativa de cadascun dels set llocs de fosforilació de la LGS en la regulació de la seva activitat i per tant en la síntesi de glicogen. A part, també s'estudia com la mutació d'aquests llocs pot afectar a la localització subcel·lular de l'enzim. L'aproximació experimental ha estat la generació d'adenovirus per tal de sobreexpressar les diferents proteïnes d'interès en hepatòcits en cultiu i línies cel·lulars hepàtiques. Les característiques biològiques que presenten els adenovirus els fan molt útils com a sistema de transferència gènica en

hepatòcits en cultiu i línies cel·lulars hepàtiques (Berkner 1992; Graham and Prevec 1995). L'eficiència de transfecció és superior a un 95% en les nostres condicions de treball, la qual cosa permet assolir uns nivells de sobreexpressió idonis per a la realització d'estudis d'impacte metabòlic de la proteïna d'interès.

1.2 Estudi del paper dels residus de fosforilació en l'activitat glicogen sintasa hepàtica

Per tal d'identificar quins llocs de fosforilació són clau en la regulació de l'activitat de l'enzim es van generar set adenovirus que contenen la LGS de rata mutada en cadascun dels set residus serina homòlegs als presents en la seqüència de la MGS (**Fig.1**). Les serines van ésser substituïdes per alanines per tal d'impedir-ne la fosforilació. Les serines mutades varen ésser Ser 7 (lloc 2), Ser 10 (lloc 2a), Ser 640 (lloc 3a), Ser 644 (lloc 3b), Ser 648 (lloc 3c), Ser 652 (lloc 4), Ser 656 (lloc 5), i els mutants corresponents van ésser designats com a LGS 2, LGS 2a, LGS 3a, LGS 3b, LGS 3c, LGS 4 i LGS 5 respectivament. A part, també es van generar 6 adenovirus que contenen la LGS amb mutacions combinades de la Ser 7 (lloc 2) i la Ser 10 (lloc 2a), mutant designat com a LGS 2+2a, i mutacions combinades de la Ser 7 (lloc 2) i una mutació en un residu de l'extrem C-terminal Ser 640 (lloc 3a), o Ser 644 (lloc 3b), o Ser 648 (lloc 3c), o Ser 652 (lloc 4), o Ser 656 (lloc 5), mutants designats com a LGS 2+3a, LGS 2+3b, LGS 2+3c, LGS 2+4, LGS 2+5 respectivament.

Els diferents adenovirus que codificaven pels mutants descrits es varen fer servir per a infectar cultius primaris d'hepatòcits de rata. A part, també es varen usar els adenovirus que codifiquen per la β galactosidasa d'*E. Coli* (Bgal) i per la glicogen sintasa hepàtica salvatge o *wild-type* de rata (LGS WT) (Gomis, Ferrer et al. 2000) com a control en els diferents experiments realitzats.

La presència de glucosa en el medi de cultiu dels hepatòcits produeix l'activació de la LGS (Fernandez-Novell, Lopez-Iglesias et al. 2002). Degut a que un dels paràmetres a analitzar era si la defosforilació és capaç de produir canvis en l'activitat enzimàtica, els hepatòcits que sobreexpressaven els diferents mutants de la LGS, la LGS WT o la Bgal varen ésser incubats amb medi sense glucosa durant les últimes 12 hores de l'experiment, així doncs es prevenia la defosforilació de la resta de serines no modificades.

Primer, es va comprovar que estàvem sobreexpressant nivells similars de LGS. Per això es va calcular l'activitat GS total, és a dir l'activitat enzimàtica mesurada en presència de l'activador al·lostèric Glc6P, dels homogenats d'hepatòcits que sobreexpressaven les diferents LGS modificades en els residus de fosforilació i la LGS WT. L'activitat GS calculada en presència de l'activador al·lostèric permet mesurar totes les formes de LGS, per tant permet estimar la quantitat total de LGS present en un extracte. Els resultats mostren que estàvem sobreexpressant nivells similars de les diferents formes de la LGS, doncs no es trobaven diferències significatives en l'activitat GS total dels diferents extractes (**Fig.3A**). En canvi, els hepatòcits que només contenien la LGS endògena, doncs sobreexpressaven la Bgal, presentaven uns nivells d'activitat GS total significativament menors respecte als valors dels altres extractes. Per tant, l'activitat GS total que provenia de la LGS endògena en els extractes que sobreexpressaven la LGS WT o les LGS mutades en els diferents llocs de fosforilació era en principi pràcticament negligible.

Per tal de mesurar els canvis en l'activació de l'enzim degut a la mutació dels diferents llocs de fosforilació es va calcular la relació entre l'activitat GS mesurada en absència i en presència de l'activador al·lostèric Glc6P mesurada en sobrenedants i pellet per centrifugació de les mostres dels hepatòcits que sobreexpressaven els diferents constructes a 13.000 xg durant 15 minuts. Els resultats mostren que les mutacions dels llocs 2a, 3c, 4 i 5 no produïen cap canvi en l'estat d'activació de l'enzim (**Fig.3B**), les mutacions en els llocs 3a i 3b produïen un increment moderat de la relació d'activitats, mentre que la mutació del lloc 2 produïa un gran augment d'aquesta relació tant en el sobrenedant com pellet. Com s'ha comentat anteriorment, l'activitat GS total de la LGS endògena era pràcticament negligible pel que no es va realitzar cap correcció en el càlcul

de la relació d'activitats dels extractes que sobreexpressaven la LGS WT o les LGS mutades en els diferents llocs de fosforilació. Tanmateix, no es va calcular la relació d'activitats dels hepatòcits que sobreexpressaven la Bgal, degut a que els nivells d'activitat GS total entre aquest i la dels hepatòcits que sobreexpressaven els diferents mutants de LGS i els que sobreexpressaven la LGS WT no eren semblants.

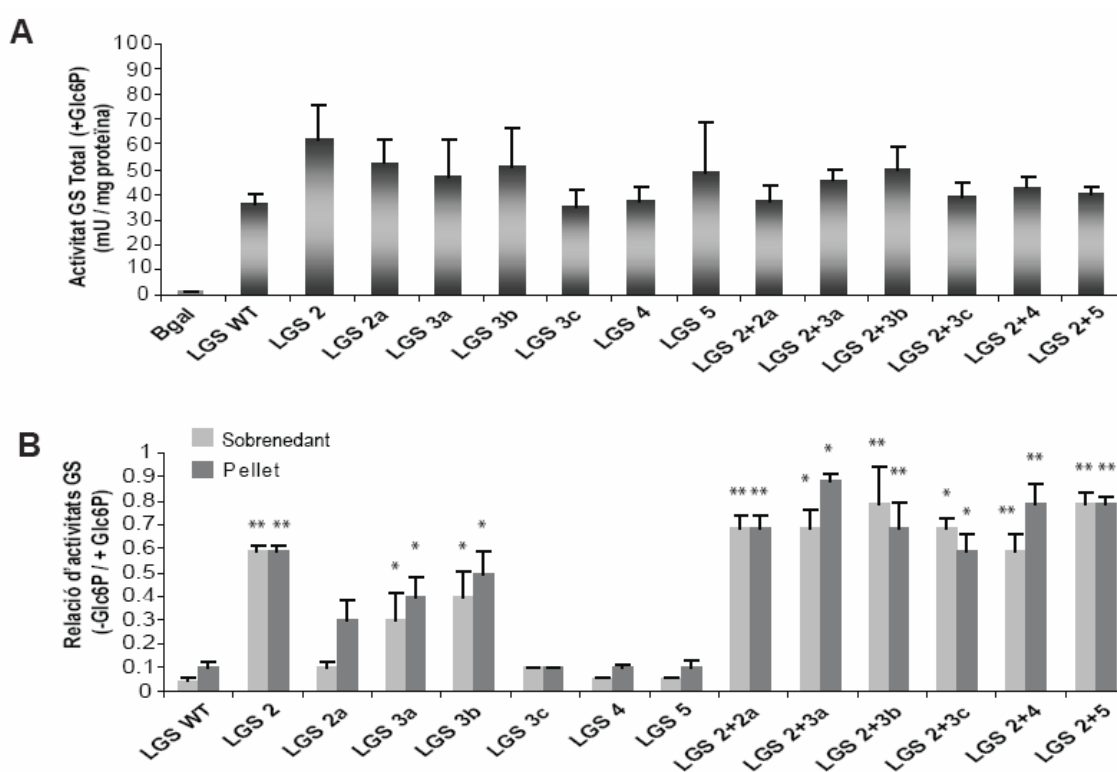


Fig.3 Efectes de la mutació dels llocs de fosforilació en l'activitat de la LGS. **A)** Activitat GS total dels homogenats d'hepatòcits, incubats en absència de glucosa durant 12 hores, que sobreexpressaven les LGS modificades en un sol residu de fosforilació, Ser per Ala (LGS 2; LGS 2a; LGS 3a; LGS 3b; LGS 3c; LGS 4; LGS 5), mutants de LGS en dos llocs de fosforilació (LGS 2+2a; LGS 2+3a; LGS 2+3b; LGS 2+3c; LGS 2+4; LGS 2+5), la glicogen sintasa WT (LGS WT) o la β galactosidasa d'E. Coli (Bgal). L'activitat està expressada en mU per mg de proteïna. Els valors representen la mitjana \pm S.E.M., de quatre a sis experiments independents. Els símbols indiquen diferències significatives amb $*p < 0.05$ o $**p < 0.001$ per comparacions amb els extractes d'hepatòcits que sobreexpressaven LGS WT. **B)** Relació d'activitats GS en absència i presència de l'activador al·lostèric Glc6P en el sobrenedant (barres gris clar) o pellet (barres gris fosc) d'aquests extractes.

A continuació, es va estudiar si l'activació induïda per la mutació del lloc 2 podia ésser incrementada encara més mitjançant una mutació addicional en un segon lloc de fosforilació. Primer, al comprovar que l'activitat GS total era semblant en els extractes d'hepatòcits que sobreexpressaven aquest mutants combinats respecte als extractes anteriorment analitzats (**Fig.3A**), es va fer el càlcul de les relacions d'activitats GS en presència i en absència de Glc6P dels extractes d'hepatòcits que sobreexpressaven les LGS modificades en dos residus de fosforilació, que no presentaven diferències significatives amb la dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS 2 (**Fig.3B**).

1.3 Estudi del paper dels residus de fosforilació en la síntesi de glicogen en la línia cel·lular d'hepatoma de rata FTO2B

Entre totes les línies cel·lulars d'hepatoma, les cèl·lules FTO2B són les que presenten un fenotip més similar al dels hepatòcits (Zvibel, Fiorino et al. 1998). Particularment, aquestes cèl·lules expressen la LGS, tot i que aquesta es troba altament fosforilada i per tant inactiva. En canvi, no expressen el principal enzim fosforilador de glucosa en fetge, la GK, encara que si expressen l'HK-I. Així doncs, quan aquestes cèl·lules s'incuben amb altes concentracions de glucosa no són capaces d'acumular glicogen, degut a que els nivells de Glc6P produïts per l'HK-I no són suficients per a activar la LGS endògena. En canvi, si es sobreexpressa la GK es restaura la incapacitat de síntesi de glicogen (Valera and Bosch 1994; Gomis, Cid et al. 2002). Per tant, aquest tipus cel·lular resulta idoni per establir si els diferents mutants dels llocs de fosforilació podrien restaurar la síntesi de glicogen en presència de glucosa.

Les cèl·lules FTO2B van ésser doncs infectades amb els diferents adenovirus, i després de 48 hores en les que es va deixar que les cèl·lules expressessin les diferents proteïnes d'interès, es van incubar en medi que contenia glucosa 25mM durant sis hores més. Primer, es va confirmar que estàvem sobreexpressant nivells similars de l'enzim mitjançant el càlcul d'activitat GS total en els homogenats cel·lulars (**Fig. 4A**). Els

resultats mostraven que no hi havia cap diferència significativa entre les cèl·lules que sobreexpressaven les LGS modificades en els llocs de fosforilació o les que sobreexpressaven la LGS WT. Lògicament sí es trobaven si es comparaven aquests valors amb el dels hepatòcits que sobreexpressaven la Bgal.

Després es va calcular la relació d'activitats en absència i en presència de Glc6P dels homogenats d'aquestes cèl·lules FTO2B. Les cèl·lules que sobreexpressaven la LGS 2, o les que sobreexpressaven els mutants pel lloc 2 més i una segona modificació en un altre dels sis llocs de fosforilació restants, presentaven valors de relació d'activitats GS pràcticament equivalents a una activació completa (**Fig. 4B**). Tal i com passava en els experiments realitzats en cultiu d'hepatòcits de rata (**Punt 1.2**), no es trobava cap diferència significativa entre els extractes de cèl·lules que sobreexpressaven el mutant del lloc 2 i els de les cèl·lules que sobreexpressaven els mutants per a aquest residu i un altre lloc de fosforilació. Cal remarcar que en aquest cas, l'activitat GS total dels extractes de cèl·lules que sobreexpressaven la Bgal representa d'un terç a un cinquè de l'activitat GS total de les cèl·lules que sobreexpressen els diferents mutants de LGS o la LGS WT, així doncs el càlcul de la relació d'activitats GS està subestimat (**Fig. 4A**). Si assumim que aquesta relació d'activitats en el cas de l'enzim endogen, és a dir del de les cèl·lules que sobreexpressaven la Bgal, és de 0,1 i que aquest no varia si es sobreexpressa la LGS WT o les altres formes de LGS, la relació d'activitats GS corregida per les cèl·lules que sobreexpressaven el mutant de LGS del lloc 2 seria aproximadament de 0,6.

La relació d'activitats GS es correlacionava amb la capacitat dels diferents mutants de la LGS d'induir l'acumulació de glicogen en aquestes cèl·lules. De fet, les cèl·lules que sobreexpressaven la LGS WT o els mutants LGS 3a, LGS 3b o LGS 3c no eren capaces d'acumular glicogen, tal i com ocorria per les cèl·lules control que sobreexpressaven la Bgal (**Fig. 4C**). Tanmateix, les cèl·lules que sobreexpressaven el mutant del lloc 2, o els mutants combinats de la LGS, eren capaces d'acumular grans nivells de glicogen, de fet no es trobava cap diferència significativa entre els diferents extractes d'aquestes cèl·lules.

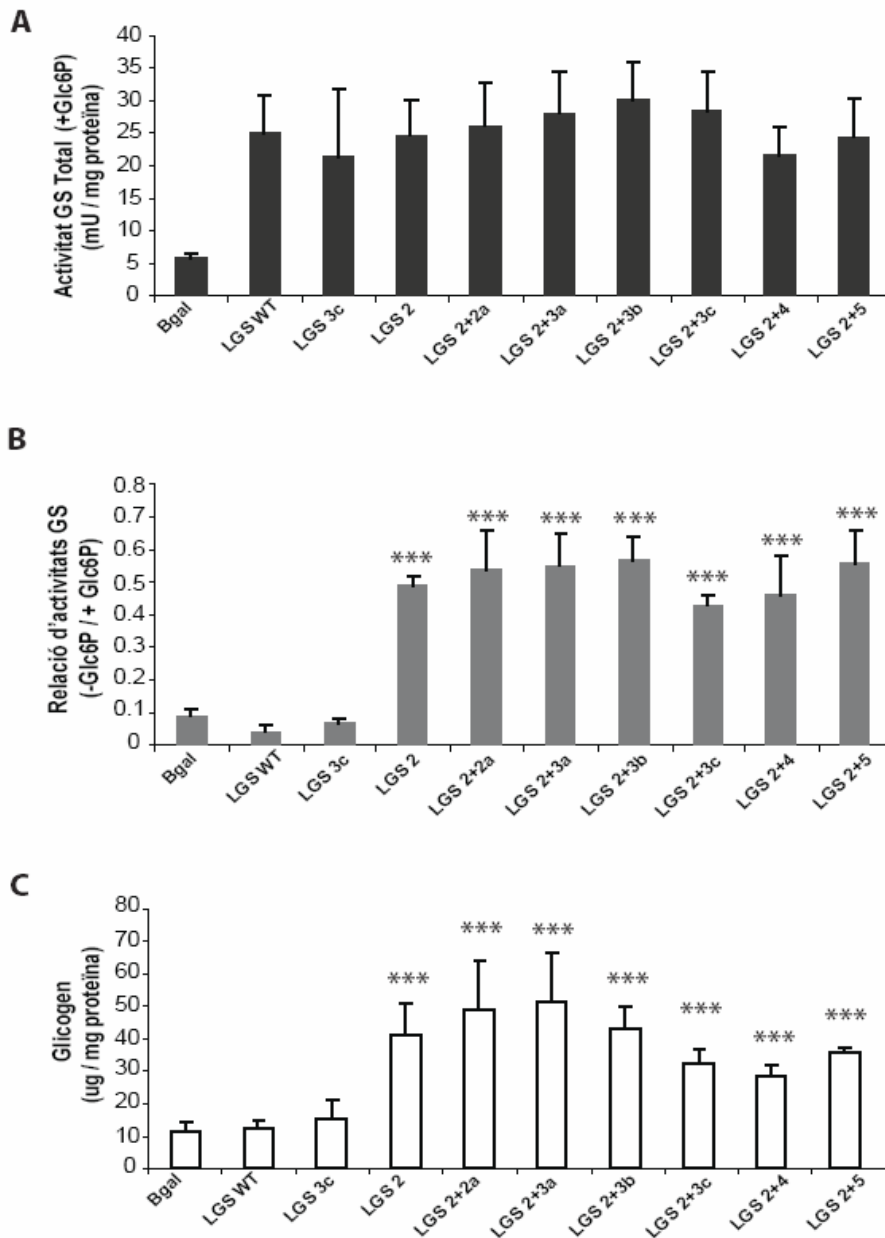


Fig.4 Efectes de la sobreexpressió de les LGS modificades en els residus de fosforilació sobre l'activitat i l'acumulació de glicogen en cèl·lules FTO2B. A) Activitat GS total dels homogenats de les cèl·lules FTO2B que sobreexpressaven les LGS modificades en els residus de fosforilació (Ser per Ala) a un únic lloc de fosforilació (LGS 2; LGS 2a; LGS 3a; LGS 3b; LGS 3c; LGS 4; LGS 5), mutants en dos llocs de fosforilació (LGS 2+2a; LGS 2+3a; LGS 2+3b; LGS 2+3c; LGS 2+4; LGS 2+5), la glicogen sintasa WT

(LGS WT) o la β galactosidasa d'*E. Coli* (Bgal), incubades amb medi amb glucosa 25mM durant 6 hores. L'activitat està expressada en mU per mg de proteïna. Els valors representen la mitjana \pm S.E.M de cinc a nou experiments independents. **B)** Relació d'activitats GS en absència i presència de Glc6P d'aquestes extractes. El símbol indica diferència significativa amb $***p < 0.005$ per comparació amb les cèl·lules que expressen la LGS WT. **C)** Contingut de glicogen en aquestes cèl·lules, expressat en μ g per mg de proteïna. Els valors representen la mitjana \pm S.E.M de cinc a nou experiments independents. El símbol indica diferència significativa amb $***p < 0.005$ per comparació amb les cèl·lules que expressen la LGS WT.

1.4 Anàlisi d'interacció entre els llocs de fosforilació

A continuació es va avaluar si la defosforilació en un determinat residu de la LGS era capaç de produir canvis en el patró de fosforilació en un altre residu.

Primer, es va determinar si les mutacions en els llocs de fosforilació en la LGS que no fossin el lloc 2 produïen canvis en la fosforilació del lloc 2. Per això es va realitzar un anàlisi mitjançant Western blot dels homogenats d'hepatòcits que sobreexpressaven les LGS modificades en els residus de fosforilació i que havien estat incubats amb medi sense glucosa durant 12 hores, usant un anticòs que reconeix la LGS només quan es trobava fosforilada en el lloc 2 (PGS Ser7). Els resultats mostren que aquest anticòs és específic doncs no es detectava cap senyal en l'extracte dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS mutada en el lloc 2 (**Fig. 5A**). Les mutacions en el lloc 2a o la resta dels llocs de fosforilació presents en el domini C-terminal de l'enzim no produïen cap canvi en el patró de fosforilació del lloc 2, tal com es pot concloure al mesurar ràtio entre la senyal dels extractes obtinguda amb l'anticòs PGS Ser7 i la senyal dels extractes obtinguda amb l'anticòs que reconeix totes les formes de l'enzim. A més, la mutació de la serina del lloc 2a per alanina no provocava la pèrdua de la fosforilació del lloc 2, per tant no sembla que sigui requerida una fosforilació prèvia en el lloc 2a per a que es produeixi la fosforilació del lloc 2.

Un anàlisi similar es va dur a terme per veure si les mutacions en els llocs de fosforilació que no fossin el lloc 3a induïen canvis en la fosforilació d'aquest. Es va realitzar un anàlisi mitjançant Western blot dels extractes dels hepatòcits que sobreexpressaven els diferents mutants de la LGS però aquest cop es va usar un anticòs que reconeixia la LGS només quan estava fosforilada en el lloc 3a (PGS Ser640). El PGS Ser 640 és un anticòs específic doncs no es detectava cap senyal en l'extracte dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS mutada en el lloc 3a (**Fig. 5B**). Sorprenentment, només els hepatòcits que sobreexpressaven la LGS mutada en el lloc 3b mostraven una disminució en la senyal de fosforilació del lloc 3a, a diferència dels altres casos on la fosforilació en

el lloc 3a seguia elevada, tal i com es dedueix de la mesura del ràtio entre la senyal dels extractes obtinguda amb l'anticòs PGS Ser640 i la senyal dels extractes obtinguda amb l'anticòs que reconeix totes les formes de l'enzim. Per tant, la defosforilació del lloc 3b parcialment prevenia la fosforilació del lloc 3a, amb el que els resultats suggerien que possiblement es produeix una interacció en termes de fosforilació entre aquest dos llocs.

Les mutacions als llocs 3a o 3b produïen un enzim amb una mobilitat electroforètica incrementada en gels SDS-PAGE (**Fig. 5A, 5B**), tal i com està descrit per a MGS (Skurat, Wang et al. 1994). En canvi, les mutacions a la part N-terminal, als llocs 2 o 2a, o la resta dels llocs del C-terminal, és a dir als llocs 3c o 4 o 5, no varen produir cap efecte en aquest paràmetre. Es dedueix doncs que aquestes mutacions no afectaven a la fosforilació dels llocs 3a o 3b, donant més força al resultat de no trobar una disminució en la fosforilació del lloc 3a mitjançant l'anàlisi per Western blot en els extractes d'hepatòcits que sobreexpressaven la LGS 3c, la LGS 4 i la LGS 5. Si als mutants dels llocs 3a o 3b se'ls introduïa una mutació en el lloc 2 seguien presentant una mobilitat electroforètica incrementada (**Fig. 5C**). Finalment, si als mutants dels llocs 2a, 3c, 4 o 5 se'ls introduïa una segona mutació en el lloc 2, els enzims no presentaven una mobilitat electroforètica incrementada, suggerint que aquestes mutacions no tenien cap efecte sobre la fosforilació en el llocs 3a o 3b.

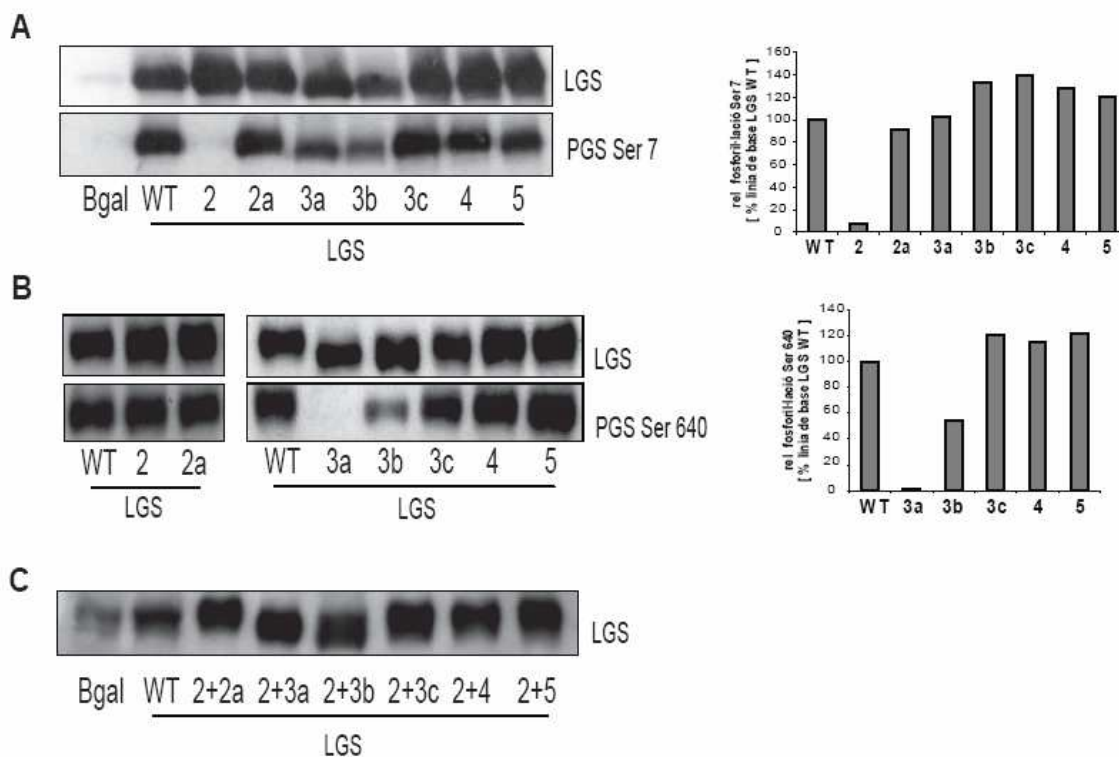


Fig.5 Anàlisi per Western blot de l'expressió de LGS i patró de fosforilació de LGS dels homogenats dels hepatòcits que sobreexpressaven les diferents LGS modificades en els diferents llocs de fosforilació. A) Anàlisi dels homogenats d'hepatòcits incubats en medi sense glucosa durant 12 hores, que sobreexpressaven les LGS mutades en els diferents llocs de fosforilació, la LGS WT, o la Bgal, amb anticossos contra l'enzim total (LGS) o contra la LGS fosforilada en la serina 7 o lloc 2 (PGS Ser7), i l'anàlisi densitomètric relatiu a l'expressió de LGS WT. **B)** Anàlisi dels homogenats d'hepatòcits incubats en medi sense glucosa durant 12 hores, que sobreexpressaven les LGS mutades en els diferents llocs de fosforilació o LGS WT, amb anticossos contra l'enzim total (LGS) o contra la LGS fosforilada en la serina 640 o lloc 3a (PGS Ser640), i l'anàlisi densitomètric relatiu a l'expressió de LGS WT. **C)** Anàlisi dels homogenats d'hepatòcits incubats en medi sense glucosa durant 12 hores, que sobreexpressaven LGS modificades en dos llocs de fosforilació en la mateixa molècula, LGS WT o Bgal amb l'anticòs contra l'enzim total (LGS). En tots els casos s'han analitzat 10 µg de proteïna per carril.

1.5 Efectes de la mutació dels llocs de fosforilació de la LGS en la seva distribució subcel·lular

Una de les qüestions que quedava per resoldre era si els llocs de fosforilació de la LGS estan implicats en el control de la mobilització subcel·lular de l'enzim en resposta a glucosa des d'una distribució citosòlica cap a la perifèria cel·lular. Com s'ha comentat anteriorment, estudis previs del nostre laboratori demostren que el tractament d'hepatòcits primaris amb LiCl a una concentració de 20mM resulta en l'activació de l'enzim però no presenta cap efecte sobre la seva distribució subcel·lular (Garcia-Rocha, Roca et al. 2001). El LiCl és un inhibidor de la quinasa GSK-3, pel que es suggereix que la defosforilació dels residus 3a, 3b, 3c i 4 del C-terminal no estan implicats en aquest fenomen de translocació. Tot i això no hi havia cap evidència directa de que els altres llocs de fosforilació de la LGS no estiguin implicats en el control de la translocació de l'enzim o si aquest control es duu a terme per un altre mecanisme.

Per a estudiar aquest objectiu es va analitzar mitjançant immunofluorescència, la localització de la LGS en els hepatòcits que sobreexpressaven LGS modificades en els llocs de fosforilació incubats amb medi sense glucosa, usant l'anticòs que reconeix la GS hepàtica. La senyal captada pels hepatòcits que no sobreexpressaven la GS hepàtica, és a dir la dels hepatòcits que sobreexpressaven la Bgal, es va fer servir per adaptar la intensitat del làser del microscopi confocal per tal de detectar només la proteïna sobreexpressada. Els hepatòcits que sobreexpressaven l'enzim WT presentaven una localització citosòlica de la proteïna en absència de glucosa (**Fig. 6**), un comportament idèntic al anteriorment descrit per a la LGS endògena (Garcia-Rocha, Roca et al. 2001). Al contrari, els hepatòcits incubats amb un medi de cultiu sense glucosa i que sobreexpressaven el mutant del lloc 2 presentaven l'enzim acumulat a la perifèria cel·lular, amb un patró semblant al que presenta l'enzim endogen en presència del monosacàrid. Aquest resultat no es va observar per cap dels altres mutants d'un únic lloc de fosforilació que no fos el lloc 2. A més, si la mutació al lloc 2 es combinava amb una mutació addicional, també es detectava l'enzim acumulat a la perifèria cel·lular (**Fig. 7**).

Per tant, aquests resultats suggerien que la defosforilació del lloc 2 produïa un enzim que s'acumulava al còrtex cel·lular.

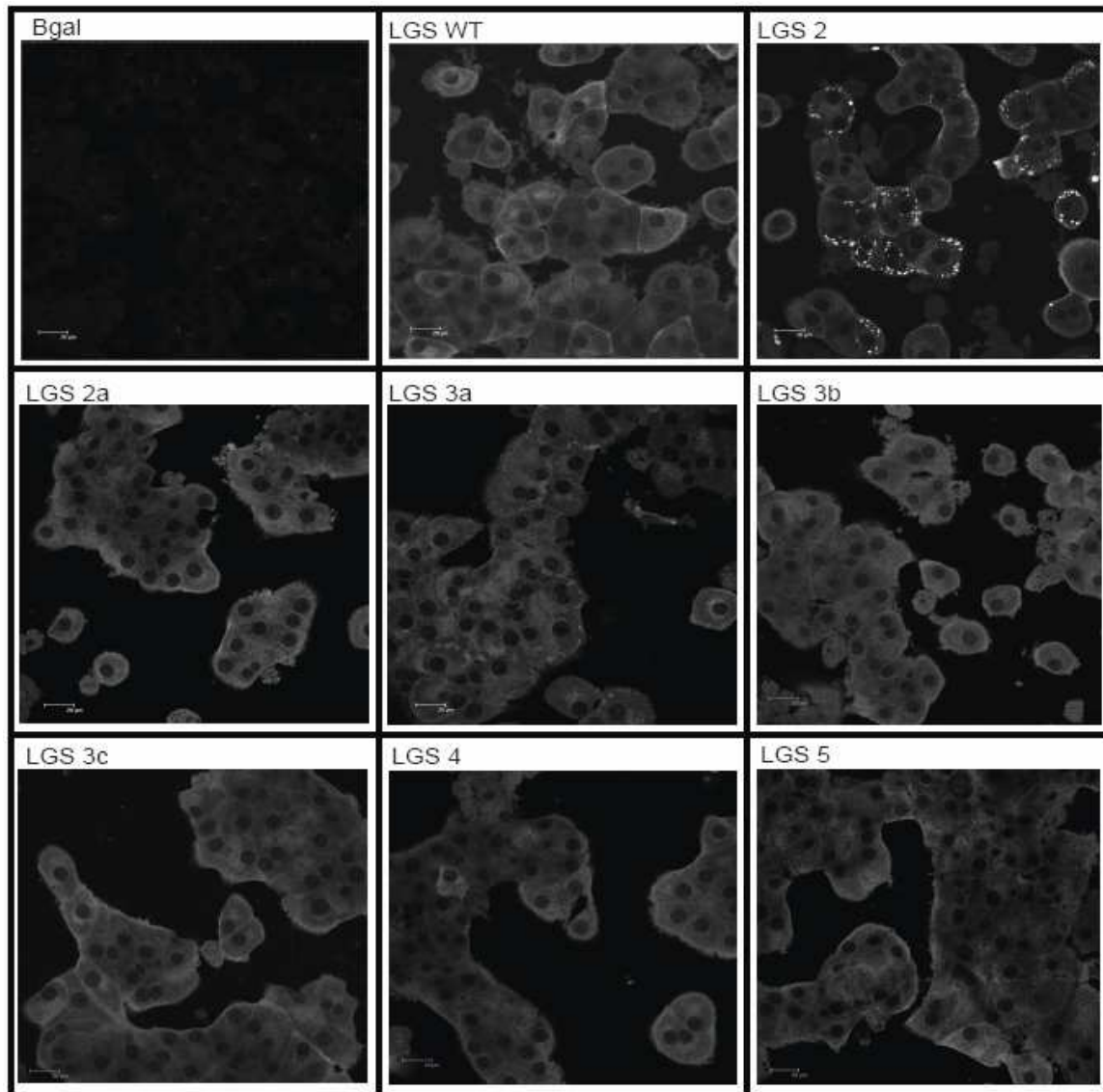


Fig.6 Anàlisi per immunofluorescència de la localització subcel·lular de les LGS modificades en un residu de fosforilació sobreexpressades en cultiu primari hepatòcits. Els hepatòcits en cultiu que sobreexpressaven les LGS mutades en un lloc de fosforilació, la LGS WT o la Bgal, incubades durant 12 hores en absència de glucosa, van ésser fixats amb paraformaldehid al 4%, i es va procedir a fer una immunofluorescència utilitzant un anticòs contra la LGS. Les imatges van ésser obtingudes usant un microscopi confocal amb objectiu 63x (Plan Apo 63x Na 1,4 oil). L'escala representa 20 µm.

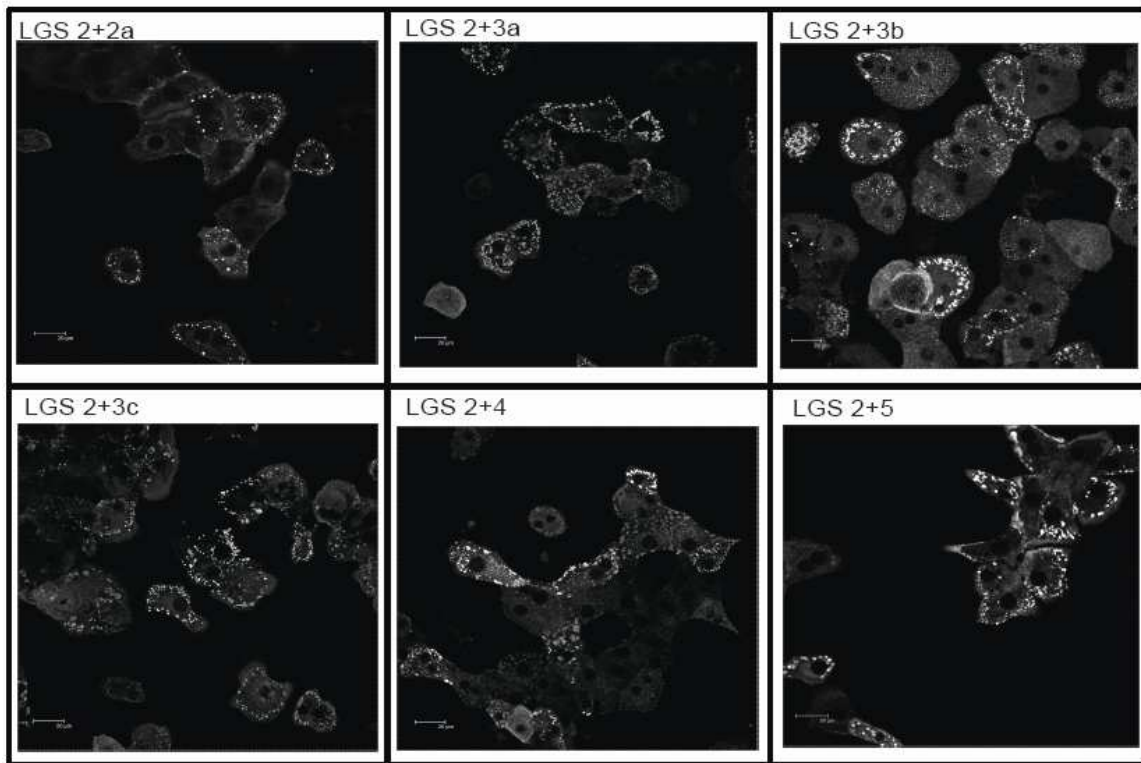


Fig.7 Anàlisi per immunofluorescència de la localització subcel·lular de les LGS modificades en dos llocs de fosforilació sobreexpressades en cultiu primari d'hepatòcits. Els hepatòcits que sobreexpressaven les LGS modificades en dos llocs de fosforilació en la mateixa molècula o la LGS mutada al lloc 2, incubades durant 12 hores en absència de glucosa, van ésser fixats amb paraformaldehid al 4%, i es va procedir a fer una immunofluorescència utilitzant un anticòs contra la LGS. Les imatges van ésser obtingudes usant un microscopi confocal amb objectiu 63x (Plan Apo 63x Na 1,4 oil). L'escala representa 20 μ m.

El fet que la LGS modificada en el lloc de fosforilació 2 com les LGS modificades en dos llocs de fosforilació es trobessin acumulats en la perifèria cel·lular en condicions d'absència de glucosa, podia ésser degut a que aquests enzims podien estar sintetitzant glicogen a partir de precursors gluconeogènics provinents del medi de cultiu. Es van analitzar doncs aquests cultius mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs contra la molècula de glicogen. Els resultats mostraven que els hepatòcits que sobreexpressaven el mutant del lloc 2, o els mutants combinats anteriorment comentats, eren capaços d'acumular glicogen en aquestes condicions (**Fig. 8**). Tanmateix, els hepatòcits que sobreexpressaven els mutants d'un lloc de fosforilació de la LGS, que no era el lloc de fosforilació 2, no acumulaven glicogen si eren incubats amb un medi de cultiu que no contenia glucosa (**Fig. 9**).

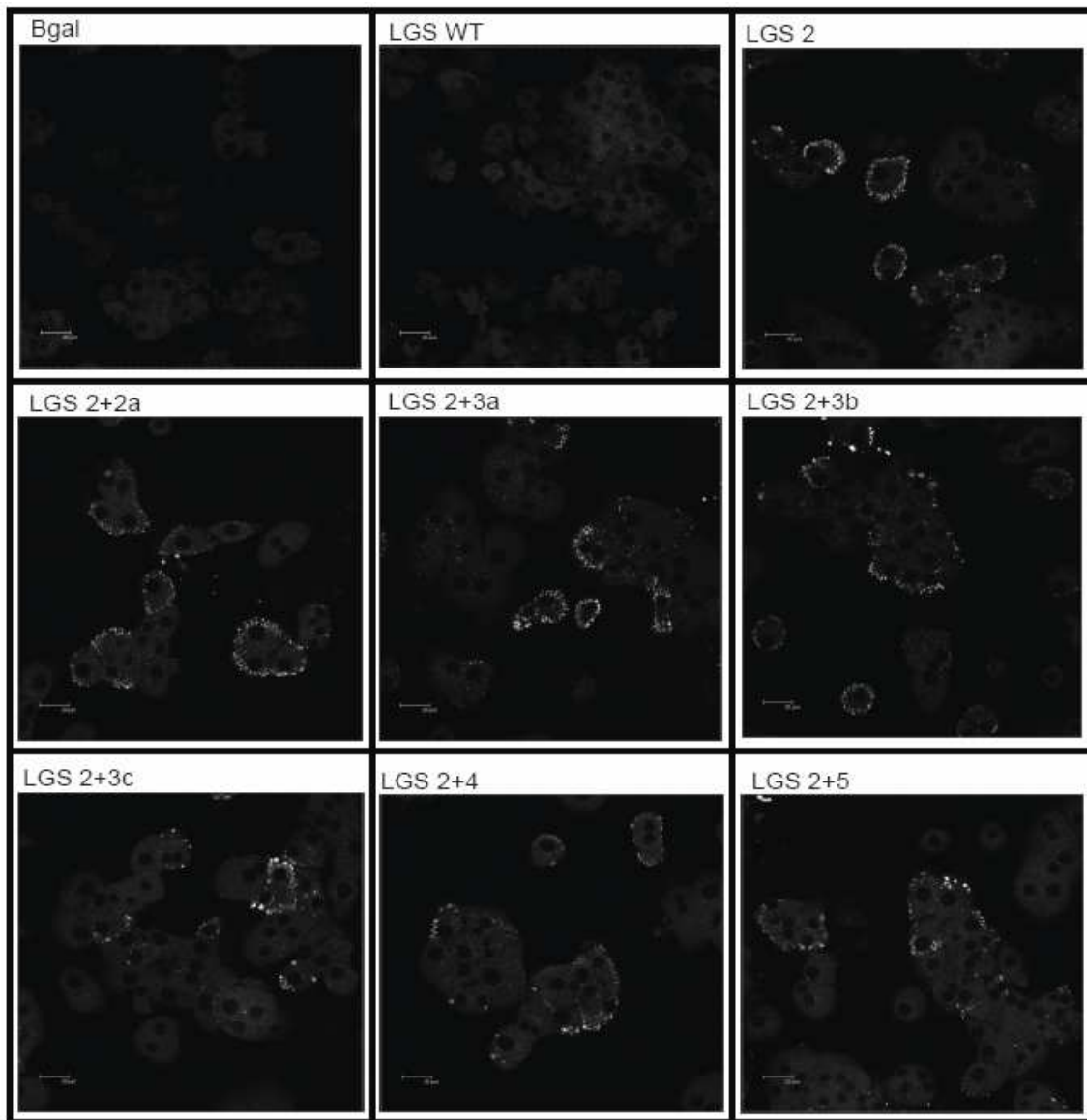


Fig.8 Acumulació de glicogen en hepatòcits induïda per la sobreexpressió de les LGS modificades en els diferents residus de fosforilació. Les cèl·lules, incubades en absència de glucosa durant 12 hores, i que sobreexpressaven Bgal, LGS WT, la LGS mutada en el lloc 2 o LGS mutada en 2 llocs de fosforilació van ésser processades per analitzar-les mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs contra la molècula de glicogen. Les imatges van ésser obtingudes usant un microscopi confocal amb objectiu 63x (Plan Apo 63x Na 1,4 oil). L'escala representa 20 µm.

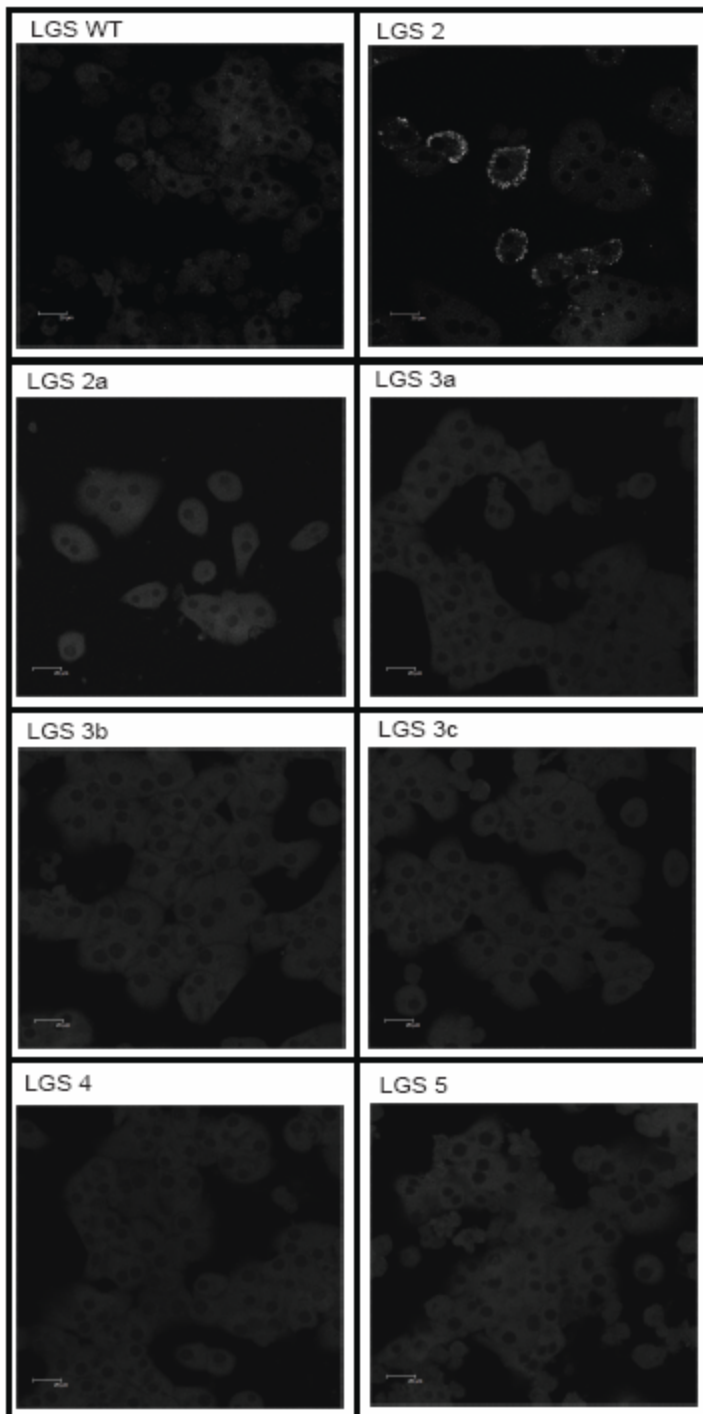


Fig.9 Acumulació de glicogen en hepatòcits induïda per la sobreexpressió dels mutants d'un lloc de fosforilació de la LGS. Les cèl·lules, incubades en absència de glucosa durant 12 hores, i que sobreexpressaven la LGS mutada en només un residu de serina, van ésser processades per analitzar-les mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs contra la molècula de glicogen. Les imatges van ésser obtingudes usant un microscopi confocal amb objectiu 63x (Plan Apo 63x Na 1,4 oil). L'escala representa 20 µm.

1.6 Estudi de la dissociació entre la translocació de LGS i la síntesi de glicogen

Un dels punts que quedava per resoldre era si la translocació de la LGS podia ésser dissociada de la síntesi de glicogen. Per això es va decidir treballar amb enzims que no fossin capaços de sintetitzar glicogen.

Així mateix, es va voler comprovar si la mutació homòloga del residu Glu 509 en la LGS (**Fig. 10**) produïa un enzim totalment inactiu, com passa per a la MGS (Cid, Gomis et al. 2000). Per aquest propòsit, es van generar adenovirus que codificaven per una LGS modificada en el residu glutàmic 509, en la que el glutàmic ha estat canviat per una alanina (LGS E509A). També es van generar adenovirus que codificaven per a una LGS amb tres mutacions a alanina, una en el residu glutàmic 509 i les altres dues en els llocs de fosforilació 2 i 3b (LGS 2+3b E509A). Un cop generats els adenovirus, es va procedir a infectar cultius primaris d'hepatòcits per estudiar aquest punt.

MGS <i>Rattus Novergicus</i> (NP_001103085)	PSYY E PWGYTPA
MGS <i>Mus Musculus</i> (NP_002094)	PSYY E PWGYTPA
MGS <i>Homo sapiens</i> (NP_109603)	PSYY E PWGYTPA

LGS <i>Rattus Novergicus</i> (NP_037221)	PSYY E PWGYTPA
LGS <i>Mus Musculus</i> (NP_663547)	PSYY E PWGYTPA
LGS <i>Homo sapiens</i> (NP_068776)	PSYY E PWGYTPA

Fig.10 Alineament múltiple de les seqüències aminoacídiques de les glicogen sintases musculars i hepàtiques seleccionades. El residu Glu invariant es mostra en negreta gris fosc i enquadrat en les diferents seqüències de GS muscular (MGS) o hepàtiques (LGS). De fet es mostra un alineament específic per a les seqüències d'aminoàcids de la GS de múscul o hepàtica de rata (*Rattus Novergicus*), la GS de múscul o hepàtica de ratolí (*Mus musculus*) i la GS de múscul o hepàtica humanes (*Homo sapiens*); entre parèntesi es mostra el número d'accés del NCBI.

L'anàlisi mitjançant Western Blot dels homogenats d'hepatòcits incubats amb medi sense glucosa o amb glucosa 25mM durant 6 hores, va demostrar que en tots els casos s'estava sobreexpressant nivells similars de proteïna, si es comparava la senyal de l'extracte dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS E509A com la dels que sobreexpressaven la LGS 2+3b E509A, respecte als seus respectius controls, és a dir, la senyal dels extractes dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS WT o la LGS 2+3b (**Fig. 11**).

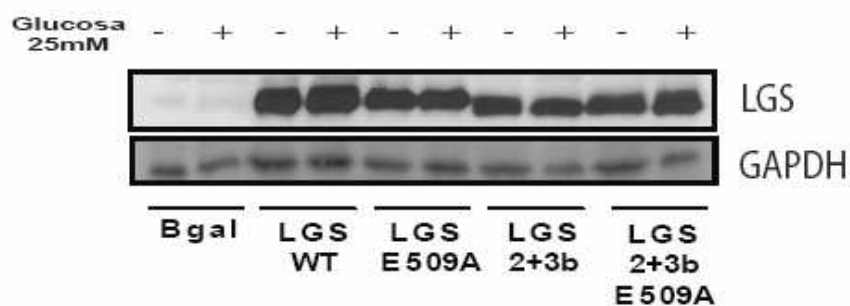


Fig.11 Anàlisi per Western blot dels mutants els mutants catalíticament inactius de la glicogen sintasa hepàtica, amb o sense defosforilació, en hepatòcits incubats en absència o presència de glucosa 25mM en el medi de cultiu. Anàlisi per Western blot dels extractes dels homogenats d'hepatòcits incubats en medi sense o amb glucosa 25mM durant sis hores, que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, el mutant catalíticament inactiu de la LGS en el residu Glu E509 (Glu per Ala; anomenat LGS E509A), el mutant de LGS en dos llocs de fosforilació (LGS 2+3b) i el mutant catalíticament inactiu i amb mutacions en dos llocs de fosforilació (descriu com LGS 2+3b E509A), utilitzant l'anticòs que reconeix la LGS (10 µg de proteïna per carril).

Si analitzàvem l'activitat GS total, activitat GS en presència de Glc6P, tant dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS E509A com la LGS 2+3b E509A, veiem que els nivells d'activitat GS total eren idèntics als dels hepatòcits control que sobreexpressaven la Bgal (**Fig. 12A**), és a dir, només detectàvem l'activitat de la LGS endògena. Els resultats indicaven doncs que el glutàmic 509 forma part del mecanisme catalític de la LGS de rata, i que la seva mutació també produeix un enzim catalíticament inactiu. Conseqüentment, no es van trobar canvis en l'acumulació de glicogen en els hepatòcits

que sobreexpressaven la LGS E509A o la LGS 2+3b E509A respecte els que sobreexpressaven la Bgal, només es detectaven els canvis deguts a l'absència o presència de glucosa 25mM en el medi de cultiu durant les 6 hores finals de l'experiment (**Fig. 12B**).

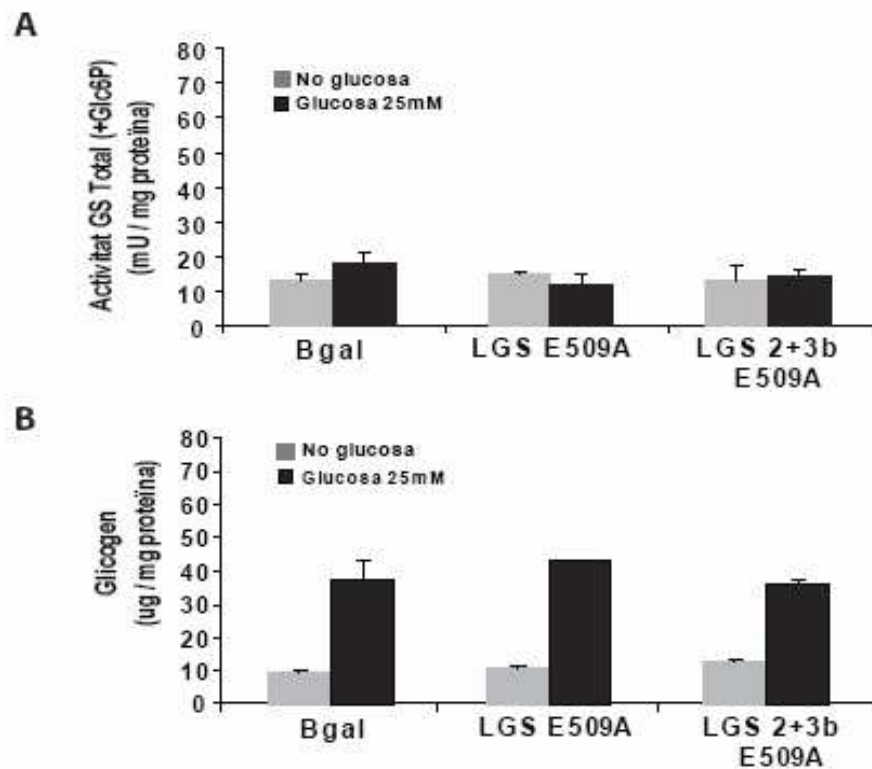


Fig.12 Activitat GS i síntesi de glicogen en hepatòcits que sobreexpressaven els mutants catalíticament inactius de la glicogen sintasa hepàtica, amb o sense modificació en els residus serina 2 i 3b, en hepatòcits incubats en absència o presència de glucosa. **A)** Activitat GS Total dels homogenats d'hepatòcits incubats durant 6 hores amb un medi sense glucosa (barres grises) o amb glucosa 25mM (barres negres), que sobreexpressaven la LGS mutada en el residu Glu E509 (Glu per Ala; anomenat LGS E509A), la LGS mutada en el residu Glu E509 i en dos residus serina (Glu per Ala i Ser per Ala; descrit com LGS 2+3b E509A), o la proteïna Bgal. Les dades representen la mitjana \pm S.E.M. de 3 a 4 experiments independents. **B)** Determinació de l'acumulació de glicogen d'aquests hepatòcits incubats durant 6 hores amb un medi de cultiu sense glucosa (barres grises) o amb 25mM glucosa (barres negres).

Per a estudiar si era possible dissociar el fenomen de translocació de l'enzim de la síntesi de glicogen, varem analitzar els hepatòcits incubats amb un medi sense glucosa durant les últimes sis hores de l'experiment, que sobreexpressaven la LGS E509A o la LGS 2+3b E509A, mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs contra la LGS. L'anàlisi va revelar que el mutant del residu Glu 509 mantenia la capacitat de resposta a un canvi en els nivells de glucosa del medi (**Fig.13**), doncs en absència de glucosa es trobava difós en el citoplasma cel·lular, i en presència del monosacàrid es trobava en la perifèria cel·lular unit al glicogen produït per la GS hepàtica endògena. Curiosament, el mutant catalíticament inactiu i mutat en dos llocs de fosforilació també presentava la mateixa distribució cel·lular, és a dir, difós en el citoplasma en absència de glucosa i concentrat en el còrtex cel·lular en presència del monosacàrid, suggerint que es trobava unit al glicogen produït per la LGS endògena.

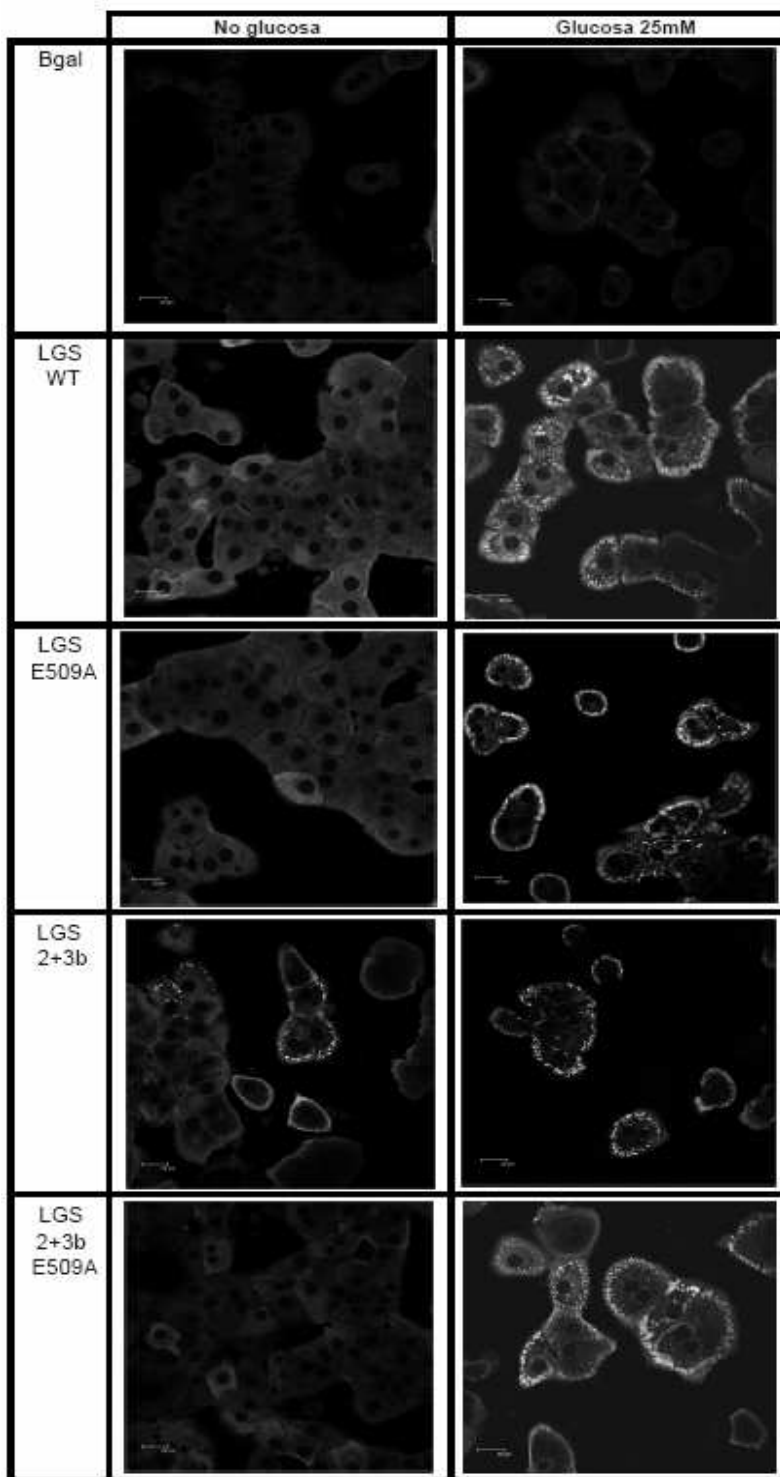


Fig.13 Estudi de la mutació del residu glutàmic 509 sobre la translocació de LGS hepatòcits, per sobreexpressió dels mutants catalíticament inactius de la glicogen sintasa hepàtica, amb o sense modificació dels residus serina 2 i 3b, en hepatòcits incubats en absència o presència de glucosa 25mM en el medi de cultiu. Els hepatòcits que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, la LGS 2+3b, el mutant catalíticament inactiu LGS E509A, i el mutant catalíticament inactiu però modificat en 2 residus serina, LGS 2+3b E509A, incubats durant 12 hores amb un medi sense glucosa, van ésser tractats sense glucosa (columna esquerra) o amb glucosa 25mM (columna dreta) en el medi de cultiu durant 6 hores, finalment fixats amb paraformaldehid al 4%, i es va procedir a fer l'anàlisi per immunofluorescència utilitzant un anticòs contra la LGS. Les imatges van

ésser obtingudes usant un microscopi confocal amb objectiu 63x (Plan Apo 63x Na 1,4 oil). L'escala representa 20 µm.

1.7 Discussió

En aquest capítol mostrem que tot i que l'activitat de la GS està controlada per fosforilació, aquesta regulació presenta algunes diferències entre ambdues isoformes de l'enzim. En el cas de la MGS, cap mutant de les nou serines, a alanines, que regularien la seva activitat, produeix un increment substancial en l'activitat de l'enzim quan són sobreexpressats en cèl·lules COS (Skurat, Wang et al. 1994). De fet, és necessària una mutació addicional en la mateixa molècula de LGS, en els llocs 3a o 3b per incrementar l'estat d'activació de l'enzim de 0,03, obtingut pel mutant del lloc 2, a 0,6 i 0,3 respectivament. En canvi, en aquest projecte es demostra la sola substitució de la serina 2 per alanina en la isoforma hepàtica ja produeix un augment significatiu de la relació d'activitats GS, essent aquest valor 0,6 en hepatòcits que sobreexpressen aquest mutant incubats amb un medi de cultiu sense glucosa. Un valor similar també el trobem en les cèl·lules d'hepatoma de rata FTO2B, que sobreexpressen la LGS 2 incubades amb medi que contenia glucosa 25mM. Aquests dos valors de relació d'activitats GS són molt semblants als que es descriuen en un treball previ on estudien un mutant de la LGS que conté sis substitucions serina per alanina, en els llocs 2, 3a, 3b, 3c, 4 i 5, sobreexpressat en cultiu primari d'hepatòcits (Kadotani, Fujimura et al. 2007). Així doncs, es pot deduir que el control de l'activitat de la LGS recau bàsicament en la fosforilació de la serina 7 o lloc 2, a diferència de la MGS on aquest residu no exerciria per si sol aquest control.

Una conclusió important fruit d'aquest projecte és que la substitució de cada un dels residus del C-terminal, serina per alanina, produeix molt poc efecte en l'estat d'activació de la LGS. Tal vegada la defosforilació d'aquests residus permet una regulació fina de l'enzim en resposta a diferents estímuls. Tanmateix, una altra funció en la que poden tenir un paper rellevant, a part d'intervenir en l'activació de l'enzim, és el control de l'estabilitat de la LGS. En aquesta direcció trobem estudis del nostre laboratori que demostren que el tractament de cultius d'hepatòcits amb LiCl produeix un increment en l'activitat GS total, sense modificar-ne els nivells de mRNA. Per tant, el LiCl incrementa l'estabilitat de la LGS mitjançant un mecanisme que involucraria per una part la

defosforilació de la LGS en aquests residus del C-terminal, i per una altra la inhibició del proteosoma (Fernandez-Novell, Rodriguez-Gil et al. 2007). Tot i això, no es descarta que aquests residus puguin estar implicats en alguna altra funció, que no fos el control de l'activitat o de l'estabilitat de l'enzim, que encara romandria desconeguda.

En aquest projecte també s'ha determinat que la mutació del lloc 5 de LGS, serina per alanina, no impedeix la fosforilació dels altres residus presents en el C-terminal de l'enzim. En la literatura es descriu que la fosforilació de la MGS en el C-terminal ocorre d'una manera jeràrquica, en la que primer s'ha de fosforilar el lloc 5 per tal de que la fosforilació dels llocs 4, 3c, 3b i 3a es doni a terme (Picton, Aitken et al. 1982; Roach 1986; Roach 1990; Zhang, DePaoli-Roach et al. 1993). Si la jerarquia de fosforilació fos realitat per a la LGS, es suposava que degut a la mutació en el lloc 5 aquesta es veuria interrompuda. Per tant, la fosforilació del lloc 3a de la LGS sembla independent de la fosforilació prèvia del lloc 5. A més, la fosforilació del lloc 3a també sembla independent de la fosforilació prèvia dels llocs 4 o 3c. Així doncs, un mecanisme alternatiu de fosforilació del lloc 3a que no depengués de la fosforilació prèvia del lloc 5 operaria en la LGS. Aquest resultat doncs és similar al descrit per MGS, on els llocs 3a i 3b poden ésser fosforilats en cèl·lules COS o Rat 1, encara que el lloc de reconeixement, el lloc 5, estigui interromput per mutació serina per alanina, i això pot ésser degut a que d'altres quinases com la PAS quinasa poden fosforilar el residu 3a en la MGS, el que també podria ocorre pel residu 3b (Skurat, Wang et al. 1994; Skurat and Roach 1995; Skurat and Roach 1996; Wilson, Skurat et al. 2005). En canvi, el que sí que s'observa és una influència en termes de fosforilació entre els llocs 3b i el 3a en la LGS, doncs la defosforilació del lloc 3b parcialment impedeix la fosforilació del lloc 3a. Si observem els resultats obtinguts sobre la fosforilació del N-terminal de la LGS, es dedueix que la mutació de la serina del lloc 2a per alanina no provoca la pèrdua de la fosforilació del lloc 2. Per tant no sembla que sigui necessària una fosforilació prèvia en el lloc 2a per a que es produeixi la fosforilació del lloc 2, tot i que no es descarta que la fosforilació del lloc 2 sigui un requisit per a que es fosforili el lloc 2a, tal i com ocorre en la MGS (Flotow and Roach 1989; Skurat, Wang et al. 1994).

Un altre resultat a destacar és l'acumulació de glicogen en hepatòcits incubats amb medi sense glucosa com en cèl·lules FTO2B incubades amb medi de cultiu amb 25 mM glucosa que sobreexpressen el mutant del lloc 2 de la LGS o les LGS modificades en aquest lloc i un segon residu de fosforilació. Les cèl·lules FTO2B es caracteritzen per tenir tota la maquinària necessària per a sintetitzar glicogen, però no expressen la GK (Zvibel, Fiorino et al. 1998). Això produeix que els nivells de Glc6P no siguin suficients per activar la LGS endògena, pel que aquestes cèl·lules no són capaces d'acumular glicogen en presència de glucosa en el medi de cultiu (Valera and Bosch 1994). La LGS modificada en el lloc 2, o les LGS modificades en aquest lloc i un segon residu de fosforilació, degut a la seva activació constitutiva poden sintetitzar glicogen a partir de la glucosa del medi quan són sobreexpressades en les cèl·lules FTO2B. En canvi, el cas dels hepatòcits és diferent doncs el medi de cultiu no contenia glucosa. De fet, el medi DMEM conté glutamina a una concentració de 4 mM, i una concentració final d'aminoàcids de 10,7 mM, amb el que la seva conversió gluconeogènica a glicogen explica perquè aquests hepatòcits són capaços d'acumular glicogen tot i l'absència de glucosa en el medi de cultiu. Aquesta mateixa situació s'ha descrit en hepatòcits que sobreexpressen la PTG, que activa la LGS i estimula la síntesi de glicogen en hepatòcits incubats amb medi sense glucosa (Berman, O'Doherty et al. 1998). D'altres estudis apunten també a la idea que la síntesi de glicogen es produeix preferentment per la via indirecta quan hi ha activació de la LGS, com en el cas de la sobreexpressió d'un mutant de LGS de sis serines en cultiu d'hepatòcits (Kadotani, Fujimura et al. 2007), i en la sobreexpressió de la PTG en fetge de rata mitjançant injecció d'adenovirus per vena caudal (O'Doherty, Jensen et al. 2000).

Finalment, en aquest projecte es demostra que si s'imita la defosforilació del lloc 2 en la LGS, o bé en aquest lloc i en un altre dels sis residus restants, es produeixen formes d'enzim que s'acumulen a la perifèria cel·lular dels hepatòcits, i que són capaces de sintetitzar glicogen tot i l'absència de glucosa en el medi de cultiu. Per tal d'avançar en el coneixement del mecanisme que controla la distribució subcel·lular de la LGS en resposta a glucosa, es va esbrinar si la síntesi de glicogen pot ésser dissociada de la translocació, mitjançant l'ús d'una forma de LGS que contenia dos substitucions de serina a alanina en els llocs de fosforilació 2 i 3b, i una substitució del residu glutàmic 509 a alanina, aquesta

última generant un enzim incapaç de sintetitzar glicogen. Com ja s'ha comentat prèviament, la LGS 2+3b era capaç de translocar a la perifèria cel·lular dels hepatòcits en absència de glucosa però sorprenentment la LGS 2+3b E509A només es trobava acumulada en el còrtex cel·lular en presència de glucosa, és a dir, quan la LGS endògena sintetitzava glicogen. Aquest comportament pot ésser el reflex de la capacitat de la LGS activa d'unir-se al glicogen, i no pas que la defosforilació del lloc 2 sigui una senyal per a que es produeixi la translocació de l'enzim. Per tant, el mutant del lloc 2 de la LGS, o els mutants d'aquest lloc i un altre residu, podrien unir-se als llocs glicogenogènics de la perifèria cel·lular i tot i l'absència de glucosa, sintetitzar glicogen per la via indirecta en el que es podrien unir més molècules de LGS, i això conduiria a l'acumulació de l'enzim observada en el còrtex cel·lular. Però la forma LGS 2+3b E509A, tot i que pot unir-se al glicogen que es sintetitza per la LGS endògena en presència de glucosa, no és capaç de sintetitzar glicogen. Per tant, la LGS 2+3b E509A no podria generar nous llocs glicogenogènics on s'unirien més molècules de LGS, i no es produiria la translocació de les molècules de LGS al còrtex cel·lular dels hepatòcits quan la glucosa no es troba present en el medi de cultiu. Recolzant aquest resultat trobem estudis previs del nostre laboratori on es demostra que l'activació de LGS mitjançant incubació dels hepatòcits amb LiCl 20mM, encara que no involucra en principi la defosforilació del lloc 2, no produeix translocació de la LGS (Garcia-Rocha, Roca et al. 2001). Aquests resultats apunten doncs a que l'activació covalent de la LGS no condueix a la translocació de l'enzim si no es produeix síntesi de glicogen.

En conclusió, els resultats d'aquest capítol mostren que la serina 7 és el lloc de regulació més important per a l'activitat de la isoforma hepàtica de la GS, a diferència de la isoforma muscular on aquesta serina no jugaria cap paper clau en l'activitat de l'enzim. Tot i que la seva conversió a alanina en la LGS produeix un enzim amb alta activitat, aquesta modificació no seria capaç, per si sola, de produir l'acumulació de les molècules de LGS en la perifèria cel·lular en resposta a glucosa, el que suposa un mecanisme addicional de control de l'enzim. Per tal de que es produeixi la translocació, és indispensable que es generin nous llocs glicogenogènics en la perifèria cel·lular, on s'unirien més molècules de LGS, essent aquí on començaria la síntesi de glicogen. Així

doncs, per a que es doni aquest canvi en la localització intracel·lular de l'enzim en resposta a glucosa és necessària la defosforilació de l'enzim en el lloc 2, però també és necessari que l'enzim sigui capaç de sintetitzar glicogen per poder generar nous llocs glicogenogènics, on es poden unir més molècules de LGS.