



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. Ilona I. Concha

Instituto de Bioquímica y Microbiología

Facultad de Ciencias

**FORMACIÓN DE COMPLEJO MULTIPROTEICO
ENTRE LAFORINA Y MALINA CON GLUCÓGENO
SINTASA EN EPITELIO SEMINÍFERO.**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

KAREN ALEJANDRA VANDER STELT VALDERAS

VALDIVIA-CHILE

2012



Índice de contenidos.

1. Resumen	1
1.1 Summary	2
2. Introducción	3
3. Material y Métodos	25
3.1 Materiales	25
3.2 Material biológico	27
3.3 Instrumentos	27
3.4 Métodos	28
3.4.1 Cultivo de células de Sertoli 42GPA9 y GC-1	28
3.4.2 Extracción de RNA	28
3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa	29
3.4.4 Reacción de polimerasa en tiempo real	30
3.4.5 Transformación, expresión y purificación de proteína recombinante	31
3.4.6 Preparación de stock GST-Malin RING en glicerol	32
3.4.7 Sobreexpresión de GST-Malin RING con IPTG	33
3.4.8 Extracción de proteínas a partir de células	33

3.4.9 Extracción de proteínas a partir de tejido	34
3.4.10 Cuantificación de proteínas totales	34
3.4.11 <i>GST-pulldown</i>	34
3.4.12 <i>Amilosa pulí down</i>	36
3.4.13 Inmunocitoquímica	36
3.4.14 Separación electroforética de proteínas	37
3.4.15 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	38
3.4.16 Análisis de Western blot	39
¿Resultados	40
4.1 Identificación de la isoforma de Glucógeno Sintasa presente en testículo, células germinales y células de Sertoli 42GPA9	40
4.2 Presencia de las proteínas malina y laforina en testículo, células germinales y células de Sertoli 42GPA9	46
4.3 Co-localización de MGS, laforina, malina y PP1 en células de Sertoli 42GPA9 y germinales GC-1	51
4.4 Interacción de malina con laforina y enzimas que participan en la síntesis de glucógeno	58
4.5 Interacción entre polímeros de glucosa con GS, PP1, malina y laforina	63

5. Discusión	65
6. Conclusiones	75
7. Bibliografía	77

Índice de figuras.

Figura 1. Metabolismo del glucógeno	5
Figura 2. Activación de la glucogénesis	9
Figura 3. Glucógeno Sintasa	11
Figura 4. Complejo Laforina-Malina, un nuevo mecanismo de regulación	14
Figura 5. Epitelio seminífero	19
Figura 6. Expresión de la isoforma muscular de Glucógeno Sintasa en testículo de ratón	41
Figura 7. Expresión de la isoforma muscular de Glucógeno Sintasa en línea celular Sertoli 42GPA9	43
Figura 8. Expresión de las proteínas laforina y malina en testículo, células de Sertoli 42GPA9 y células germinales masculinas	47
Figura 9. Inmunolocalización de las proteínas malina, laforina con MGS en células de la línea germinal GC-1 y Sertoli 42GPA9	53
Figura 10. Inmunolocalización de PP1 y co-localización con MGS y malina en línea germinal GC-1 y Sertoli 42GPA9	55
Figura 11. Interacción directa de malina con laforina y con proteínas implicadas en la síntesis de glucógeno en células germinales y de Sertoli	59

Figura 12. Interacción directa de malina con laforina y con proteínas implicadas en la síntesis de glucógeno en tejido de rata	61
Figura 13. Interacción de proteínas que participan en el proceso de glucogénesis con polímeros de glucosa	64
Figura 14. Modelo propuesto de la regulación ejercida por el complejo malina-laforina sobre la síntesis de glucógeno testicular	76

Lista de abreviaturas.

AMPK: Proteína quinasa activada por Adenosin monofosfato

BHT: Barrera hematotesticuar

CBD: Dominio de unión a carbohidrato

DMEM F-12: Medio Dulbelcco's Eagle modificado enriquecido con F-12

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

FBS: Suero fetal bovino

G1P: Glucosa-1-fosfato

G6P: Glucosa-6-fosfato

GLUT: Tranportador facilitativo de hexosas

GBE: Enzima ramificante de glucógeno

GS: Glucógeno Sintasa

GSK3: Glucógeno Sintasa quinasa 3

GST: Glutación-S-transferasa

HSP70: Proteína chaperona (*Heat Shock protein 70*)

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido LD: Enfermedad de Lafora

LB: Medio Luria Bertani

LGS: Glucógeno Sintasa hepática

MBP: Proteína unida a maltosa

MGS: Glucógeno Sintasa Muscular

PBS: Tampón fosfato salino

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa

PKB: Proteína quinasa B

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP1 : Proteína fosfatasa 1

PTG: *Protein targeting to glycogen*, proteína de andamiaje.

PVDF: Polivinilideno fluoruro

RING: *Really Interesting New Gene*, dominio de proteínas.

RT-PCR: Transcriptasa reversa acoplada a la reacción de polimerasa en cadena

SDS: Dodecilsulfato de sodio

TEMED: N,N,N'N'-tetrametilendiamina

UDP: Uridin difosfato

UTP: Uridin trifosfato

Agradecimientos

Una etapa de mi vida ha culminado y llegado este momento no encuentro las palabras suficientes para agradecerle a Dios la bella familia que me dió. Papás y Meli, ustedes fueron parte esencial de este proceso, sin su amor, apoyo y eterna dedicación esto podría haber sido más difícil.

Dra. Ilona, mil gracias por permitirme desarrollar mi trabajo de tesis en su laboratorio, usted siempre me brindó apoyo y por sobre todo, creyó en mí. Queridos, estimados y adorados compañeros de laboratorio Franz, Camila, Karina, Petre, Play, Malro, Johanna, Antonia, Paxi, Noe, les agradezco enormemente su compañía en todo este trayecto, me soportaron con mañas y sin mañas, me enseñaron de lo académico y de lo cotidiano, en ustedes además de compañeros encontré verdaderos amigos.

Gracias a todos aquellos que han estado conmigo desde siempre y a quienes conocí en este viaje, sus sonrisas, abrazos y palabras de aliento fueron una luz que me acompañó día a día.

Mucho de lo que soy es gracias a ustedes.

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT-1110508, 1090740, 1110571.

1. Resumen.

Las células de Sertoli proveen soporte estructural y nutritivo para el desarrollo de las células germinales siendo capaces de sintetizar glucógeno, el principal almacén de glucosa en células animales. El glucógeno es un polímero de glucosa asociado a varias proteínas y participa en diversas funciones biológicas. La síntesis de glucógeno es un proceso altamente regulado en el cual la enzima Glucógeno Sintasa (GS) sufre cambios en su localización subcelular, activación por la glucosa-6-fosfato, inactivación vía fosforilación y degradación por el complejo malina-laforina, mecanismo regulatorio descubierto recientemente que ubiquitina a GS y a otras proteínas involucradas en la glucogénesis. Para determinar si es que en el epitelio seminífero malina y laforina cumplen un rol regulatorio en la síntesis de glucógeno se utilizó como modelo de estudio la línea celular GC-1 (espermatogonias) y Sertoli 42GPA9 y extractos de testículo de rata. Mediante RT-PCR, inmunocitoquímica y *Western blot* se determinó la expresión de la isoforma muscular de GS (MGS), laforina y malina. Por microscopía confocal se observó que malina y laforina colocalizan tanto con MGS como con la proteína fosfatasa 1 (PP1). Ensayos de GST-pull down utilizando como carnada el dominio RING de malina demostraron la interacción entre malina y MGS en GC-1, Sertoli 42GPA9 y testículo confirmando la formación del complejo que además de interactuar con MGS también lo hace con PTG (*protein targeting to glycogen*).

Estos resultados sugieren por primera vez que en testículo, la síntesis de glucógeno está siendo regulada por el complejo malina-laforina.

1.1 Summary.

Sertoli cells provide structural and nutritional support for the developing germ cells and are able to synthesize glycogen, main storage form of glucose in animal cells.

Glycogen is a branched polymer of glucose associated with a population of proteins that mediate its biological functions. Glycogen synthesis is a highly regulated process in which Glycogen Synthase (GS) exhibits changes in its subcellular localization, activation by glucose-6-phosphate, inactivation via phosphorylation and degradation by malin-laforin complex, newly discovered regulatory mechanism, which ubiquitinates GS and proteins involved in glycogen synthesis. To determine if malin and laforin play a regulatory role in glycogen synthesis in seminiferous epithelium we used spermatogonium cell line GC-1, Sertoli 42GPA9 and rat testis extracts. By RT-PCR, immunocytochemistry and Western blot analysis we determined the expression of the muscular isoform of GS (MGS), laforin and malin in these cells. Confocal microscopy showed that malin and laforin colocalize with MGS and also with phosphatase PP1. GST-pull down assays using the malin-ring domain as bait demonstrated the interaction between malin and endogenous MGS in cell line GC-1, Sertoli cell line 42GPA9 and whole testis confirming the formation of a complex that interacts with MGS and also with protein targeting to glycogen (PTG). These results suggest for the first time that in testis, glycogen synthesis is being regulated by a malin-laforin complex.

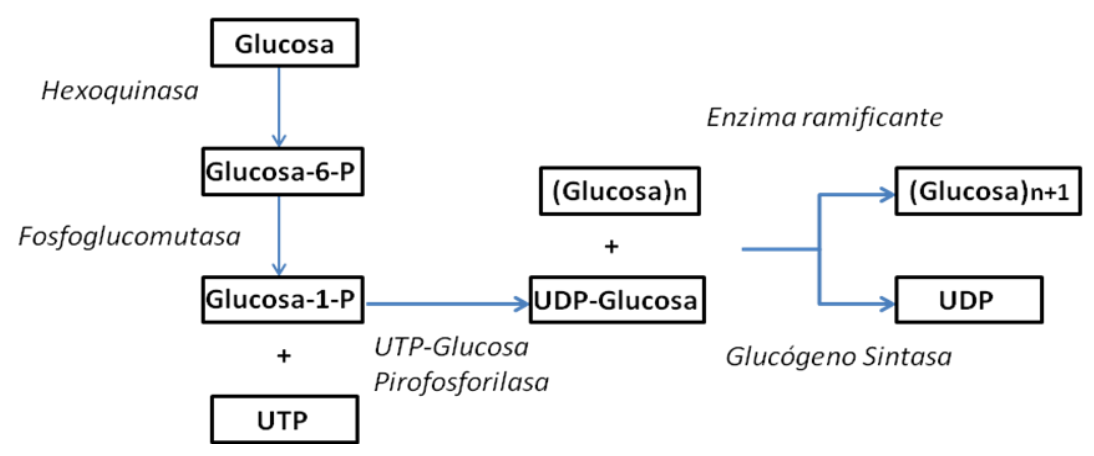
2. Introducción.

El glucógeno se define como un polímero de glucosa altamente ramificado cuya función principal es almacenar la energía para varios tipos celulares encontrándose en un mayor porcentaje en músculo esquelético e hígado. Por una parte, para la síntesis o glucogénesis el precursor es la UDP-glucosa la cual se forma a partir de glucosa-1-fosfato y UTP, reacción catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa. La síntesis de glucógeno se inicia a partir de la enzima glicogenina, la cual autocataliza la unión de un residuo de glucosa (glucósilo) al OH de uno de sus residuos de tirosina mediante un enlace O-glucosídico, a continuación se unen entre 7 a 11 glucósilos más vía enlace α -1,4 glucosídico obteniendo una cadena naciente de glucógeno y liberándose UDP cada vez. Este complejo actúa como sustrato para la glucógeno sintasa (GS), la cual cataliza la elongación de las cadenas de glucógeno mediante enlaces α -1,4 glucosídicos. Mientras que la enzima ramificante (GBE; *Glycogen Branching Enzyme*) transfiere cadenas de glucosas pre-formadas al C6 de una glucosa terminal para incrementar el grado de ramificación del glucógeno, catalizando la formación de enlaces α -1,6 glucosídicos (Roach *et al.*, 2012).

La degradación de glucógeno, para obtener glucosa libre en el hígado y mantener la homeostasis en la sangre o bien cuando los músculos requieren energía para la contracción, es un proceso denominado glucogenólisis en el cual las enzimas encargadas son glucógeno fosforilasa y la enzima desramificante. La fosforilasa cataliza el corte de los enlaces α -1,4 glucosídicos liberándose glucosa-1-fosfato hasta 4 glucosas antes del enlace α -1,6 glucosídico. Al llegar a este punto, la

enzima desramificante, que tiene un sitio activo con actividad α -1,6 glucosidasa y otro con actividad transferasa, primero transfiere tres residuos de glucosa quedando solo uno, a continuación cataliza la hidrólisis del enlace α -1,6 glucosídico liberándose glucosa. El mayor producto que se libera es glucosa-1-fosfato y según los requerimientos nutricionales que existan la enzima fosfoglucomutasa cataliza la conversión a glucosa-6-fosfato y ésta entra a la vía de la glicólisis en donde dependiendo de la disponibilidad de oxígeno se sintetiza acetil-CoA o lactato como ocurre en músculo esquelético o bien, la enzima glucosa-6-fosfatasa presente en hígado y riñón la convierte en glucosa libre lista para ser liberada al torrente sanguíneo (Figura 1).

A Glucogénesis



B Glucogenólisis

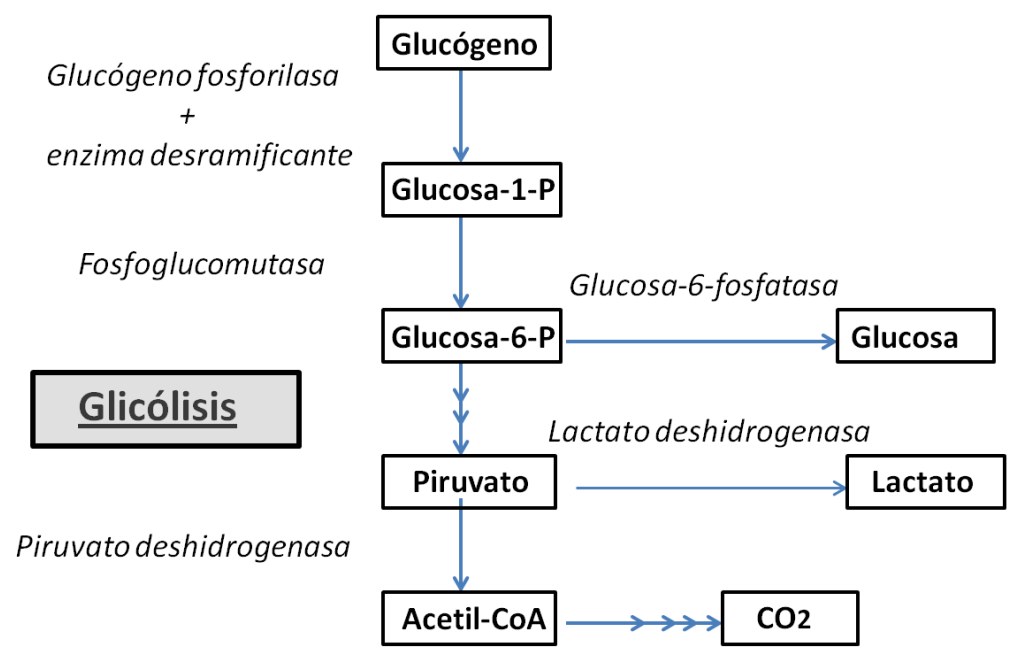


Figura 1: Metabolismo del glucógeno. Esquema representativo de las vías de síntesis y degradación del glucógeno. A) La glucosa entra a la célula y es fosforilada por la hexoquinasa pasando a formar glucosa-6-P (G6P). La G6P sirve de sustrato para la fosfoglucomutasa que la transforma a glucosa-1-fosfato (G1P). La G1P y UTP forman Uridin fosfato glucosa (UDP-glucosa), reacción catalizada por la UDP-Glucosa Pirofosforilasa liberando 2 fosfatos inorgánicos (PPi). UDP-glucosa es sustrato de la Glucógeno Sintasa (GS) y luego la enzima ramificante cataliza la formación de enlaces α -1,6 glucosídicos. (B) El primer paso para la degradación es la hidrólisis de los enlaces α -1,4 y α -1,6 glucosídicos por las enzimas glucógeno fosforilasa y desramificante, respectivamente, luego la fosfoglucomutasa transforma la G1P a G6P y ésta puede ingresar a la vía de la glicólisis o ser liberada al torrente sanguíneo tras la acción de la glucosa-6-fosfatasa.

Hasta ahora se han descrito 4 mecanismos regulatorios en la síntesis de glucógeno: regulación por compartimentalización subcelular de GS, activación alostérica de GS, disminución de la síntesis de algunas proteínas y cambios en el estado de fosforilación de GS y también de glucógeno fosforilasa, resultando en un proceso bastante complejo que depende por sobre todo de los niveles de glucosa en la sangre.

En humanos, luego de la ingesta de una comida la insulina estimula rápidamente el transporte de glucosa al interior de las células para ser convertida a glucógeno (Shulman *et al.*, 1990) y así retornar al nivel normal de glucosa. Esto lo hace promoviendo la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde vesículas intracelulares hacia la membrana citoplasmática. Consecuentemente la glucosa captada por los transportadores es fosforilada inmediatamente por una hexoquinasa, aumenta la concentración de G6P y se favorece la síntesis de glucógeno (Simpson *et al.*, 2001).

Se han identificado 2 mecanismos regulatorios en los cuales la vía de señalización Insulina/IRS/PI3K/PKB juega un rol clave: activación alostérica por G6P (Leloir *et al.*, 1959) y fosforilación (Friedman y Lerner, 1963), la cual inhibe a GS. Esta hormona eleva los niveles de G6P al aumentar el transporte de glucosa y activar a la GS. El esquema de la figura 2 muestra la cascada de señalización que comienza con la unión de insulina a sus receptores en la membrana citoplasmática, estos se autofosforilan en ciertos residuos de Tyr e interactúan con varias proteínas (Insulin Receptor Substrates, IRS), entre ellas con la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Shepherd P.R., 2005), la cual activa a la proteína quinasa B (PKB o Akt), favoreciendo la síntesis de glucógeno ya que

ésta fosforila e inactiva a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (McManus *et al.*, 2005). GSK3 es la enzima responsable de fosforilar un residuo crítico de GS y con ello reducir su actividad drásticamente (Jensen *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha descrito que la activación alostérica de GS por G6P es capaz de contrarrestar casi totalmente la inhibición por fosforilación por lo que éste sería el mecanismo primordial por el cual la insulina promueve la síntesis y acumulación de glucógeno *in vivo* (Bouskila *et al.*, 2010). GS posee en su sitio activo residuos de arginina altamente conservados (figura 3B) que le confieren sensibilidad a la activación por el efector alostérico (Pederson *et al.*, 2000).

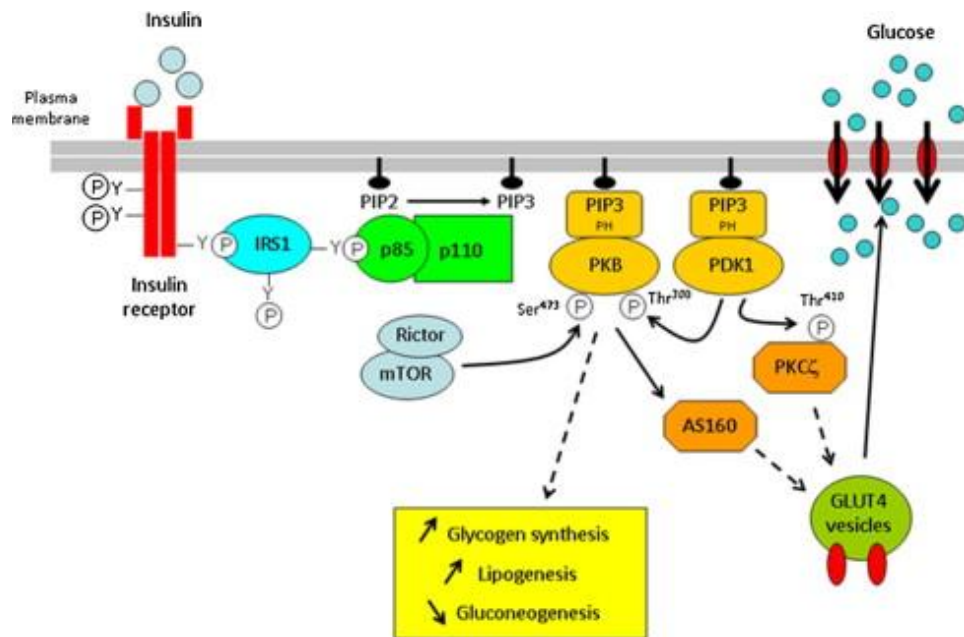


Figura 2: Activación de la glucogénesis. Vía de señalización Insulina/IRS/PI3K/PKB que produce la activación de la GS a través de la fosforilación e inactivación de GSK3 β por PKB y la translocación a la membrana plasmática de los transportadores de glucosa GLUT4, favoreciendo el ingreso de glucosa a la célula (extraído de Turban and Hajdich, 2011).

Como ya se había mencionado antes, la regulación por fosforilación catalizada por quinasas da como resultado la inactivación de GS y la activación de la glucógeno fosforilasa, mientras que la desfosforilación produce el efecto contrario activando la glucogénesis.

Hasta ahora se conocen 2 isoformas de la GS en mamíferos, la muscular (MGS) que se expresa en la mayoría de los tejidos y la hepática (LGS), cuyos pesos moleculares varían entre 80-95 KDa y se caracterizan por ser fosforiladas en múltiples residuos. En el caso de MGS, 9 sitios ubicados entre el N-terminal y C-terminal pueden ser fosforilados por varias quinasas tales como AMPK, CAMKII, PKA, GSK3, entre otras (figura 3C), dentro de los cuales 4 sitios, 2, 2a, 3a y 3b son críticos en cuanto a la actividad de la enzima (Skurat *et al.*,1994 y Skurat *et al.*,1995) siendo el 3a (Ser 640/641) el más importante ya que al estar fosforilado la actividad de la enzima desciende en un 80% aproximadamente (Jensen *et al.*, 2006). GSK3 β es la quinasa responsable de esta y otras fosforilaciones de los residuos 3b, 3c y 4 cuyo mecanismo requiere la fosforilación previa de otros residuos en la GS y como se explicó antes, responde al estímulo de insulina. Por otro lado, en la LGS el sitio 2 juega un rol importante en la fosforilación (Ros *et al.*, 2009).

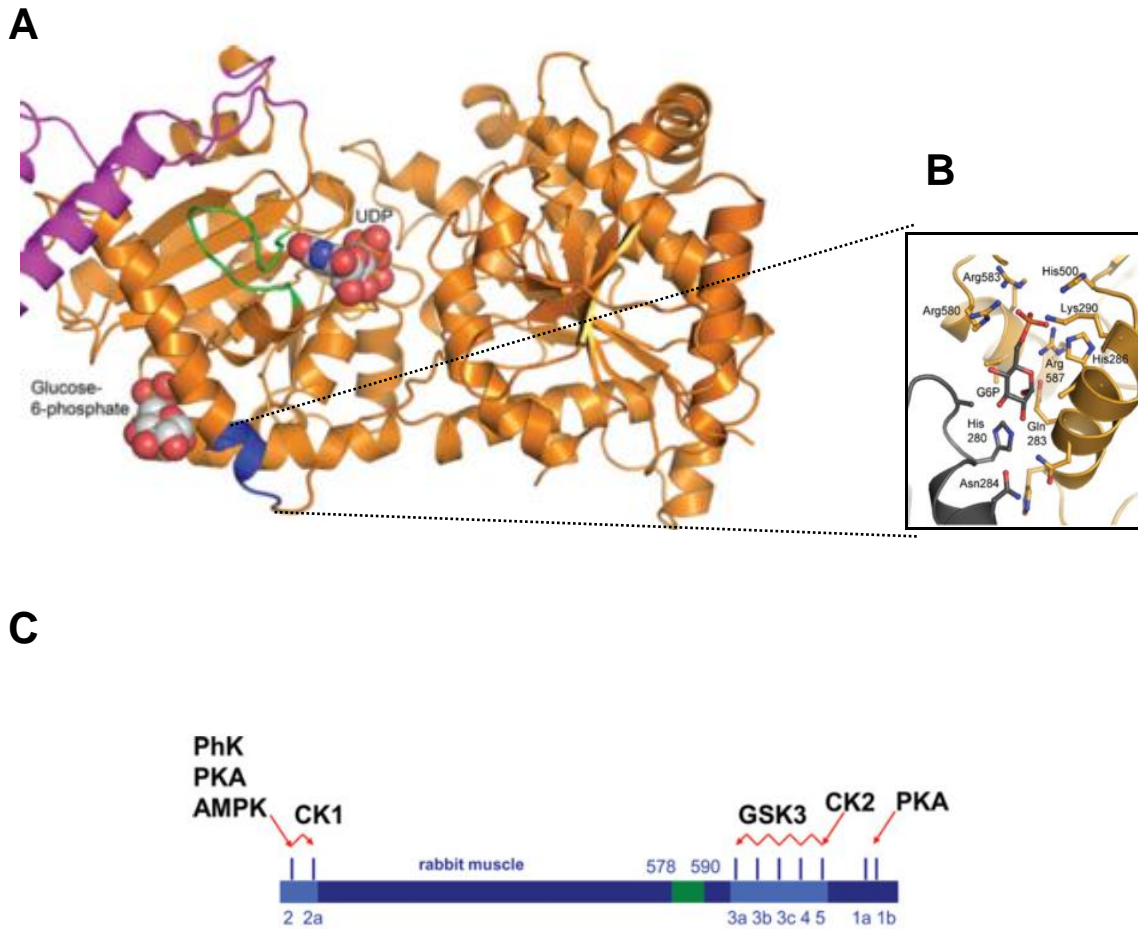


Figura 3: Glucógeno Sintasa. A) La estructura tridimensional de la GS consiste en un tetrámero cuyo sitio activo (en azul) cambia de conformación en presencia del activador alostérico G6P y un dominio (en verde) que une la UDP-glucosa entrante. B) El sitio activo de la GS presenta varios residuos de Arg que actúan como reguladores ya que en estado basal forman interacciones entre ellos las cuales son removidas en presencia de G6P. C) Isoforma muscular de GS que muestra los sitios de fosforilación más importantes y las enzimas quinasas que están a cargo de ello, destacando el sitio 3a que es esencial para la activación de la enzima (Extraído de Roach *et al.*, 2012).

La desfosforilación de GS y glucógeno fosforilasa es un proceso mediado por la proteína fosfatasa 1 (PP1). Esta enzima no posee un dominio de unión a carbohidrato pero la unión es posible ya que PP1 interactúa con una proteína de andamiaje denominada PTG (Protein Targeting Glycogen) (Printen *et al.*, 1997).

En cuanto a los cambios en la localización intracelular se ha descrito que en condiciones de privación de glucosa y en ausencia de glucógeno MGS se concentra y agrega en el núcleo de adipocitos y miocitos, mientras que al retornar a niveles de glucosa normales la enzima transloca al citoplasma donde comienza rápidamente la síntesis de glucógeno (Cid *et al.*, 2005). Este mismo efecto se ve en hepatocitos, donde la glucosa induce la translocación de LGS a sitios cercanos de la membrana plasmática (Fernández-Novell *et al.*, 1997).

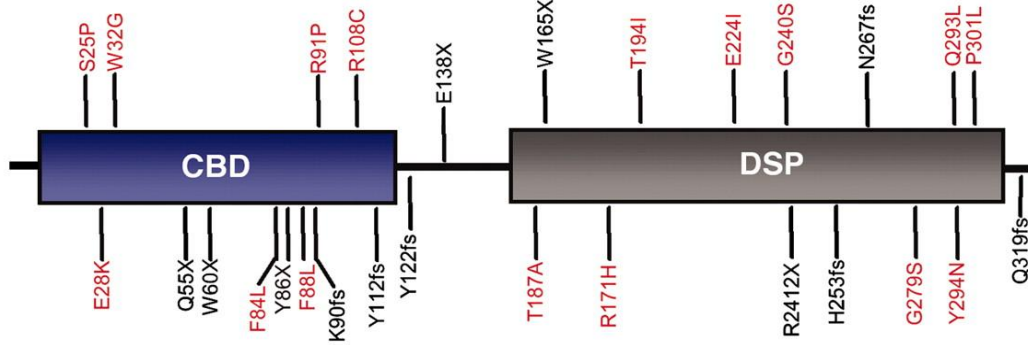
Por otro lado, la degradación citosólica del glucógeno por la fosforilasa y la enzima desramificante es un proceso que aún no ha sido esclarecido del todo ya que falta por descubrir qué mecanismos hormonales y bioquímicos participan. Hasta ahora, además de la fosforilación que lleva a la activación de la enzima se sabe que el glucógeno es degradado en el lisosoma, el mecanismo exacto por el cual el polímero es transferido a este organelo no se conoce, pero hay evidencia que apunta a que existe tráfico vesicular tipo autofagia (Kotoulas *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación del metabolismo del glucógeno a partir de la investigación de una enfermedad poco conocida denominada Enfermedad de Lafora (LD, Lafora Disease). LD es una patología autosómica recesiva también llamada Epilepsia Mioclónica Progresiva que se manifiesta durante la adolescencia con convulsiones tónicas, mioclonías,

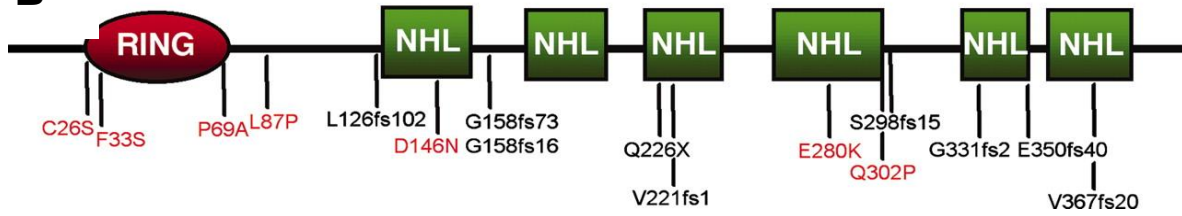
problemas visuales y a medida que avanza la enfermedad los pacientes sufren de apraxia, afasia, demencia, terminando en la muerte 10 años después del inicio de los síntomas (Andrade *et al.*, 2007). El sello de esta enfermedad son los cuerpos de Lafora (LB, Lafora bodies) que son depósitos de glucógeno mal ramificado e insoluble en el citoplasma de las células de distintos órganos, como el corazón, músculo, neuronas entre otros (Cavanagh, 1999). EPM2A y EPM2B/NHLRC1 son dos genes que se han asociado a LD, mutaciones en cualquiera de estos dos desencadena la enfermedad en el 90% de los casos (Minassian *et al.*, 1998), (Chan *et al.*, 2003).

EPM2A es el gen que codifica para laforina, proteína ubícua con alto nivel de expresión en músculo, hígado, corazón, cerebro y riñón. Posee un dominio en el C-terminal que le otorga actividad fosfatasa dual (DSP) sobre residuos de Tyr y Ser/Thr (Ganesh *et al.*, 2000) y con un dominio de unión a carbohidrato en el N-terminal (figura 4A). Es biológicamente relevante el hecho de que laforina sea capaz de desfosforilar sustratos no proteicos siendo la única clase de DSPs que actúa sobre complejos carbohidratos denominándose así glucano-fosfatasa (Wang *et al.*, 2002) incluyendo al glucógeno, ya que se demostró que laforina es capaz de reducir en un 25% el nivel de fosfato de las moléculas de glucógeno presentes en músculo esquelético de conejo *in vitro* (Tagliabracci *et al.*, 2007). Además de interactuar con carbohidratos se ha reportado que interactúa con

A



B



C

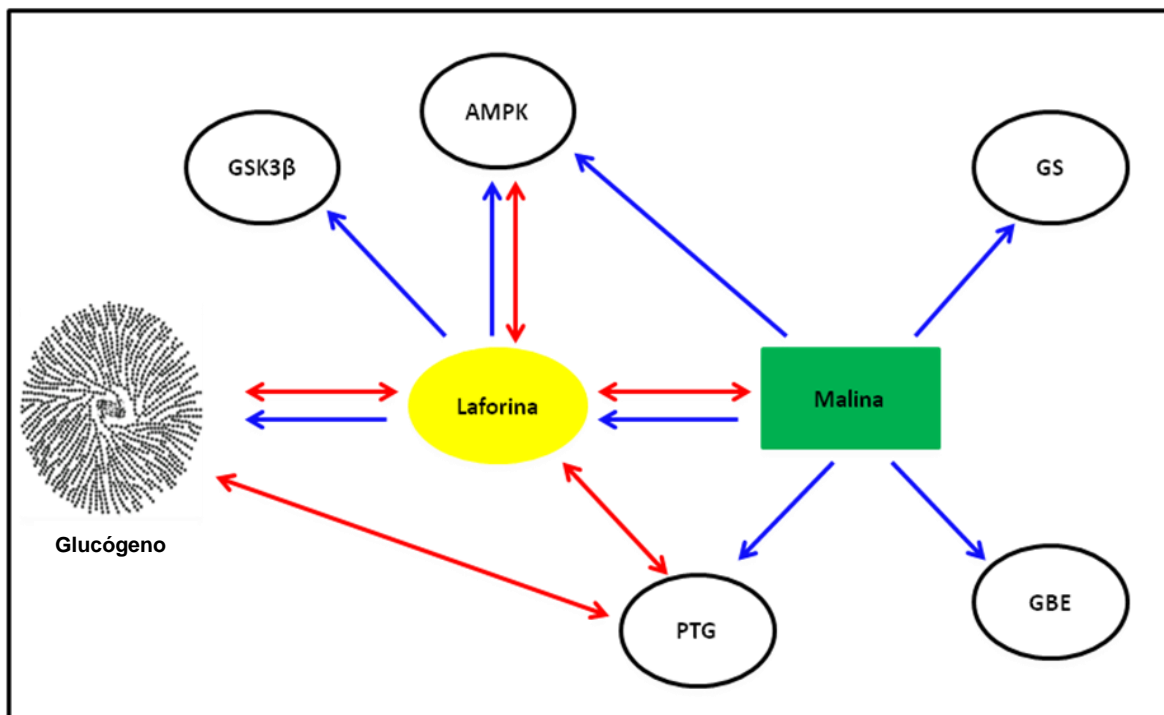


Figura 4: Complejo Laforina-Malina, un nuevo mecanismo de regulación. A) Estructura de Laforina. Proteína con un dominio de unión a carbohidrato (CBD) hacia el extremo amino y un dominio de actividad fosfatasa dual (DSP) hacia el C-terminal. B) Estructura de Malina. Esta proteína E3 ubiquitina ligasa posee un dominio RING finger típico de su clase y 6 dominios NHL que le permite la interacción con proteínas que son blanco de su actividad. (A y B) Mutaciones del tipo *missense* encontradas en pacientes con LD se observan en rojo mientras que otras mutaciones en negro (Extraído de Gentry *et al.*, 2005). C) Esquema representativo de las interacciones reportadas hasta el momento entre laforina, malina y enzimas pertenecientes al metabolismo del glucógeno. La flecha en azul indica la relación enzima-sustrato. La doble flecha en rojo indica interacción proteína-proteína y proteína-glucógeno (Adaptado de Roach *et al.*, 2012).

GSK3 (Lohi *et al.*, 2005), PTG (Fernandez-Sanchez *et al.*, 2003), AMPK (Solaz-Fuster *et al.*, 2008), GS (Worby *et al.*, 2006) y malina (Gentry *et al.*, 2005).

El gen EPM2B/NHLRC1 codifica para malina (figura 4B), una E3 ubiquitina ligasa con un dominio N-terminal RING *finger* típico de esta clase de enzimas seguido de 6 dominios NHL que le permiten interactuar con otras proteínas para llevarlas a degradación (Chan *et al.*, 2003). Gentry *et al.*, en el año 2005 reportaron que malina interactúa con laforina y cataliza su poliubiquitinación *in vitro* llevándola a degradación por la vía dependiente de proteosoma. Además se ha descubierto que varias proteínas involucradas en el metabolismo del glucógeno son sustratos de malina tales como, GS y PTG, (Vilchez *et al.*, 2007), GBE (Cheng *et al.*, 2007) y AMPK (Moreno *et al.*, 2010).

La observación de acumulaciones de glucógeno mal ramificado e hiperfosforilado en distintos tipos celulares definió a la enfermedad de Lafora como un tipo de patología en donde hay un desbalance en el metabolismo tal como ocurre en la enfermedad de Cori (mutación en GBE) o en la glucogenosis tipo V (déficit de la glucógeno fosforilasa). En base a esto se cree que la formación de estos poliglucosanos se debe al desbalance en las actividades de la GS y GBE, por lo tanto el complejo que se forma entre laforina y malina mantendría el equilibrio a este nivel. A partir de esto se propuso que laforina, que posee un dominio de unión a carbohidrato, actúa como una proteína de andamiaje reclutando a malina a la partícula de glucógeno para promover la degradación de GS y PTG y con ello inhibir la glucogénesis (figura 4C). Un reporte señala que AMPK fosforila a laforina y esto aumenta su asociación con malina estabilizando el complejo y la actividad de la enzima (Romá-Mateo *et al.*, 2011). Además, laforina ejerce su

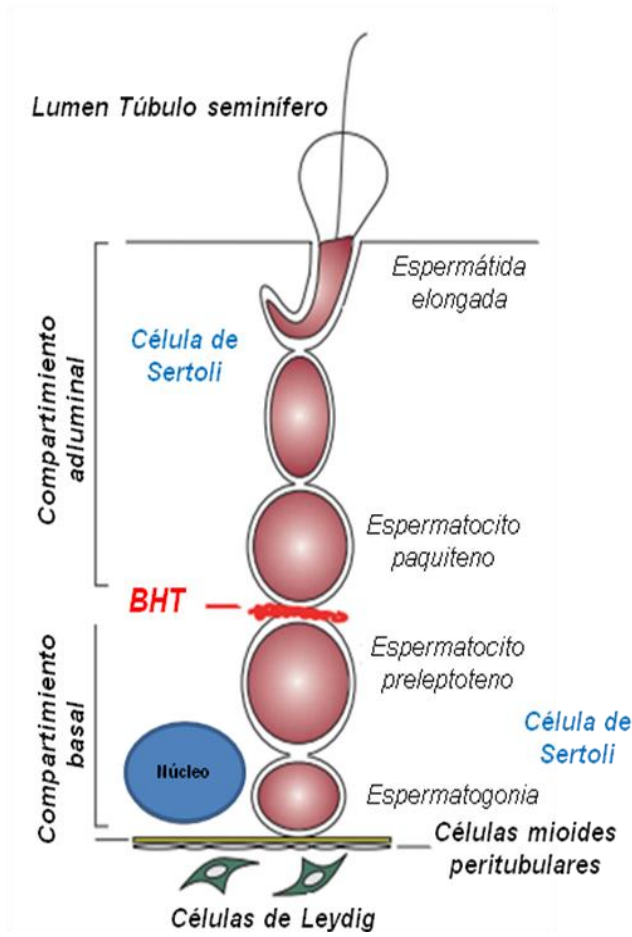
actividad fosfatasa sobre el glucógeno y cumple un importante rol regulatorio en la fosforilación (Worby *et al.*, 2006) y síntesis de éste (Lohi *et al.*, 2005). De acuerdo a distintos estudios acerca de LD se ha visto que la pérdida de laforina o malina impiden la degradación de PTG y GS llevando a la acumulación de glucógeno por la constante activación de la GS (Vilchez *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha descrito que la mutación G240S de laforina no afecta la actividad fosfatasa ni la unión a carbohidrato pero sí la interacción con PTG por lo que esta unión es crítica para la función de la enzima (Fernández-Sánchez *et al.*, 2003), mientras que la mutación W32G impide la unión al glucógeno y pierde la capacidad de desfosforilarlo lo que ya es suficiente para causar la enfermedad (Minassian *et al.*, 2000). En cuanto a malina, Cheng *et al.*, (2007) identificaron que GBE es sustrato de la enzima pero que el evento de ubiquitinación es independiente de laforina por lo tanto cualquier mutación que afecte la función de malina provoca el aumento de los niveles de GBE y con ello de su actividad. Cabe señalar que el rol regulatorio de malina-laforina no es sólo sobre el metabolismo de glucógeno puesto que se ha demostrado que forman un complejo con HSP70 (heat-shock protein 70) para contrarrestar la toxicidad de proteínas mal plegadas promoviendo la degradación vía proteosoma (Garyali *et al.*, 2009).

Hasta hace poco, la regulación de la síntesis y almacenamiento del glucógeno había sido descrita para tejido hepático y muscular principalmente poniendo énfasis en estudiar la modulación de la actividad de las enzimas que participan en dichos procesos. Recientemente con los estudios de la enfermedad de Lafora se descubrió un nuevo mecanismo de regulación que involucra la degradación de las

proteínas encargadas de la síntesis en tejidos poco convencionales como es el caso del nervioso, por ello cobra importancia el estudio del metabolismo en órganos que han sido poco estudiados como el tejido testicular en donde hay producción de glucógeno y variaciones en los niveles de éste.

Los testículos cumplen 2 funciones principales, la síntesis de testosterona que es la principal hormona masculina y la producción de espermatozoides. La testosterona es producida por las células de Leydig ubicadas en el compartimiento intersticial y es requerida para la proliferación y diferenciación de los espermatozoides, proceso conocido como espermatogénesis el cual se lleva a cabo en el epitelio del túbulo seminífero, conformado por células somáticas y germinales (figura 5). Las células germinales se ubican de acuerdo a sus diferentes estados de diferenciación en 4 a 8 capas desde la parte basal del epitelio hasta la parte adluminal (Stevens y Lowe, 1988) en el siguiente orden: espermatogonia, espermatocito pre-leptoténico y leptoténico, espermátida redonda, espermátida elongada y espermatozoide. Las células somáticas corresponden a las células de Sertoli que conforman la barrera hemato-testicular, una estructura que controla el paso de sustancias a la región luminal del túbulo seminífero. Se forma por complejas uniones especiales entre las células de Sertoli vecinas y dividen al epitelio en un compartimento basal que contiene las espermatogonias y los espermatocitos pre-leptoténicos y un compartimento adluminal, que contiene las fases más avanzadas de diferenciación de las células germinales. Estas células se caracterizan por su morfología irregular y columnar que les permite extenderse por todo el epitelio seminífero, interactúan entre ellas mediante uniones *gap* en la zona del lumen mientras que en la base del túbulo

A



B

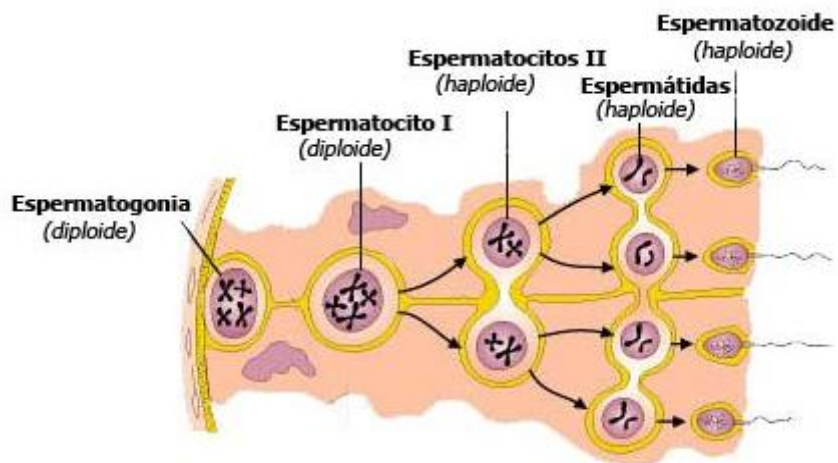


Figura 5: Epitelio seminífero. A) Esquema representativo del epitelio seminífero en mamífero. Las células de Sertoli se unen lateralmente mediante uniones ocluyentes impidiendo el libre paso de sustancias formando la barrera hemato-testicular que divide al túbulo seminífero en un compartimiento basal y adluminal. El compartimiento basal comprende el espacio intersticial y los espacios ocupados por las espermatogonias mientras que el adluminal contiene espermatocitos, espermatidas y espermatozoides y se extiende hacia el lumen del túbulo (Adaptado de Cheng *et al.*, 2010). B) Esquema que representa el proceso de espermatogénesis en el epitelio seminífero. La primera etapa es la proliferación de las espermatogonias mediante mitosis sucesivas y la última división da origen a los espermatocitos I los que entran a meiosis para dar lugar a los espermatocitos II, posteriormente se diferencian a espermatidas las que alcanzan la maduración completa al término de la meiosis convirtiéndose en espermatozoides (<http://preujct.cl/biologia/curtis/libro/c50a.htm>).

donde conforman la barrera forman uniones oclusivas, además interactúan directamente con las células germinales (Wong *et al.*, 1983, Weber *et al.*, 1983) por lo que su función está estrechamente relacionada con la espermatogénesis ya que la barrera hemato-testicular (BHT) crea un microambiente estéril que impide el contacto directo con el torrente sanguíneo lo que la hace ser además una barrera inmunológica, proveen soporte estructural y mecánico, ayudan en el movimiento de las células germinales a lo largo del proceso, fagocitan los fragmentos citoplasmáticos o cuerpos residuales que son liberados por las células que se van diferenciando y también células germinales que se van degenerando durante la espermatogénesis (Clermont *et al.*, 1987). Adicionalmente, las células de Sertoli son un importante soporte nutricional ya que la acción combinada de FSH y testosterona estimula la secreción de una gran variedad de moléculas necesarias para la supervivencia y desarrollo de las células germinales tales como, factores de crecimiento autocrinos y paracrinos, proteína ligadora de andrógeno, proteasas, componentes de la matriz extracelular, transferrina, glucosa, lactato, entre otros. A su vez provee nutrientes que se sintetizan en el exterior del túbulo y que llegan al epitelio de éste al traspasar la BHT, estos incluyen aminoácidos, carbohidratos, lípidos, vitaminas e iones metálicos y también a las células que se encuentran en el intersticio, como las células de Leydig, miodes y macrófagos (Mruk y Cheng, 2004).

La presencia de los transportadores de glucosa GLUT 1, 2, 3 y 4 en las células de Sertoli (Angulo *et al.*, 2008) permiten la captación de glucosa desde el exterior de la BHT y favorece la transferencia de energía hacia las células germinales en desarrollo. Sin embargo, se observó que a pesar de que la mayoría de la glucosa entra a la vía de la glicólisis un muy bajo porcentaje ingresa al ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa ya que cerca de un 75% de ésta es convertida a lactato (Robinson y Fritz, 1981). No obstante, estas células también sintetizan glucógeno cuya concentración varía dependiendo del desarrollo, lo que comprueba que la célula de Sertoli contribuye a mantener el correcto proceso espermatogénico. De acuerdo a lo observado, el glucógeno testicular se encuentra mayoritariamente en el túbulo seminífero con una distribución no uniforme y que varía de acuerdo al grado de madurez del epitelio seminífero (Gierke, 1937). El glucógeno intra-tubular es abundante en la pre-pubertad luego disminuye drásticamente al comienzo de la pubertad y reaparece durante el periodo de madurez sexual (Fabbrini *et al.*, 1969) además, el nivel de glucógeno muestra un comportamiento cíclico durante la espermatogénesis (Re *et al.*, 1973). La actividad de la glucógeno fosforilasa se relaciona con lo anterior ya que durante la etapa de pre-pubertad la actividad es baja, aumenta al llegar a la pubertad (Seilicovich y Lloret *et al.*, 1973) y se incrementa aun más durante la espermatogénesis (Mangan y Mainwaring, 1972) mientras que durante el desarrollo fetal la actividad de la fosforilasa es muy baja y no varía. En cambio, GS sufre un incremento gradual en su actividad en la etapa fetal observándose un *peak* entre las 17-20 semanas de gestación y luego disminuye considerablemente hasta la madurez sexual donde los niveles de glucógeno aumentan, esto se debe a que es en la pubertad donde se retoma la

diferenciación de las células germinales, hay síntesis de ADN y para ello se requiere de una fuente de energía disponible es decir, el metabolismo del glucógeno está constantemente activo (Datta *et al.*, 1988). Tomando en cuenta el rol de las células de Sertoli como soporte estructural y energético en el proceso espermatogénico, la acumulación de glucógeno puede ser un determinante crítico para el correcto desarrollo de este proceso por lo que el estudio de la regulación del metabolismo cobra importancia.

Aunque el metabolismo del glucógeno en la célula de Sertoli y en el epitelio seminífero ha sido estudiado hace décadas la información es insuficiente para comprender como se regula su homeostasis y cuál sería el rol central de ésta ya que el metabolismo energético de estas células no es solo para la mantención de sí misma sino que, como se explicó anteriormente, para la espermatogénesis. Por otro lado teniendo en cuenta la similitud estructural entre el tejido cerebral y testicular, esto es astrocito-célula neuronal y célula de Sertoli-célula germinal respectivamente y, de acuerdo a los recientes hallazgos de una nueva regulación del metabolismo del glucógeno por el complejo malina-laforina en varios tejidos entre ellos el cerebral surge la idea de que este tipo de regulación está presente en el túbulo seminífero cumpliendo un rol fundamental en la variación de los niveles de glucógeno desde la etapa fetal hasta la adultez.

En base a lo anterior se planteó la siguiente hipótesis: **Malina y laforina se expresan en células del epitelio seminífero e interactúan con glucógeno sintasa, sugiriendo un rol regulatorio en el metabolismo del glucógeno testicular.**

De acuerdo a lo anterior los objetivos específicos son los siguientes:

1. Determinar la presencia de glucógeno sintasa, laforina y malina en la línea celular Sertoli 42GPA9 y GC-1.
2. Evaluar la interacción y localización de estas proteínas en células de Sertoli 42GPA9, GC-1 y en distintos tejidos de rata adulta.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

De **Sigma Chemical Co. (USA)** se obtuvieron los siguientes reactivos: azul de Coomassie G-250, Histochoice (fijador de tejido), Tritón X-100, rojo fenol, solución de colágeno tipo I de cola de rata.

De **Merck & Co, Inc. (Alemania)** se obtuvieron los siguientes reactivos: PopCulture GST-Mag Purification Kit, ácido clorhídrico, cloruro de potasio, alcohol metílico, alcohol etílico, fosfato diácido de sodio, fosfato dihidrógeno de potasio, acrilamida, bisacrilamida, alcohol isopropílico, cloroformo, hidróxido de sodio, agar-agar.

De **MObio laboratories Inc (USA)** se obtuvo medio de cultivo LB.

De **Winkler Ltda. (Chile)** se adquirió albúmina de suero de bovino (BSA), glicina, Tris base, carbonato de sodio, dodecilsulfato de sodio (SDS), persulfato de amonio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, reactivo de Bradford, agua ultra pura libre de nucleasas.

De **Gibco-BRL Laboratorios Life Technologies, Inc. (USA)** se adquirió tripsina, EDTA, penicilina/estreptomicina/fungizona.

De **Promega Co. (USA)**, se adquirió la enzima transcriptasa reversa M-MLV, los dNTP`s, la enzima GoTaq polimerasa, estándar de DNA 100bp.

De **Lonza Group Ltda, (Suiza)**, se obtuvo Agarosa Seakem.

De **OMEGA Bio-Tek Inc, (USA)**, se obtuvo RNASo/v.

De **Hyclone (USA)**, se obtuvo medio de cultivo Dulbecco's Eagle modificado enriquecido con F-12 (DMEM-F12) y suero fetal bovino (FBS).

De **Santa Cruz Biotechnology (USA)**, se obtuvo anti β - actina (sc-81178), anti PP1 (sc-6108), anti malina (sc-67360), anti laforina (sc-70293), anti MGS (sc-81173).

De **INVITROGEN Corporation (USA)**, se obtuvo anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a Alexa Fluor 568, anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488, anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 633, y medio de montaje para fluorescencia.

De **Pierce Biotechnology, Inc. (USA)** se adquirieron los anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra, anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa, reactivo ECL para quimioluminiscencia y cocktail de inhibidores de proteasas 100X.

De **MBI Fermentas (USA)**, fue obtenido el estándar de peso molecular pre-teñido para geles de poliacrilamida-SDS.

De **bioWORLD (USA)**, se adquirió TEMED.

De **Calbiochem, EMD Chemicals Inc (USA)**, se adquirió Tween-20 y β -mercaptoetanol.

De **New England Biolabs Inc (USA)**, se adquirió Amylose magnetic beads.

De **Cell Signaling Technology Inc (USA)**, se obtuvo el anticuerpo primario anti glucógeno sintasa total (#3886).

3.2 Material biológico.

Para la obtención de tejido muscular, cerebral y testicular se utilizaron ratas y ratones obtenidos del Instituto de Fisiología, Histología e Inmunología de la Universidad Austral de Chile, donde son mantenidos según las normas vigentes. Estos animales de experimentación son anestesiados con cloroformo y sacrificados por decapitación, según las medidas de bioseguridad del “Manual de Normas de Bioseguridad” de CONICYT de 2008. Los restos animales son cremados en el incinerador del Fundo Teja Norte de la Universidad Austral de Chile, donde se descartan los desechos biológicos de acuerdo al Manual de Procedimiento para el Manejo de Residuos de la UACH.

3.3 Instrumentos.

Los equipos utilizados fueron los siguientes: magnaRack Invitrogen, pHmetro Inolab WTW pH 720 Autocal, balanza Precisa AND GR-200, balanza Sartorius TE4101, centrífuga Sigma 2-16PK, centrífuga Sigma 1-14, centrífuga Eppendorf minispin, incubador para cultivo NuairéTMDH Autoflow, gabinete de seguridad biológica NuairéTM Class II UN-425-600-E, microscopio confocal OLYMPUS Fluoview FV1000, microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX 50 con cámara OLYMPUS U-TV0 5XC-3, microscopio invertido OLYMPUS CKX41, fuente de poder EPS 250 de Scientific Company, Espectrofotómetro de arreglo de diodos Agilent 8453 agitador magnético IKAMAGR RCT, sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 Cole Parmer Instruments Co. espectrofotómetro Agilent 8453, Thermo Nanodrop 2000, PCR en tiempo real ABI Prism7700, sistema de

electroforesis y transferencia Mini ProteanR Tri-Carb 1600 TR, agitador orbital Lab-Line, baño termorregulado Haake D8, freezer a -70°C Foma Scientific Bio-freezer 8425, freezer a -20°C Consul, refrigerador Fensa y Whirlpool.

3.4 Métodos.

3.4.1 Cultivo de células de Sertoli 42GPA9 y GC-1.

Las células se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado con FBS (suero bovino fetal) al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50mg/ml y fungizona 50 ng/ml a 37°C y CO_2 al 5 % (Bourdon et al., 1998; Lablack et al., 1998; Bourdon et al., 1999).

3.4.2 Extracción de RNA.

Se obtuvo RNA total de células en cultivo mediante un método equivalente al de Trizol, utilizando RNA-Solv. Se homogeneizaron $5-10 \times 10^6$ células en 1ml de reactivo y se transfirieron a un tubo nuevo, se agregó 0,2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos en vortex, inmediatamente se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó la muestra a $12000 \times g$ por 15 minutos a 4°C , obteniéndose tres fases. Posteriormente el 80% de fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el RNA con 0,5 mL de isopropanol dejando reposar 20 minutos, luego el RNA fue centrifugado a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4°C y se lavó con 1 ml de etanol 80% en vortex, posteriormente se centrifugó a $7500 \times g$ por 5 minutos y se retiró el etanol, se dejó secar por 5 minutos y se resuspendió en $30\mu\text{l}$ de agua ultra pura libre de nucleasas. Se determinó la concentración del RNA midiendo absorbancia a 260 nm usando la relación de una unidad de absorbancia

corresponde a 40µg/ml de RNA. A las muestras obtenidas se les determinó la relación de absorbancia 260 nm/280 nm, encontrándose todas dentro del rango de 1,9-2,0.

3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT- PCR)

Para la transcripción reversa se preparó una mezcla consistente en 4 µg de RNA, 1 µl de starter-RT 5 µM (oligo-dT) y agua libre de nucleasas para completar 35,5 µl, la que se incubó a 70°C por 5 minutos para finalmente dejarla en hielo. Paralelamente se preparó una segunda mezcla que contenía 10 µl de tampón RT 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM, pH 8,3), 4 µl de dNTP's 10 mM, 0,7 µl de enzima transcriptasa reversa M-MLV (200 U/µl), se juntaron ambas mezclas y se incubaron a 42°C por 1 hora. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento en ausencia de la enzima transcriptasa reversa para descartar la presencia de contaminación con DNA.

Para la reacción de amplificación, se utilizaron partidores diseñados para amplificar segmentos internos de MGS, LGS, laforina y malina.

Para controlar la integridad de los cDNAs, se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando partidores diseñados para amplificar el gen que codifica para β-actina. En todos los casos, se preparó la mezcla de reacción conteniendo en todos los casos: 2,5 µl de tampón green 5X, 1,25 µl de MgCl₂ 25 mM (tampón y MgCl₂, suministrado con la enzima), 0,25 µl de dNTP's 10 mM, 5,3 µl de agua libre de nucleasas, 1,3 µl de cada partidor 10 µM, 1 µl de templado y finalmente

0,1 µl de enzima GoTaq (5 U/µl), generando un volumen final de 13 µl. Se utilizaron 1 par de partidores para MGS, LGS, laforina y malina. El programa de amplificación en el termociclador consistió en una primera etapa de denaturación a 94° C por 5 min, con 35 ciclos de 94° C 45 seg, 60° C 45 seg y 72° C 2 min y finalmente 72° C 10 min. Como control negativo de la reacción de PCR fue llevada a cabo la misma reacción pero en ausencia de templado.

Para la amplificación MGS y LGS se usaron los partidores descritos en Vilchez *et al.*, (2007). Mientras que para laforina y malina se utilizaron partidores sintetizados en nuestro laboratorio (Villarroel-Espíndola *et al.*, (2012) J Cell Physiol, en revisión)

3.4.4 Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.

RNA total fue extraído de testículos de ratón empleando el sistema comercial Trizol® (Invitrogen) y posterior re-purificación para aumentar la pureza de los RNAs recuperados mediante *RNAeasy* (Qiagen), en ambos casos se siguió las recomendaciones del fabricante. Los RNAs fueron cuantificados espectrofotométricamente en *Nanodrop* y ajustados a una concentración de 1ug/ul con agua libre de nucleasas. Las muestras de RNA fueron sometidas a retrotranscripción, para lo que se utilizó 6 ug de RNA total y hexámeros degenerados, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor.

Los análisis de expresión en tiempo real (PCR), se realizaron en el equipo ABI Prism7700 Detection System y siguiendo los protocolos descritos para ready-made TaqMan primer (Applied Biosystems, #Mm00472712_m1 para GYS1).

Cada muestra fue analizada en triplicado usando 100 ng de cDNA total en cada caso. La reacción de PCR se desarrolló con el siguiente perfil: 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C. Los datos obtenidos fueron analizados con el método comparativo $2\Delta\Delta C_t$, usando como controles internos el RNA ribosomal 18S y GAPDH (Applied Biosystems, #Hs99999901_s1 y #Mm03302249_g1, respectivamente).

3.4.5 Transformación, expresión y purificación de proteína recombinante.

Las bacterias competentes E.coli BL-21E3 son transformadas con el vector pGST-Malin RING (donado gentilmente por el Dr. Guinovart) el cual corresponde a una proteína recombinante construida a partir del dominio RING de malina fusionado a GST. Se tomó 1ml de medio LB con bacterias y se le agregó 2µl de constructo, se incubó 20 minutos a 4°C luego se realizó *shock* térmico por 1 minuto a 45°C, posteriormente se incubó 1 hora a 37°C en rotación y se tomaron 20 µl para sembrar en placas de agar-LB con ampicilina 100 µg/ml. Al día siguiente de la placa se tomó una colonia y se dejó creciendo en 5 ml de LB hasta alcanzar una OD de 0,6 - 0,8 determinada a partir de la lectura de absorbancia a 600 nm. Luego, se tomaron 2 ml del inóculo y con ello se realizó el proceso de purificación, el cual consiste en: Primero se debió centrifugar a 1500 xg por 5 minutos, se elimina el sobrenadante (SN) y el pellet se resuspendió con 1 *up/down* en 300 µl de tampón E1 (50mM TrisHCl pH 8 + 10mM EDTA + 100 ug/ml RNAsa A) a continuación se agregaron 300 µl de tampón E2 (200mM NaOH + 1%p/v SDS) se mezclaron por inversión y se incubaron 5 minutos a T° ambiente luego se agregaron 300 µl del tampón E3, se mezclaron y se centrifugaron a 15000 xg por

10 minutos. El SN se recuperó en un tubo nuevo y se agregaron 630 μ l de isopropanol, se mezclaron por inversión, se centrifugó por 10 minutos a 15000 xg y se eliminó el SN. El precipitado se lavó con 400 μ l de etanol 70% y se centrifugó 10 minutos a 15000 xg, se eliminó el SN y se esperó a que el precipitado se seque para luego resuspenderlo en 20 μ l de agua libre de nucleasas. Finalmente se determinó la concentración del DNA midiendo la absorbancia a 260 nm y se les determinó la relación de absorbancia 260 nm/280 nm, encontrándose dentro del rango de 1,8-2,0.

Para visualizar la presencia del DNA plasmidial se preparó un gel de agarosa al 1% (0,3 g agarosa, 2 μ l Syber Safe, 3 ml TBE 10X y 27 ml agua destilada), se agrega tampón TAE 1X a la cámara y se cargó 5 μ l de muestra + 2 μ l de tampón de carga 6x además de incluir un estándar. Para la corrida del gel se aplicó una intensidad de corriente de 100 mA por 30 minutos aproximadamente. Se observaron 2 bandas, una que corresponde al DNA bacteriano y otra al DNA plasmidial.

3.4.6 Preparación de stock GST-Malin RING en glicerol.

Al comprobar la presencia del plasmidio en el inóculo se tomó de éste 0,7 ml y se centrifugó a 1500 xg por 3 minutos. A la fracción del SN se le añaden 0,3 ml de glicerol 60%, se guardó inmediatamente a -20°C y al otro día se almacenó a -80°C indefinidamente.

3.4.7 Sobreexpresión de GST-Malin RING con IPTG.

En un matraz de 100 ml se añadieron 25ml de LB con ampicilina 100 µg/ml y se agregó un asa de GST-Malin RING desde el *stock* en glicerol. Se dejó en agitación constante (3xg) a 37°C toda la noche. Al otro día se midió la absorbancia a 600 nm la cual debe ser mayor a 2,0 OD si es así, a continuación en un matraz de 500 ml se agregaron 250 ml de LB con ampicilina 100 µg/ml y se añaden 2,5 ml del inóculo y se incubó a 37°C hasta alcanzar 0,6 OD aproximadamente. Posteriormente, se tomaron 50 ml y se indujo la expresión con IPTG (Isopropyl-D-thiogalactoside) a una concentración de 1mM por 1 hora y media a 37°C en agitación constante (200 rpm). Luego de la inducción se centrifugó a 5500 xg 30 minutos a 4°C, se eliminó el SN y al precipitado se le agregó 2ml de tampón de lisis que contiene 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0,15M NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Tritón X-100 y 1mM PMSF y se incubó por media hora. Se sonicó en hielo 5 veces por 10 segundos y se centrifugó a 5500xg por 30 minutos a 4°C, se rescató el SN que es la fracción que contiene las proteínas y se almacena a -20°C hasta su cuantificación mediante el método de Bradford.

3.4.8 Extracción de proteínas a partir de células.

Las células en cultivo previamente lavadas con PBS 0,1M (pH 7,4) fueron despegadas de las placas de cultivo utilizando tripsina-EDTA 0,25% (p/v). El sedimento celular fue resuspendido en un tampón de extracción que contiene 10mM Tris-HCl pH 7.0, 15 mM EDTA, 150mM NaF, 600mM sacarosa, 1mM PMSF, ortovanadato de sodio y β-mercaptoetanol, se incubó por 5 minutos y luego

se sonicó 2 veces durante 10 segundos en hielo hasta disgregar completamente. Los homogeneizados fueron centrifugados a 10.000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue rescatado y cuantificado mediante el método de Bradford.

3.4.9 Extracción de proteínas a partir de tejido.

En un tubo de 5 ml se deposita el tejido y se agrega tampón de extracción de proteínas. Con el Ultraturrax para homogenizar el tejido, posteriormente se sonicó la muestra y se vortexeó. La muestra quedó lista para ser cuantificada.

3.4.10 Cuantificación de proteínas totales.

Las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bradford et al. 1976). Se construyó una curva de calibración entre 0 y 15 µg de proteína en un volumen final de 50 µl. Se utilizó como estándar BSA (1,45 µg/µl) diluido en agua destilada. Para todas las lecturas se utilizó un blanco de agua destilada, la misma usada para las diluciones. Se adicionó a cada tubo de la curva 950 µl del reactivo de Bradford 1x (0.01% azul de Coomassie G, 4.75% etanol, 8.5% ácido fosfórico) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para la cuantificación de las muestras se tomó una alícuota de 1 µl de cada una y se diluyó hasta completar un volumen final de 50 µl. En seguida se adicionó 950 µl de reactivo de Bradford 1x.

3.4.11 GST- pull down.

El ensayo de GST-*pull down* se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual del kit. Las GST *mag-agarose beads* tienen una capacidad de unión de 2 mg

proteínas / 1ml de esferas y éstas vienen en una mezcla en la cual el 50% corresponde a las esferas acopladas con glutatión en un tampón 0,05M fosfato, 0,15M NaCl y 0,1% NaN₃. El primer paso fue mezclar la botella por inversión hasta que esté completamente suspendido, se tomaron 250 µl de esta mezcla, se pusieron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y el tubo se puso en el bastidor (las esferas quedaron retenidas a un lado del tubo por la presencia de imanes en el bastidor). Se removió el SN y se lavó 3 veces con 4 volúmenes (1 volumen es igual a la mitad del volumen de la mezcla de esferas; en este caso 1 volumen es igual a 125 µl) de tampón GST bind/wash 1X que contiene 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄ y 1,37mM NaCl a pH 7.3. Las esferas se resuspendieron en 1volumen de tampón GST bind/wash 1X para hacer una mezcla del 50% y se agregó el extracto celular que contiene la proteína sobreexpresada, GST-Malin RING y para todos los casos se tomó un volumen que corresponde a 250 µg de proteína total, se mezcló por inversión varias veces y se incubó 30 minutos en agitación constante a T°ambiente. A continuación se puso el tubo en el bastidor para recolectar el SN, fracción que corresponde a aquellas proteínas que no se unieron a las esferas, luego se lavó 3 veces con 8 volúmenes de tampón GST bind/wash 1X. Posteriormente, se agregaron 125 µl de GST bind/wash 1X para volver a un volumen de 250 µl que corresponde a las esferas unidas a GST-Malin RING. Para estudiar la interacción de proteínas con GST-Malin RING se tomó un volumen que corresponda a 500 µg de proteína total del extracto proteico deseado y se incubó toda la noche en constante agitación a 4°C. Al otro día se puso el tubo en el bastidor y se rescató el SN, luego las esferas se lavaron 3 veces con 8 volúmenes de tampón GST bind/wash 1X (en cada lavado se pone el tubo en el

bastidor) y se recolectaron las fracciones. Finalmente se eluyó la proteína con 100 μ l de tampón de carga 5X (Laemmli) (0,5 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 6.8), 0,5 ml 2-mercaptoetanol 2%, 1 ml SDS 10%, 1 ml glicerol 100%, 0,1ml azul bromofenol 1%, 4ml agua destilada) y se colectó la fracción.

3.4.12 Amilosa *pull down*.

El protocolo usado es el descrito por New England Biolabs. El primer paso fué vortexear para suspender las esferas luego se toma una alícuota de 100 μ l en un tubo limpio y se lavó 2 veces con 500 μ l de MBP column binding tampón a pH 7.4 (200mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM DTT), en cada lavado el tubo se puso en el bastidor que retiene las esferas en la pared del tubo (éstas vienen acopladas a partículas magnéticas) y el SN se eliminó. A continuación se agregaron 200 μ l del extracto proteico, se mezcló e incubó a 4°C por 1 hora en constante agitación. Luego se puso en el bastidor, se rescató el SN y las esferas se lavaron 3 veces con MBP column binding tampón guardando cada fracción. Después del último lavado se agregó 50 μ l de MBP *column binding* tampón conteniendo 50mM de maltosa (tampón de elución) y se incubó en agitación por 15 minutos a 4°C, posteriormente el tubo se puso en el bastidor y se rescató el SN, se repitió una vez más el paso de elución y ambos SN se mezclaron.

3.4.13 Inmunocitoquímica.

Las células de Sertoli 42GPA9, GC-1 fueron cultivadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio (12mm), previamente tratados con colágeno, para luego ser fijadas con Histochoice:etanol (4:1) durante 15 minutos. Después de dos lavados

de 5 minutos cada uno con PBS 0,1 M (pH 7.4) se permeabilizó con una solución de PBS 0,1M con Tween-20 al 0,1% y se bloqueó con una solución de bloqueo que contiene 5% BSA, 0,1% Tween-20, en PBS 0,1 M por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Luego, para la incubación con los anticuerpos primarios anti-MGS, anti-malina, anti-laforina, anti-PP1 se utilizaron diluciones de 1:50 en solución de bloqueo. Se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al otro día, se lava tres veces por 5 minutos con PBS 0,1 M, Tween-20 0,1%. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de conejo conjugado a Alexa fluor 488, anti-IgG de cabra conjugado a Alexa fluor 568 y anti-IgG de ratón conjugado con Alexa fluor 633 en una dilución 1:200 en solución de bloqueo, se incubó durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS 0,1 M con Tween-20 al 0,1%. Las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia DAKO y visualizadas utilizando un microscopio confocal invertido.

3.4.14 Separación electroforética de proteínas

Las muestras de proteínas fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10%. El gel separador y el espaciador se prepararon a partir de una solución de Acrilamida:Bisacrilamida 30:0,8%. El gel separador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 10% conteniendo Tris (pH 8,8) 375 mM; SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,03%. Mientras que el gel espaciador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 3,8% incluyendo Tris 125 mM (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,01% persulfato de amonio y 0,04%

TEMED. Se tomaron muestras de proteínas de 30µg a 70 µg y se les agregó tampón de carga 5X a cada una y se calentaron a 95°C por 5 minutos. Las muestras fueron cargadas en el gel realizándose la electroforesis a 100V por 1 hora y media aproximadamente en tampón de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8.3). Luego de la corrida se realizó la transferencia de proteínas en membranas de PVDF o la tinción del gel con azul de Coomasie 0,3% en 50% metanol, 10% ácido acético y agua durante una hora y luego desteñido en una solución que contenía 30% de metanol y 10% de ácido acético.

3.4.15 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Finalizada la electroforesis, las muestras se electrotransferieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno; 0,45 micrones de poro, 100-145 µm de espesor). Sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, metanol 20%, pH 8.3) se depositó secuencialmente: un trozo de papel de filtro (Whatman n°1), la membrana de PVDF (previa activación de la membrana en metanol por 30 segundos), el gel a transferir, otro papel de filtro y luego otra esponja embebida en el misma tampón. Esto se colocó en una cámara de electrotransferencia conteniendo el tampón mencionado y se aplicó una intensidad de corriente de 400 mA por 1 hora. Una vez cumplido el tiempo la membrana se dejó secar a temperatura ambiente.

3.4.16 Análisis de Western blot

Para los experimentos de Western blot, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios de interés, anti MGS 1:1000, anti PP1 1:1000, anti malina 1:1000 y anti laforina 1:250 en solución bloqueo (BSA 5%, Tween-20 0,1%, PBS 0,1M) durante toda la noche con agitación constante a 4°C. Finalizado este periodo, las membranas se lavaron tres veces por 15 minutos con PBS 0,1 M-Tween-20 0,1% y se incubaron con anti-IgG de ratón, cabra o de conejo (dependiendo del caso) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) 1:5000 en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS 0,1 M-Tween-20 0,1% y una vez con PBS 0,1 M. Las membranas son reveladas utilizando un método de quimioluminiscencia, el cual se basa en la emisión de luz no radiactiva detectando antígenos inmovilizados unidos directa o indirectamente con anticuerpos conjugados con HRP. Se vertió sobre las membranas una solución que contenía peróxido de hidrógeno y luminol. Luego de 1 minuto, la membrana fue expuesta durante 10 a 25 minutos en el equipo Ultralum donde fue tomada la fotografía.

4. Resultados

4.1. Identificación de la isoforma de glucógeno sintasa presente en testículo, células germinales y células de Sertoli 42GPA9.

Mediante RT-PCR se determinó en testículo completo (Figura 6A), células de Sertoli 42GPA9 (línea celular derivada de células de Sertoli de ratón adulto) y en células germinales aisladas (Figura 7A) la presencia del transcrito que corresponde a la isoforma muscular de la GS. En este ensayo además se comprobó que es la única isoforma presente ya que se utilizó como control tejido de músculo esquelético así como también partidores específicos para la isoforma hepática de la enzima.

La presencia de MGS en testículo completo y en la línea celular de Sertoli 42GPA9 fue demostrada por análisis de *Western blot*. Para este ensayo se utilizó un extracto de proteínas totales y se incubó con un anticuerpo específico de la isoforma muscular detectando una banda correspondiente a MGS (Figura 6B y 7B) al igual que en los controles positivos usados, extractos proteicos de músculo esquelético y cerebro. Usando los mismos anticuerpos se realizó una inmunofluorescencia para la detección de MGS en células de Sertoli 42GPA9 y GC-1 que fueron cultivadas en condiciones basales observando una marcada fluorescencia en todo el citoplasma y en menor grado en el núcleo en ambos tipos celulares (Figura 7C).

Estos resultados demuestran que la proteína es expresada y sintetizada en testículo, tanto en las células de Sertoli como en las germinales. Estas últimas se

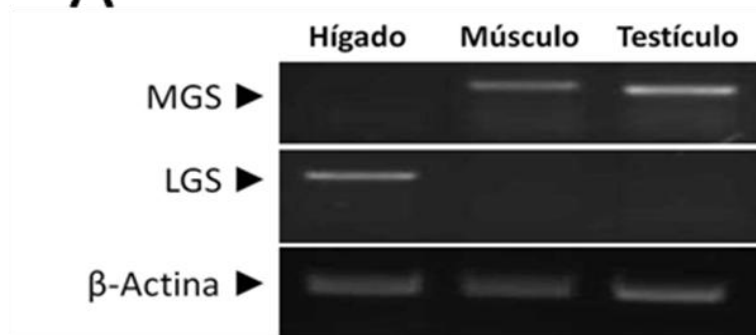
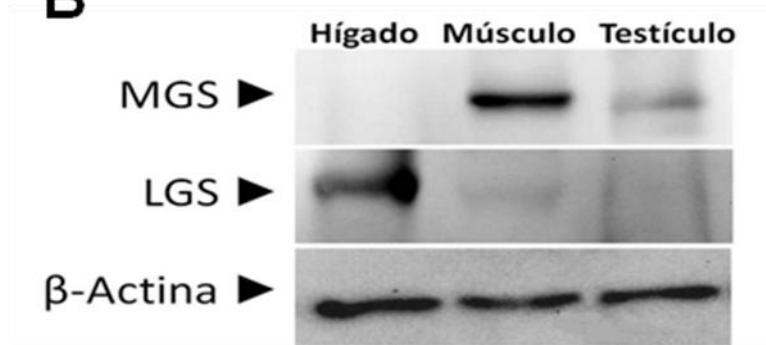
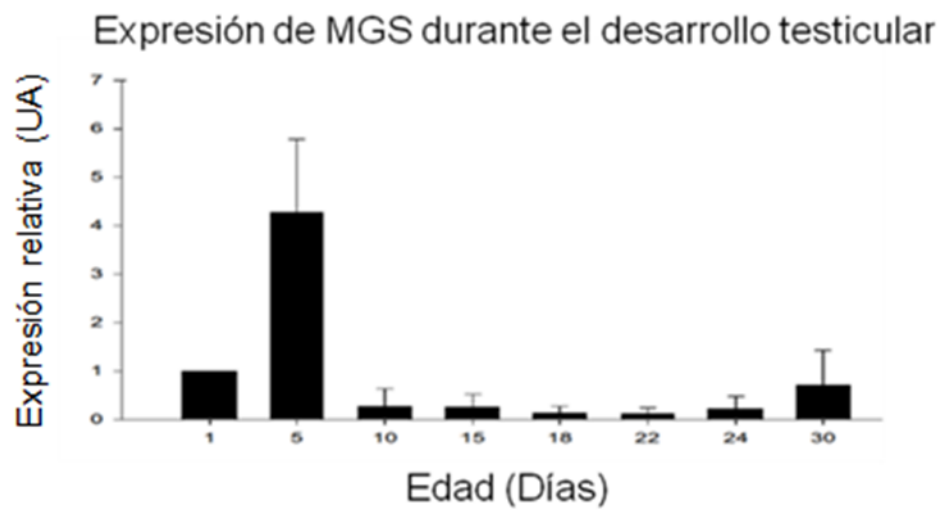
A**B****C**

Figura 6. Expresión de la isoforma muscular de glucógeno sintasa en testículo de ratón. **A)** Usando cDNA obtenido a partir de RNA extraído de testículo de ratón de 30 días de edad se evaluó por RT-PCR la expresión de la isoforma hepática (LGS) y muscular (MGS) de Glucógeno Sintasa. **B)** *Western blot* para la detección de la isoforma de Glucógeno Sintasa presente en testículo. Para ello se utilizó un extracto de proteínas totales de testículo de ratón adulto. Los carriles Hígado y Músculo corresponden a control positivo o negativo según corresponda. En RT-PCR y *Western blot* β -Actina fue usado como control de carga. **C)** Mediante cDNAs obtenidos de RNA extraídos de testículos de ratones de diferentes edades se realizó RT-PCR en tiempo real en el que se usaron partidores específicos para MGS.

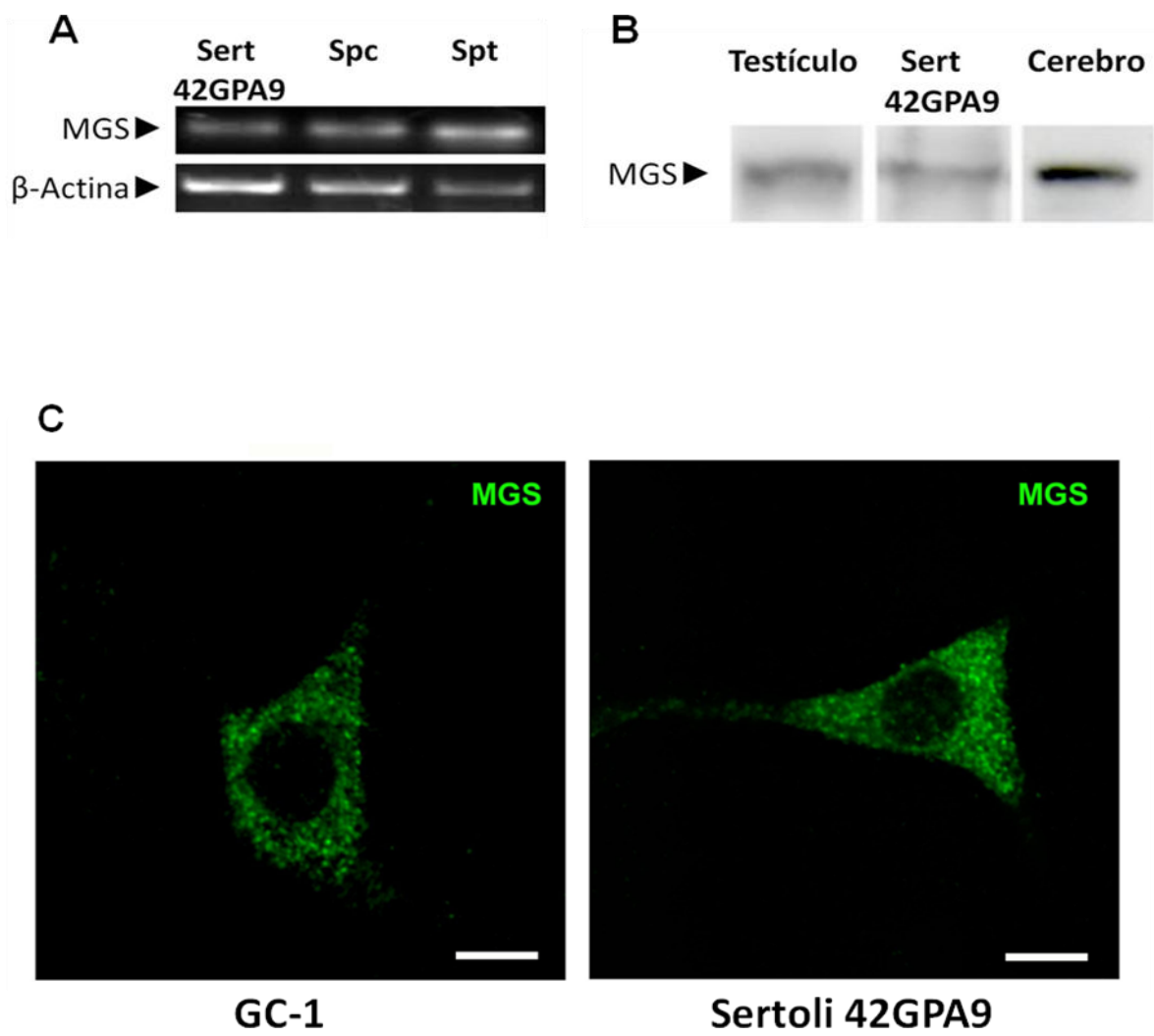


Figura 7. Expresión de la isoforma muscular de glucógeno sintasa en línea celular Sertoli 42GPA9. A) Mediante RT-PCR se evidenció la expresión de MGS en la línea celular Sertoli 42GPA9, espermatocito (Spc) y espermátida (Spt) aislados de tejido de rata. **B)** Detección de MGS a través de *Western blot* en testículo de rata y Sertoli 42GPA9. Como control se usó tejido de cerebro de rata. **C)** Inmunofluorescencia para analizar la presencia de MGS en la línea Sertoli 42 GPA9 y GC-1. Se utilizaron anticuerpos específicos contra la isoforma muscular MGS. Barra de magnificación: 10 μm .

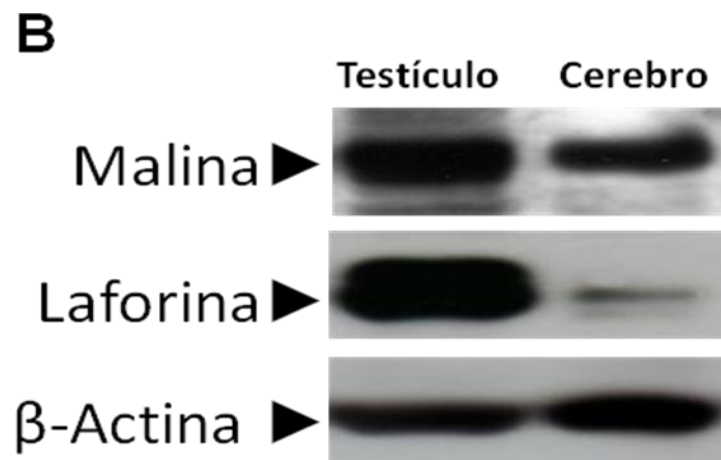
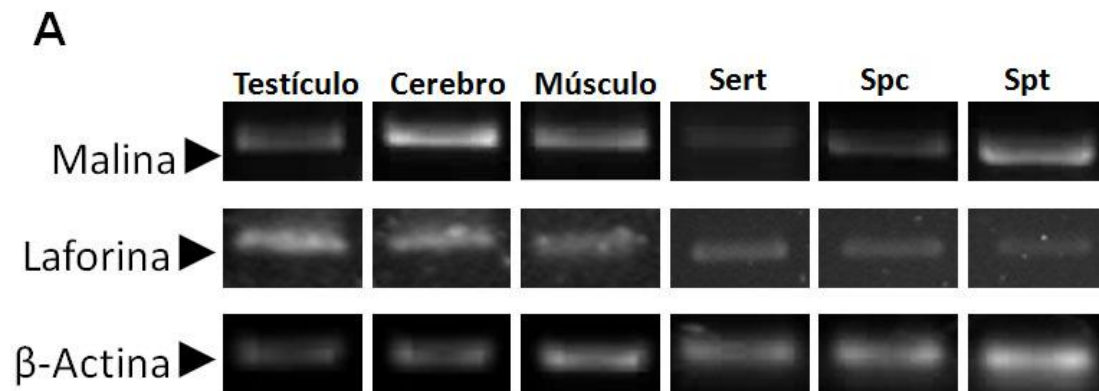
desarrollan y diferencian en el túbulo seminífero a medida que avanza el desarrollo testicular mientras que las células de Sertoli se presentan principalmente como células pre-Sertoli desde el nacimiento hasta la pubertad y posteriormente se diferencian a Sertoli madura. Por esta razón se estudió la expresión de MGS durante el desarrollo post-natal, entre el día 1 al 30. De acuerdo a la figura 6C se observa desde el día 1 la expresión del transcrito de la enzima la cual a esa edad corresponde a la producida en células pre-Sertoli. Al día 5 post-nacimiento hay un aumento considerable de la expresión lo que coincidiría con la aparición de las primeras células germinales inmaduras, las espermatogonias tipo A (Vergouwen *et al.*, 1991). Por lo tanto queda claro que MGS es expresada en el testículo desde el primer día de vida y que ambos tipos celulares que lo componen poseen la maquinaria para sintetizar la enzima.

4.2 Presencia de las proteínas malina y laforina en testículo, células germinales y células de Sertoli 42GPA9.

La detección de MGS en testículo y en las células principales que conforman el epitelio seminífero confirma que la maquinaria de síntesis de glucógeno está presente durante todo el desarrollo pero la regulación de dicho proceso es totalmente desconocida. De acuerdo a resultados previos de nuestro laboratorio, en células de Sertoli 42GPA9 no existen cambios en la localización de la enzima en ausencia de glucosa (20 horas de ayuno) o en altas concentraciones de ésta (17,5 mM glucosa) por lo que este tipo de regulación vista en otros tejidos (Cid *et al.*, 2005) (Fernández-Novell *et al.*, 1997) no está presente en las células somáticas del epitelio seminífero sugiriendo que la actividad de MGS podría estar siendo regulada por otros mecanismos. MGS es sensible a la fosforilación por GSK3 β siendo, al igual que la activación por la presencia del G6P los principales eventos regulatorios.

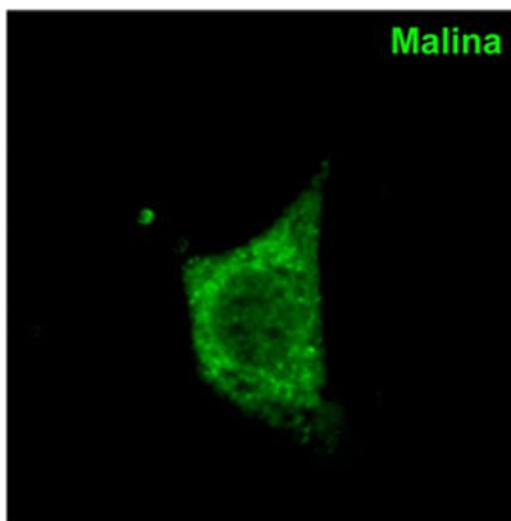
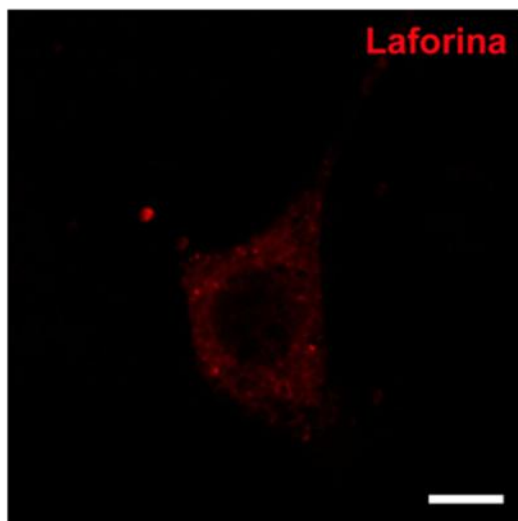
Se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación en el cual un complejo proteico formado por las proteínas malina y laforina producen la ubiquitinación y degradación proteosomal de GS y PTG en neuronas (Vilchez *et al.*, 2007).

Con el objeto de evaluar si este mecanismo está presente en testículo y en los tipos celulares que lo constituyen se analizó si estas proteínas se expresaban en el túbulo seminífero. Mediante RT-PCR se identificaron los transcritos de laforina y malina en testículo, células germinales aisladas y Sertoli 42GPA9 (Figura 8A), y mediante *Western blot* ambas proteínas fueron inmunodetectadas en testículo de ratón (Figura 8B). Paralelamente, se realizó una inmunofluorescencia (Figura 8C)



C

GC-1



Sertoli 42GPA9

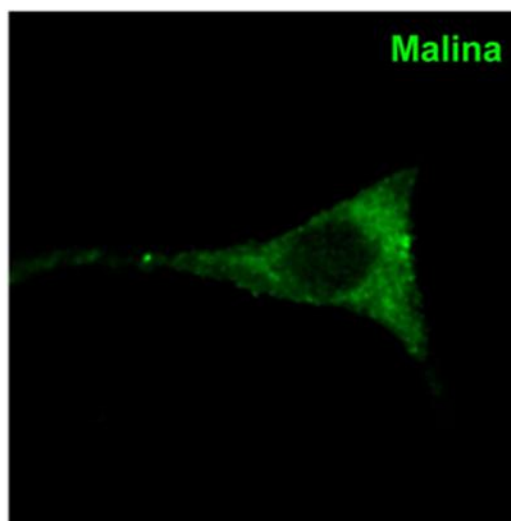
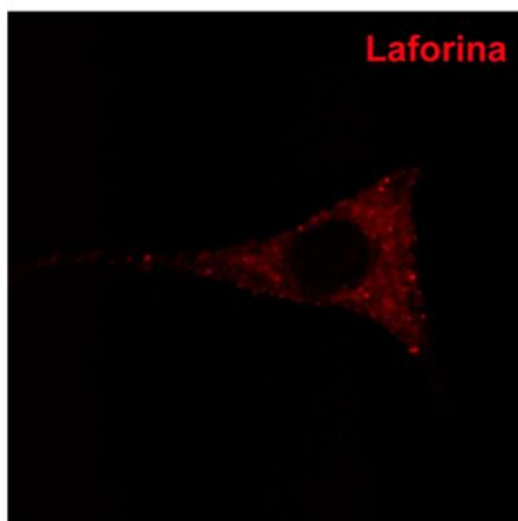


Figura 8. Expresión de las proteínas laforina y malina en testículo, células de Sertoli 42GPA9 y células germinales masculinas. Por RT-PCR **(A)** se demostró la expresión de laforina y malina en testículo de ratón, células de Sertoli (Sert), espermatozoides (Spc) y espermátida (Spt). **B)** Por medio de análisis de *Western blot* se detectó laforina y malina en testículo de ratón. Como control se usó tejido de músculo esquelético y cerebro. **C)** La presencia y distribución subcelular de las proteínas se analizó mediante inmunofluorescencia en células germinales GC-1 y células de Sertoli de la línea 42GPA9. Barra de magnificación: 10 μm .

que muestra la presencia de laforina y malina en la línea celular GC-1 y Sertoli 42GPA9. En ambos tipos celulares laforina tiene una distribución citoplasmática uniforme con la formación de gránulos mientras que malina se observa tanto en núcleo como en citoplasma.

En base a estos resultados se concluye que ambas proteínas son expresadas y sintetizadas en el epitelio seminífero lo que sugiere que en testículo de ratón (y quizás en otros mamíferos) la síntesis y almacenamiento de glucógeno serían procesos regulados por el complejo malina-laforina tal como ocurre en tejido cerebral.

4.3 Co-localización de MGS, laforina, malina y PP1 en células de Sertoli 42GPA9 y germinales GC-1.

Tras los hallazgos de la expresión y síntesis de laforina y malina en testículo y en las células que lo componen surge la interrogante de que el mecanismo de regulación que ejercen ambas proteínas cuando interactúan puede estar presente en el órgano sexual masculino. Estudios anteriores en otros modelos celulares han indicado que laforina, que posee un sitio de unión a carbohidrato, actúa como proteína de andamiaje permitiendo que el complejo se ancle a la partícula de glucógeno y envíe a degradación a GS y PTG. Por ello fue importantísimo determinar si es que en el epitelio seminífero existe algún tipo de interacción entre malina y laforina y a su vez de estas con proteínas que participan en el proceso de glucogénesis, para así proponer un probable rol regulatorio del complejo en este órgano.

Un método que sugiere la posible interacción entre proteínas son los estudios de co-localización mediante la técnica de inmunofluorescencia en células utilizando anticuerpos específicos para las proteínas de interés, el cual demuestra el grado de cercanía que puede existir entre ellas pero no la interacción propiamente tal.

En este caso, se analizó si es que las proteínas en estudio co-localizan en condiciones normales de cultivo. Para ello se realizaron estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos fluorescentes en células GC-1 y Sertoli 42GPA9 utilizando anticuerpos específicos para detectar laforina, malina, GS y PP1. Es importante mencionar que hasta el momento no se ha descrito a PP1 como un blanco directo del complejo malina-laforina pero, como esta proteína se une a PTG y ésta sí interacciona con el glucógeno y con laforina sería un

mecanismo indirecto de detección de co-localización y posteriormente de interacción.

La figura 9A demuestra que malina y laforina co-localizan en GC-1 y Sertoli 42GPA9 observando gránulos aislados en el citoplasma. Por otra parte, en células de Sertoli se vió que MGS con laforina y MGS con malina co-localizan en mayor medida al compararla con GC-1. Cabe destacar que a pesar de que MGS, malina y en menor grado laforina se observan en el núcleo no se visualiza co-localización entre ellas en ninguno de los tres casos analizados.

De acuerdo a lo anterior, la co-localización triple de MGS, laforina y malina se observa de manera bastante significativa (Figura 9B) aunque no se puede establecer concretamente si ésta es mayor en células germinales o en las Sertoli, pero permite asociar esta co-localización múltiple con el rol que podría cumplir laforina y malina sobre MGS.

Con el mismo objetivo, se realizó una inmunofluorescencia para analizar la ubicación subcelular de PP1 y el grado de cercanía entre ésta con MGS y malina. En la figura 10A se constata la presencia de PP1 en GC-1 y Sertoli 42GPA9 a lo largo de todo el citoplasma mientras que en las imágenes de la figura 10B se perciben gránulos que corresponden a la co-localización entre PP1 con MGS y PP1 con malina en ambos tipos celulares. Finalmente, la triple co-localización entre MGS, malina y PP1 resultó ser superior en las células de Sertoli (Figura 10C).

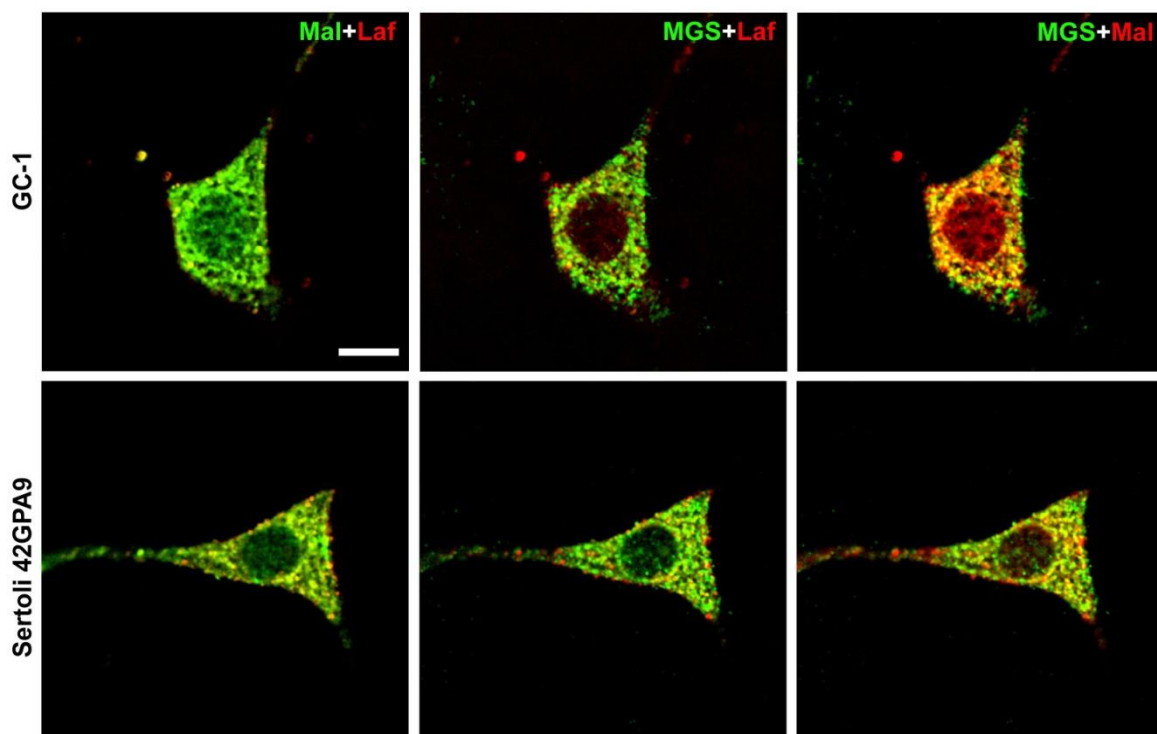
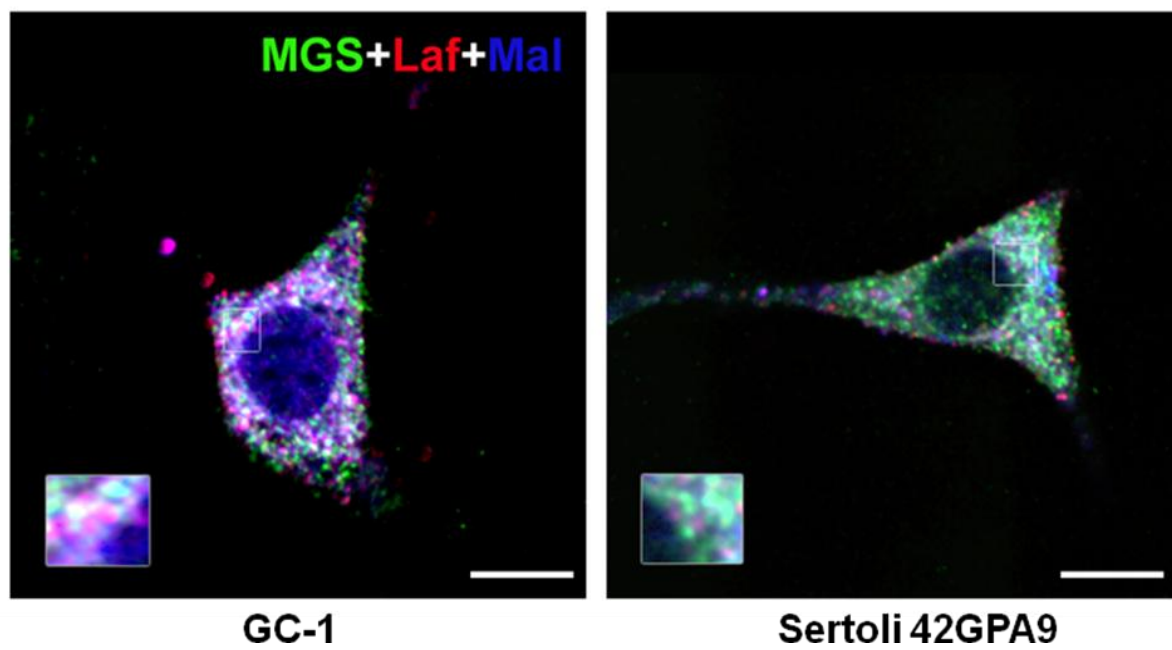
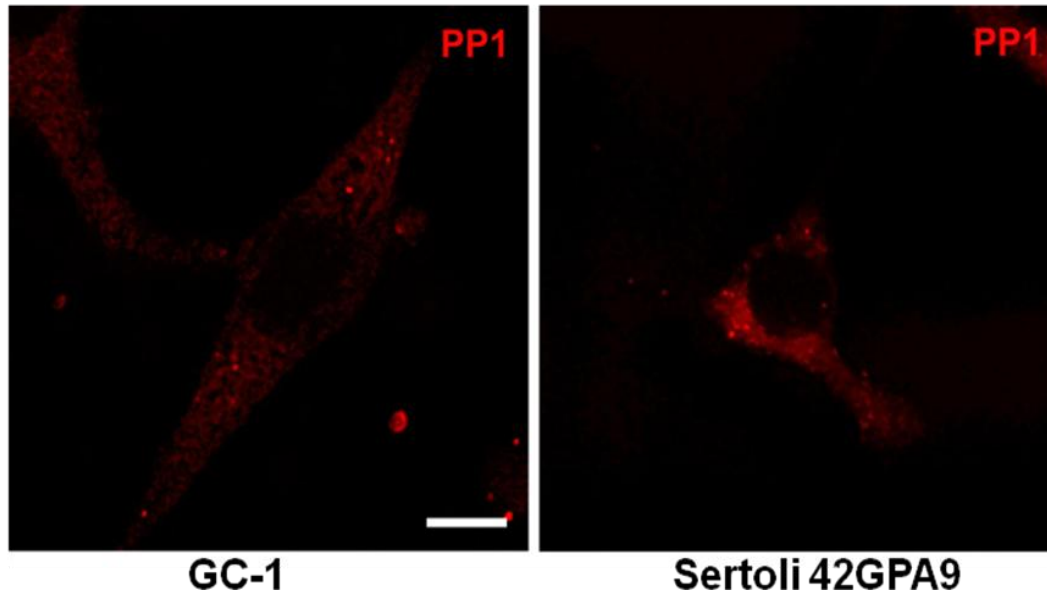
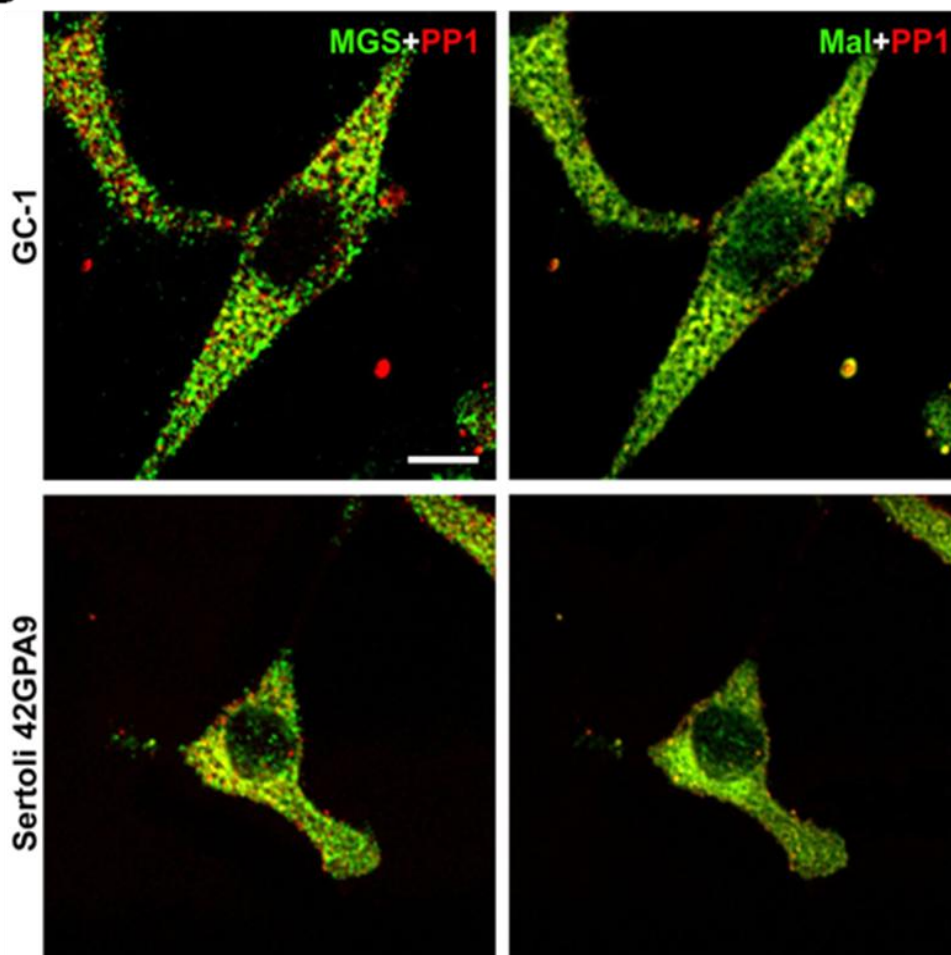
A**B**

Figura 9. Inmunolocalización de las proteínas malina, laforina con MGS en células de la línea germinal GC-1 y Sertoli 42GPA9. En **A)** se muestra el resultado de la co-localización entre malina con laforina, MGS con laforina y MGS con malina. Mientras que en **B)** se observa la triple co-localización entre MGS (verde), laforina (rojo) y malina (azul). Barra de magnificación: 10 μm .

A



B



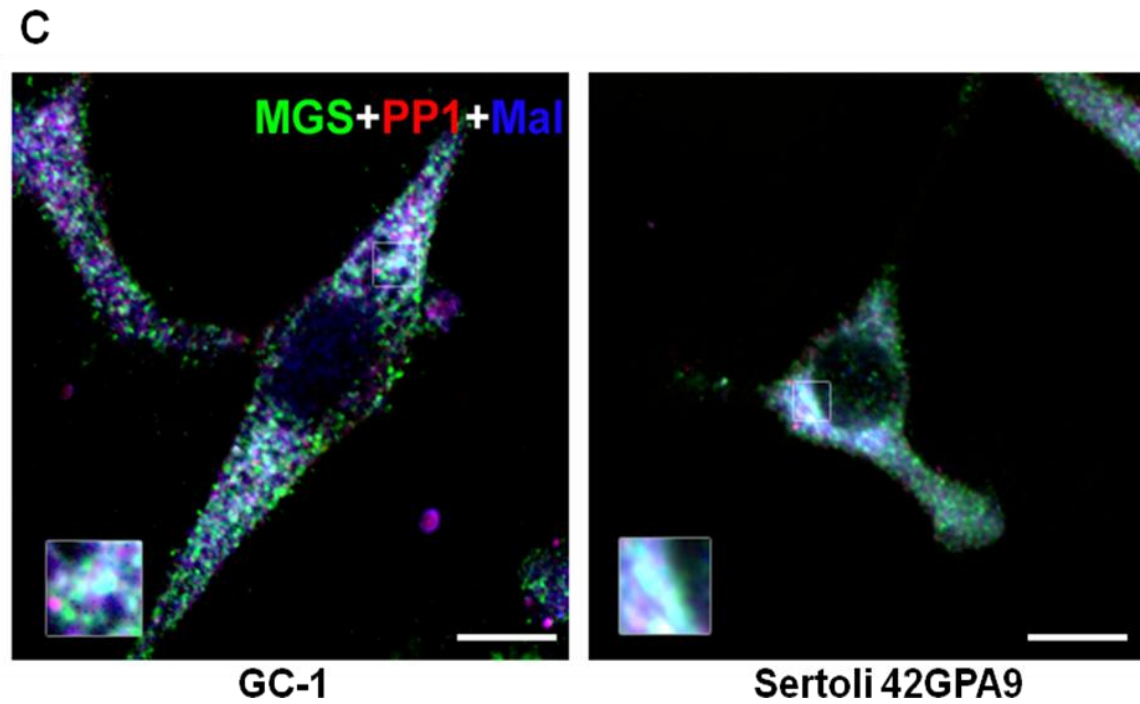


Figura 10. Immunolocalización de PP1 y co-localización con MGS y malina en línea germinal GC-1 y Sertoli 42GPA9. A) Mediante inmunofluorescencia se detectó PP1 en el citoplasma de células germinales y de Sertoli. **B)** En ambos tipos celulares se analizó la co-localización de MGS con PP1 y de Malina con PP1. La triple co-localización se visualiza en **C)**. Barra de magnificación: 10 μ m.

Los resultados evidencian que en las células que componen el epitelio seminífero laforina y malina co-localizan, por lo que es probable que el mecanismo regulatorio que ejercen en otros modelos celulares puede existir en testículo ya que MGS y PTG están próximas al complejo que estarían conformando malina y laforina.

Estudios de interacción proteína-proteína y proteína-carbohidrato contribuirían a dilucidar si es que la co-localización observada se debe realmente a que las proteínas están interactuando.

4.4 Interacción de malina con laforina y enzimas que participan en la síntesis de glucógeno.

Con el objetivo de determinar y analizar las interacciones entre malina, laforina, MGS y PTG se utilizó la técnica de GST *pull down* en la cual las esferas magnéticas fueron previamente tratadas con un extracto proteico que contenía GST-MalinRING (proteína GST acoplada a un constructo que corresponde al dominio RING de malina) para que este vector quede acoplado a las esferas y así, si las proteínas de interés interactúan con el dominio de malina serán retenidas en la columna y serán eluidas luego del tratamiento con glutatión reducido pero en este caso, para la elución se utilizó tampón de carga 5X (Tris-HCl, glicerol, SDS, azul bromofenol).

Para realizar los ensayos, primero que todo se obtuvieron extractos de proteínas totales de GC-1, Sertoli 42GPA9, HEK293T y también de tejidos de rata (músculo esquelético y testículo). Estos fueron pasados por la columna que contenía las esferas acopladas a GST-MalinRING de acuerdo al protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos. Se obtuvieron fracciones del Sobrenadante (SN), Lavado n°1 (L1), Lavado n°3 (L3) y Eluido (E) y a partir de éstas se realizaron varios *Western blot* para detectar laforina, malina, GS y PP1.

De acuerdo a la figura 11 y 12, glucógeno sintasa (GS) y PP1 fueron inmunodetectadas en la fracción correspondiente extracto crudo, sobrenadante y en el eluido en todos los casos excepto PP1 en músculo, por lo tanto se concluye que estas enzimas interactúan directamente con malina.

En los extractos crudos de los tres tipos celulares se detectaron dos bandas correspondientes a laforina mientras que se observa la banda de mayor peso

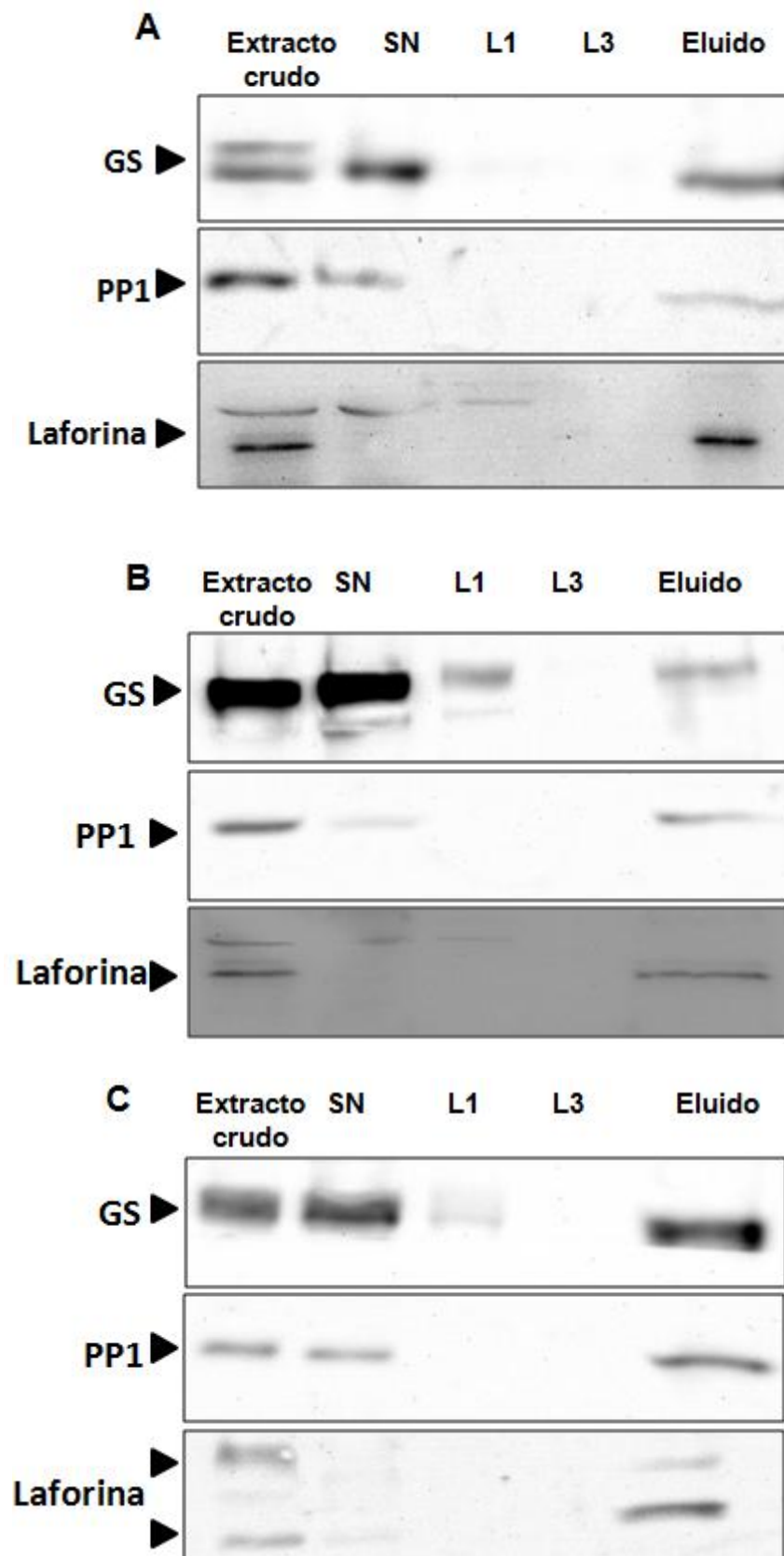


Figura 11. Interacción directa de malina con laforina y con proteínas implicadas en la síntesis de glucógeno en células germinales y de Sertoli. Se realizó el ensayo de *GST-pull down* siendo el primer paso el acoplamiento de la proteína de fusión GST-Malina RING a las esferas para luego pasar a través de la columna extractos proteicos totales de **A)** línea celular germinal GC-1, **B)** línea celular Sertoli 42GPA9 y **C)** HEK293T, usada como control. Los carriles corresponden a: Extracto crudo, SN: Sobrenadante, L1: Lavado n°1, L3: Lavado n°3, Eluido.

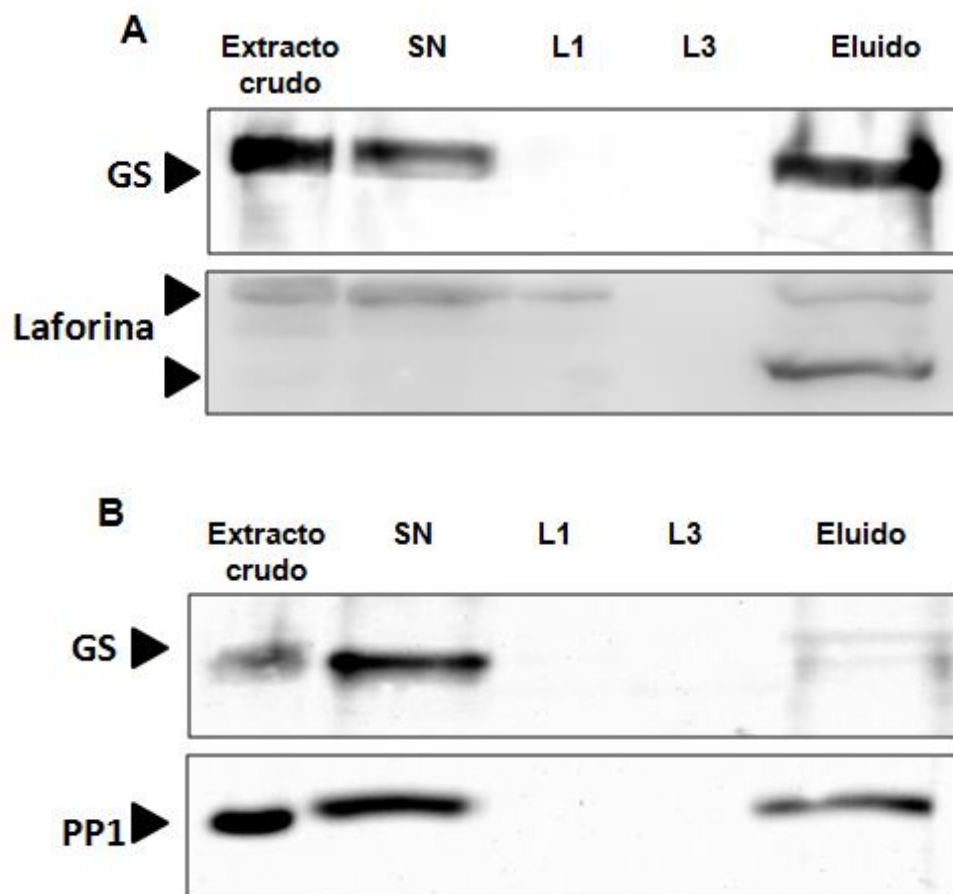


Figura 12. Interacción directa de malina con laforina y con proteínas implicadas en la síntesis de glucógeno en tejido de rata. Mediante el ensayo *GST-pull down* bajo las mismas condiciones explicadas anteriormente, se utilizaron extractos proteicos totales de **A)** Músculo y **B)** Testículo para la detección de GS, PP1 y laforina. Los carriles corresponden a: 1 Extracto crudo, 2 Sobrenadante, 3 Lavado n°1, 4 Lavado n°3, 5 Eluido. Como control se usó extracto proteico de músculo esquelético.

molecular en la fracción SN y L1 de GC-1 y Sertoli y la de menor peso molecular en el carril del eluido. En cambio, en HEK293T las dos bandas de laforina se visualizan en la fracción Eluido.

Esto sugiere que las dos bandas detectadas corresponden a las dos isoformas de laforina o bien a distintos estados de fosforilación y que en células germinales y Sertoli malina, por medio de su dominio RING, interactúa con una de ellas.

Laforina también fue detectada en músculo de rata en el extracto crudo y en el SN, observándose una banda nítida y otra muy tenue mientras que en el eluido se observan estas dos bandas más separadas lo cual puede deberse a la corrida electroforética. En cuanto a testículo, el análisis de *Western blot* no mostró una banda correspondiente a laforina (dato no mostrado).

4.5 Interacción entre polímeros de glucosa con GS, PP1, malina y laforina.

Se sabe que laforina, GS y PTG interactúan directamente con glucógeno ya que poseen en su estructura un dominio de unión a carbohidrato no así malina, por lo tanto en el mecanismo regulatorio que ejerce el complejo malina-laforina sobre el metabolismo del glucógeno laforina actúa como proteína de andamiaje llevando a malina para que ésta realice la ubiquitinación de sus proteínas blanco. Para establecer si es que en testículo estas proteínas interactúan con el glucógeno se realizó el ensayo de *pull down* con esferas acopladas a amilosa, que corresponde a un azúcar conformado por polímeros de glucosa no ramificados (presencia de enlaces α -1,4) que son estructuralmente distintos al glucógeno. Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron extractos de proteínas totales de GC-1 y Sertoli 42GPA9, se pasaron por la columna que contenía las esferas y las proteínas que interactúan con el polímero quedaron retenidas y se eluyen con maltosa (protocolo descrito en Materiales y métodos). A continuación, a partir de las fracciones recolectadas se realizaron *Western blot* para detectar GS, PP1, laforina y malina. Las enzimas GS y PP1 se encuentran en la fracción que corresponde al eluido en ambos tipos celulares lo que indica que estas proteínas interactúan directamente con el glucógeno (Figura 13). Sin embargo, para los casos de laforina y malina ésta no fue detectada en ninguno de los *Western blot* realizados (datos no mostrados).

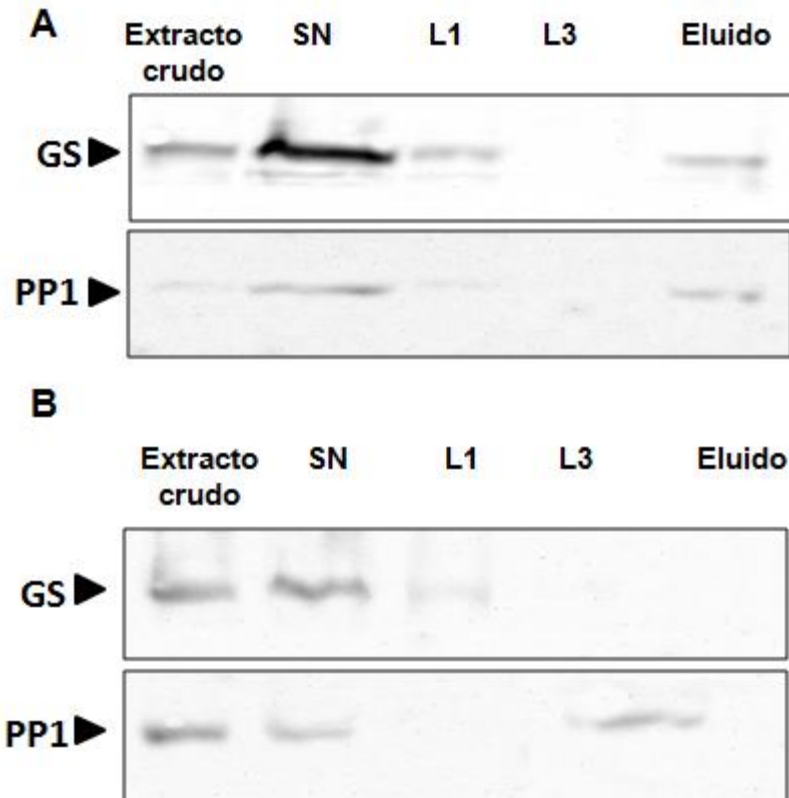


Figura 13. Interacción de proteínas que participan en el proceso de glucogénesis con polímeros de glucosa. Extractos de proteínas totales de **A)** células germinales GC-1 y **B)** Sertoli 42GPA9 fueron utilizados para realizar el ensayo de *pull down* con esferas acopladas a amilosa con el fin de detectar GS, PP1, laforina y malina. Los carriles corresponden a: 1 Extracto crudo, 2 Sobrenadante, 3 Lavado n°1, 4 Lavado n°3, 5 Eluido.

5. Discusión

Las células de Sertoli se caracterizan por ser células altamente especializadas debido a las funciones que cumplen como son, proporcionar el soporte estructural y nutritivo necesario para el correcto desarrollo y diferenciación de las células germinales masculinas. Las células de Sertoli interaccionan directamente con las células germinales, formándose estructuras dinámicas entre ellas que permiten el correcto desarrollo de la espermatogénesis y que producen cambios a nivel molecular, celular y bioquímico. La más importante de estas estructuras es la barrera hemato-testicular, la cual se forma por uniones oclusivas entre 2 células de Sertoli y debido a la morfología de éstas, divide al epitelio testicular en un compartimiento basal y un compartimiento adluminal a lo largo del cual ocurre el proceso espermatogénico hasta que la espermátida inmadura es liberada, proceso llamado espermiación. Por lo tanto, la barrera además de contribuir con el soporte estructural y protección inmunológica favorece el movimiento de la célula que se está diferenciando, demostrando la importancia de esta célula nodriza aun cuando la proporción de Sertoli:germinal es aproximadamente 1:50 en rata adulta (Weber *et al.*, 1983). Además de la barrera hemato-testicular existen otras uniones entre las Sertoli como las uniones adherentes y comunicantes, estas últimas también conocidas como uniones *gap*, que se caracterizan por formar poros que permiten el paso de moléculas pequeñas e iones.

Otro rol fundamental de las células de Sertoli es que son células secretoras, un ejemplo claro es que un 15% del total de proteínas producidas son glicoproteínas que están destinadas a ser secretadas tales como proteasas, inhibidores de

proteasas, factores de crecimiento, hormonas, componentes de la matriz extracelular, además de varios sustratos energéticos como carbohidratos, aminoácidos y lípidos (Mruk and Cheng, 2004). Muchos de estos productos, que son importantes para el desarrollo y diferenciación de las células germinales, deben ser sintetizados y entregados eficientemente tanto a espermatocitos como a espermatidas.

Una de las moléculas más importantes y relevantes para este estudio es la glucosa. A pesar de que las células germinales privilegian el consumo de lactato al igual que las Sertoli (Robinson y Fritz, 1981) la tasa de glucosa en ambas células es considerable y la presencia de los transportadores GLUTs 1, 2, 3 y 4 en las células de Sertoli (Angulo *et al.*, 2008) demuestran que estas células liberan glucosa a las germinales además de mantener una reserva de glucógeno que varía a lo largo del desarrollo. La enzima que sintetiza glucógeno es la glucógeno sintasa de la cual existen 2 isoformas, hepática (LGS) y muscular (MGS), esta última se encuentra en varios órganos como en el corazón, cerebro y de acuerdo a la figura 6, también se expresa y sintetiza en testículo, tanto en espermatocitos y espermatidas como en las células de Sertoli de la línea celular 42GPA9 con una distribución citoplasmática uniforme (Figura 7) sin embargo, la expresión de la enzima varía a lo largo del desarrollo. El gráfico de la figura 6C demuestra que MGS es expresada desde el primer día post-natal en testículo observándose un *peak* a los 5 días que es el momento en que comienza la diferenciación de las espermatogonias es decir, desde el día 1 al 5 la MGS expresada proviene netamente de las células pre-Sertoli que a su vez comienzan con su proceso de

maduración a Sertoli madura para la formación de la barrera en el día 15 aproximadamente (en rata). El incremento en la expresión de MGS el día 5 puede provenir de las células de Sertoli ya que durante la diferenciación de las células germinales el lactato (principal fuente de energía para estas células) es insuficiente y se requiere mayor entrega de glucosa por parte de la célula nodriza. Sin embargo, a partir del día 10 y hasta el día 30 se observa una disminución de la expresión lo que se debe al desarrollo y crecimiento del testículo, aumenta la masa pero el número de células de Sertoli permanece casi constante. Estas variaciones en la expresión de la enzima conllevarían a las acumulaciones de glucógeno a nivel testicular que se han evidenciado en varios estudios y que tendrían directa relación con el proceso espermatogénico (Fabbrini *et al.*, 1969; Re *et al.*, 1973; Datta *et al.*, 1988).

Uno de los objetivos planteados en el presente trabajo era determinar la presencia de las proteínas laforina y malina, las cuales son protagonistas de un nuevo mecanismo de regulación que ha sido descrito para el metabolismo del glucógeno. Un estudio del año 2007 (Vilchez *et al.*, 2007) demostró la presencia de la isoforma muscular de la glucógeno sintasa en tejido cerebral y a pesar de que ésta se encuentra inactiva en el núcleo de estas células hay procesos patológicos en donde una mutación en laforina o malina trae como consecuencia la activación de la glucogénesis pero no se produce glucógeno normal sino que polímeros de glucosa mal ramificados, conocidos como cuerpos de Lafora. Así es como se descubrió que laforina y malina forman un complejo regulatorio que envía a degradación a varias proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno.

La similitud estructural del tejido nervioso con el tejido testicular, el hallazgo reciente de MGS y lo poco que se sabe en cuanto a la regulación del metabolismo del glucógeno en testículo nos permitió plantear la hipótesis de que en epitelio seminífero se sintetiza laforina y malina y que al estar co-expresadas pueden actuar como reguladores glucogénicos de la MGS recién identificada y quizás de otras proteínas. Los resultados obtenidos (Figura 8) demuestran que laforina y malina se expresan en testículo en un nivel comparable con cerebro y músculo, tejidos que fueron usados como control por presentar altos niveles de dichas enzimas. Además, la expresión de ambas proteínas ocurre en los distintos tipos celulares que componen el epitelio seminífero como son las células de Sertoli y en las germinales en donde laforina se distribuye en todo el citoplasma y malina tanto en citoplasma como en el núcleo.

Varios son los laboratorios que han demostrado que laforina y malina interactúan y forman un complejo en el cual laforina, independiente de su función glucanofosfatasa, recluta los sustratos para que malina ejerza su función de E3 ubiquitina ligasa (Gentry *et al.*, 2005; Solaz-Fuster *et al.*, 2008; Worby *et al.*, 2008). Estos sustratos son ubiquitinados por malina de manera laforina-dependiente y muchos de ellos son enzimas involucradas en la síntesis del glucógeno tales como GS, GBE, AMPK y PTG (Worby *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007; Solaz-Fuster *et al.*, 2008; Fernandez-Sanchez *et al.*, 2003). En base a estos hallazgos tras haber demostrado la expresión de laforina y malina en el epitelio seminífero fue conveniente evaluar si es que existe algún tipo de interacción entre ellas y a su vez de éstas con proteínas que participan en la glucogénesis tales como son GS y PP1. Se efectuaron inmunofluorescencias para estudiar el nivel de co-localización

de laforina, malina, MGS y PP1 con el fin de visualizar el grado de proximidad de las proteínas que nos permita aventurar sobre las posibles interacciones que existirían en testículo. Los resultados de estos ensayos (Figura 9 y 10) demuestran un alto nivel de co-localización de malina con laforina y de éstas con MGS y PP1, lo que estaría contribuyendo a confirmar la hipótesis de que hay interacción y probablemente, regulación.

Para los estudios de interacción se realizó el ensayo de GST *pull down* utilizando GST-MalinRING esto es, GST unido al dominio RING de malina, aquel que le otorga la característica de ser E3 ubiquitina ligasa. Es importante recordar que malina interactúa con sus sustratos gracias a los 6 dominios NHL que posee y hasta ahora no se ha visto ningún tipo de interacción por su dominio RING. Un ejemplo de esto es el trabajo de Gentry *et al.*, 2005, en donde realizaron un ensayo doble híbrido y no observaron crecimiento cuando co-incubaron laforina con el vector GST-MalinRING concluyendo que laforina no interactúa con malina por su dominio RING sino que lo hace en presencia de los dominios NHL. Aun así los ensayos para evaluar la interacción de malina con laforina, GS y PP1 los realizamos con dicho vector.

Glucógeno sintasa muscular fue inmunodetectada en las tres líneas celulares estudiadas (GC-1, Sertoli 42GPA9 y HEK293T como control) con una nítida banda en la fracción que corresponde al eluido (Figura 11) concluyendo que en epitelio seminífero MGS interactúa con el dominio RING de malina. Sin embargo, se observaron diferencias en el extracto crudo de GC-1 ya que en el *Western blot* se detectó una doble banda a la altura del peso molecular correspondiente a GS lo que se explicaría como la detección de diferentes estados de fosforilación de la

enzima, mientras que en el extracto crudo y también en la fracción del sobrenadante en células de Sertoli se visualiza una intensa banda lo que podría ser un indicio de que este tipo celular posee mayor cantidad de MGS en niveles basales de cultivo.

Otra proteína que participa en el metabolismo del glucógeno es PP1. Esta enzima se encuentra unida a PTG y así se une indirectamente al glucógeno y efectúa su función de fosfatasa encargada de desfosforilar a GS para su activación. No hay antecedentes de que PP1 se una directamente a malina, no se ha descrito como un blanco directo, pero como PP1 se encuentra unida a PTG y ésta sí es ubiquitinada por malina, la detección mediante *Western blot* de la fosfatasa demostraría que malina interactúa con PTG en testículo. Al igual que GS, PP1 fue detectada en los tres tipos celulares y lo más importante, es que se observa una marcada banda en el eluido. En base a este resultado se puede aseverar que PTG interacciona con malina en los tipos celulares que componen el epitelio seminífero. Interesante resultó ser lo que se obtuvo en la detección de laforina. Al igual que en HEK293T, tanto en GC-1 como en Sertoli42GPA9 se observan dos bandas en el extracto crudo pero en los carriles donde se cargaron la fracción de sobrenadante y lavado 1 se detectó la banda de mayor peso molecular mientras que en el eluido, la de menor peso molecular. Esto nos llevó a pensar en dos posibles explicaciones sobre lo que puede estar ocurriendo, una opción es que en el extracto total de proteínas se están detectando las dos isoformas de laforina que han sido descritas hasta el momento (de 317 y 331 aminoácidos) y sólo una de ellas interactúa con el dominio RING de malina o bien son distintos estados de fosforilación, teniendo como antecedente que Ser25 es un residuo crítico ya que al estar fosforilado

umenta la interacción con malina y también de laforina con AMPK (Romá-Mateo *et al.*, 2011) por lo tanto en este caso, el estado menos fosforilado de laforina estaría interactuando con malina con el fin de ser poliubiquitinada y degradada mientras que para la formación del complejo, laforina fosforilada es la que se une a los dominios NHL de malina.

Para establecer una comparación con una propuesta experimental que se asemeje a la situación *in vivo*, se realizaron GST *pull down* con extractos proteicos de músculo esquelético y testículo de rata (Figura 12), sin embargo, en testículo, sólo se pudo inmunodetectar GS y PP1 en el extracto crudo, sobrenadante y eluido lo que confirma que malina interactúa con estas proteínas mientras que para el caso de laforina no fue posible su detección probablemente por la poca cantidad de esta proteína en el órgano completo. Sin embargo, este resultado no sería significativo, pues en los análisis de los tipos celulares se evidenció la interacción. En tejido muscular se detectó GS y laforina, pero las bandas obtenidas presentaron intensidades distintas.

Es importante destacar que, aun cuando se ha publicado que la interacción de malina con otras ocurre gracias a sus 6 dominios NHL (Gentry *et al.*, 2005) las interacciones proteína-proteína que se identificaron en los ensayos de GST *pull down* en este trabajo son con el dominio RING de malina, Sin embargo, en el testículo laforina puede estar interactuando directamente con el dominio RING de malina o existe una proteína que actúa como andamiaje y une laforina al dominio RING para formar el complejo, por lo tanto no es degradada, y así laforina, gracias a su dominio de unión a carbohidrato, une a GS y PTG para que sean enviadas a degradación.

Otra manera de analizar la interacción es basándose en la capacidad que tienen estas proteínas de unirse a carbohidratos, en este caso al glucógeno. GS y PP1 participan activamente en el metabolismo de este polímero y poseen en su estructura sitios o dominios de unión al glucógeno así como también laforina con su dominio CBM20 (Wang *et al.*, 2002). Teniendo en consideración estos antecedentes se realizaron ensayos de *pull down* con esferas acopladas a amilosa y de acuerdo a los *Western blots*, GS y PP1 fueron detectadas en la fracción de eluido en GC-1 y Sertoli mientras que laforina no se detectó en el extracto crudo y sobrenadante (Figura 13).

La amilosa es un polímero de glucosas que se asemeja en estructura al glucógeno con la diferencia de que solamente posee enlaces α -1,4 glucosídicos por lo tanto estos resultados sólo contribuyen para reafirmar que GS y PP1 interactúan con el glucógeno, pero no son contundentes en cuanto al estudio de la interacción con laforina y menos aún con malina, enzima que no posee sitios de unión a carbohidrato. Otra explicación de lo obtenido, es que laforina y malina no forman parte del eluido porque la concentración de maltosa en el tampón de elución fue insuficiente para establecer la debida competencia con las esferas siendo incapaz de liberar a las proteínas de ellas.

Los resultados obtenidos nos permiten aseverar que en el túbulo seminífero, tanto en células germinales como en las células de Sertoli, el complejo malina-laforina se forma y por medio de laforina y al parecer también por malina se produce la interacción con GS y PTG. Es importante enfatizar que este trabajo aporta evidencia contundente de que en epitelio seminífero las proteínas laforina y malina

estarían ejerciendo un mecanismo de regulación sobre el metabolismo del glucógeno similar al descrito en otros modelos celulares. Nuestro laboratorio ha evidenciado la acumulación de MGS poliubiquitinada al realizar ensayos utilizando el inhibidor proteosomal MG-132 y en ratones *knock in* con MGS superactiva se visualiza la sobreproducción de glucógeno que afecta la morfología del túbulo seminífero observando apoptosis en las células germinales pero no en las células de Sertoli (Villarreal-Espíndola *et al.*, (2012) *J Cell Physiol*, en revisión). Sin embargo, estas proteínas además de estar actuando juntas (cuando forman el complejo) cumplen otros roles por separado en otros procesos celulares y lo mismo puede ocurrir en el testículo.

Laforina, por medio de su actividad fosfatasa, actúa como reguladora de la síntesis aberrante de glucógeno impidiendo su acumulación es decir, estaría corrigiendo la excesiva fosforilación del polímero (Worby *et al.*, 2006) por lo que los niveles de esta enzima se correlacionan con la cantidad de glucógeno en la célula (Wang *et al.*, 2006) y es muy probable que en nuestro modelo de estudio ocurra lo mismo. Liu *et al.*, en el año 2008 determinó que laforina regula negativamente el ciclo celular ya que la ausencia de la enzima gatilla el aumento de ciclina D1, proteína promotora de la progresión del ciclo celular. Si nos enfocamos al epitelio seminífero, el rol de laforina como reguladora indirecta del ciclo celular es crítico y esencial ya que el proceso de espermatogénesis es altamente regulado, las sucesivas mitosis y meiosis y la especialización que va adquiriendo la célula germinal a lo largo del epitelio requiere que ciertas cascadas de señalización se

activen de manera precisa para que no se produzca un desbalance total del desarrollo testicular y espermatogénico.

En el caso de malina, ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su rol como ubiquitina ligasa con proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno pero se desconoce qué otros blancos pueda tener y si es que posee otras funciones.

Por otro lado, se ha reportado que un 10% del glucógeno en hepatocitos se encuentra en el lisosoma (Geddes *et al.*, 1992), el mecanismo exacto por el cual es transferido a este organelo es desconocido aunque se ha visto que la proteína Stbd1 une el glucógeno a membranas internas (Jiang *et al.*, 2010) y contribuiría en su tráfico al lisosoma. Se vió *in vitro* que Stbd1 muestra preferencia por unir glucógeno hiperfosforilado y poco ramificado, con lo cual se acuñó el término glicofagia o autofagia del glucógeno ya que este nuevo mecanismo actuaría como control de calidad.

Un hallazgo importante fue el realizado por Aguado *et al.*, en el año 2010, quienes estudiando laforina descubrieron que su expresión estimula la autofagia, el mecanismo aún es desconocido pero sugieren que laforina participa en alguna etapa de la vía mTOR, activando la autofagia. A su vez, otro grupo de investigadores (Criado *et al.*, 2012) demostró que malina también estaría implicada en el proceso de autofagia pero en este caso sería independiente de mTOR. Por lo tanto la nueva propuesta que surge es que la desregulación del metabolismo del glucógeno acompañada de la inhibición de la autofagia provoca la formación de los cuerpos de Lafora es decir, laforina y malina estarían jugando un papel importantísimo en ambos procesos.

Basándonos en nuestros resultados y en los antecedentes antes descritos podemos concluir que malina y laforina conforman un complejo multiproteico que regularía el metabolismo del glucógeno en el epitelio seminífero (Figura 14) y sugerimos que cada proteína estaría cumpliendo roles importantísimos en eventos trascendentales como la espermatogénesis, durante la eliminación de la gota espermática, en el remodelamiento del citoesqueleto, en la reconstitución de las uniones intercelulares y en muchos otros procesos que mantienen la homeostasis celular. Estudios a futuro del comportamiento de cada enzima en el escenario espermatogénico permitirían descubrir la importancia global de su función, la cual está lejos de ser dilucidada en su totalidad.

6. Conclusiones

- En testículo y sus componentes celulares se expresa la isoforma muscular de la glucógeno sintasa.
- Laforina y malina son sintetizadas en el túbulo seminífero co-localizando en gran medida en las células germinales y células de Sertoli.
- Laforina interacciona con el dominio RING de malina directamente o bien por medio de una proteína adaptadora siendo un nuevo aporte al mecanismo de regulación descrito hasta ahora en otros modelos celulares.

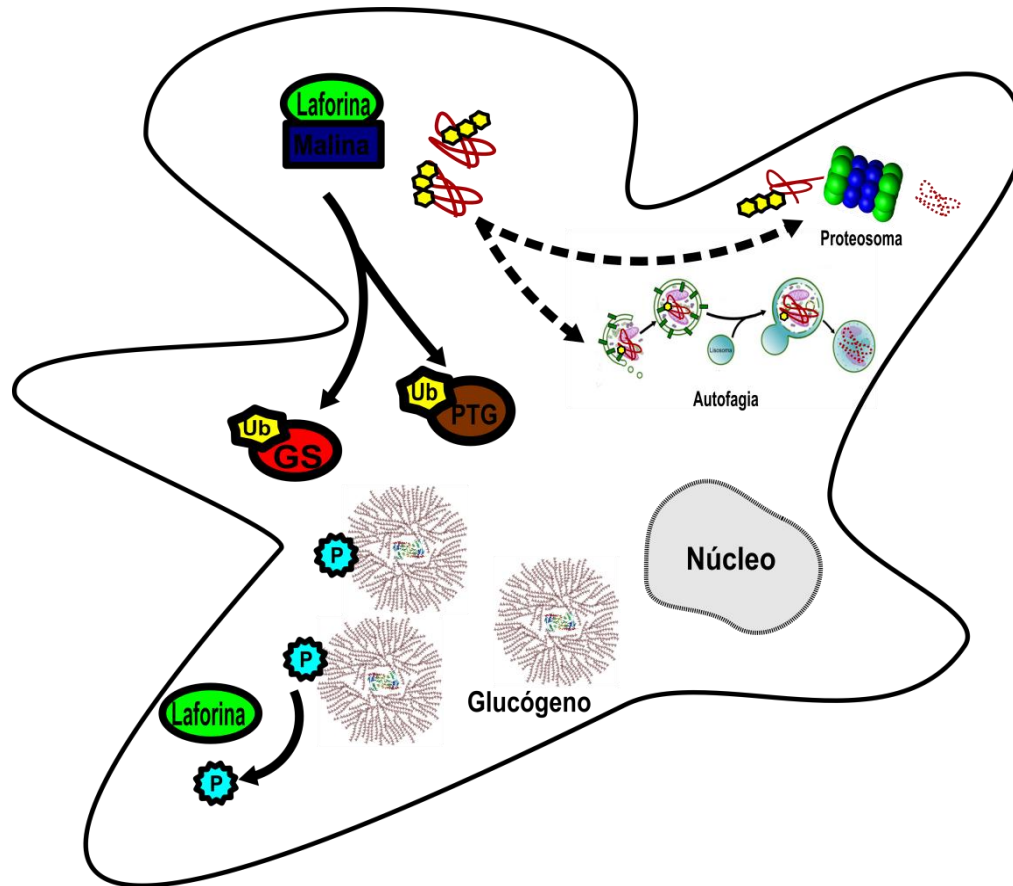


Figura 14. Modelo propuesto de la regulación ejercida por el complejo malina-laforina sobre la síntesis de glucógeno testicular. En el epitelio seminífero laforina y malina forman un complejo que interacciona y ubiquitina a GS y PTG para ser enviadas a degradación, controlando la síntesis de glucógeno de manera negativa. En base a los antecedentes recopilados laforina ejercería su actividad fosfatasa sobre el glucógeno. Por otro lado, el complejo también participaría en la degradación de proteínas mal plegadas y también regularían positivamente la autofagia.

7. Bibliografía.

Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Criado, O., Vernia, S., Boya, P., Sanz, P., Rodríguez de Córdoba S., Knecht E., Rubinsztein D.C. (2010). Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum. Mol. Genet.*, 19(14), 2867-2876.

Andrade, D. M., Turnbull, J., Minassian, B. a. (2007). Lafora disease, seizures and sugars. *Acta Myol* 2007; XXVI; p. 83-86.

Angulo, C., Castro, M. a, Rivas, C. I., Segretain, D., Maldonado, R., Yañez, A. J., Slebe, J. C., et al. (2008). Molecular identification and functional characterization of the vitamin C transporters expressed by Sertoli cells. *J. Cell. Physiol.*, 217(3), 708-716.

Bouskila, M., Hunter, R. W., Ibrahim, A. F. M., Delattre, L., Peggie, M., van Diepen, J. a, Voshol, P. J., Jensen J., Sakamoto K. (2010). Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell metabolism*, 12(5), 456-466.

Cavanagh, J. B. (1999). Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res.Rev.*, 29(2-3), 265-295.

Chan, E. M., Young, E. J., Ianzano, L., Munteanu, I., Zhao, X., Christopoulos, C. C., Avanzini, G., Elia M., Ackerley C.A., Jovic N.J., Bohlega S., Andermann E., Rouleau G.A., Delgado-Escueta A.V., Minassian B.A., Scherer S.W. (2003).

Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.*, 35(2), 125-127.

Cheng, A., Zhang, M., Gentry, M. S., Worby, C. A., Dixon, J. E., Saltiel, A. R. (2007). A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori ' s disease. *Genes Dev.*, 1, 2399-2409.

Cid, E., Cifuentes, D., Baqué, S., Ferrer, J. C., Guinovart, J. J. (2005). Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase. *FEBS J.*, 272(12), 3197-3213.

Clermont, Y., Morales, C., Hermo, L. (1987). Endocytic activities of Sertoli cells in the rat. Cell biology of the testis and epididymis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 513, 1-15.

Criado, O., Aguado, C., Gayarre, J., Duran-Trio, L., Garcia-Cabrero, A. M., Vernia, S., San Millán, B., Heredia M., Romá-Mateo C., Mouron S., Juana-López L., Domínguez M., Navarro C., Serratos J.M., Sanchez M., Sanz P., Bovolenta P., Knecht E., Rodriguez de Cordova S. (2012). Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum. Mol. Genet.*, 21(7), 1521-1533.

Datta, K. Misra, J. Dasgupta, T. Sengupta, S. D. Sengupta. (1988). Glycogen metabolism in human fetal testes. *J. Biosci.*, Vol. 13, Number 2, 117–121.

Fabbrini, A., Re, M., Conti, C. (1969). Glycogen in the normal human testis: a histochemical and histoenzimatic study. *J Endocr*, 43(4), 499.

Fernandez-Novell, J. M., Bellido, D., Vilaro, S., Guinovart, J. J. (1997) Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 321, 227–231.

Fernández-Sánchez, M. E., Criado-García, O., Heath, K. E., García-Fojeda, B., Medraño-Fernández, I., Gomez-Garre, P., Sanz, P., Serratos J.M., Rodriguez de Córdoba S. (2003). Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation. *Hum. Mol. Genet.*, 12(23), 3161-3171.

Friedman, D.L., and Larner, J. (1963). Studies on UDPG-alpha-glucan transglucosylase. Iii. Interconversion of two forms of muscle UdpG-alpha-glucan transglucosylase by a phosphorylation-dephosphorylation reaction sequence. *Biochemistry* 2, 669–675.

Ganesh, S., Agarwala, K. L., Ueda, K., Akagi, T., Shoda, K., Usui, T., Hashikawa, T., Osada H., Delgado-Escueta A.V., Yamakawa K. (2000). Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.*, 9(15), 2251-2261.

Garyali, P., Siwach, P., Singh, P. K., Puri, R., Mittal, S., Sengupta, S., Parihar, R., Ganesh S. (2009). The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system. *Hum. Mol. Genet.*, 18(4), 688-700.

Gentry, M. S., Worby, C. A., Dixon, J. E. (2005). Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Nat Acad Sci USA*, 102(24), 8501-8506.

Geddes, R., Jeyarathan, P., Taylor, J. A. (1992) Molecular and metabolic aspects of lysosomal glycogen. *Carbohydr. Res.* 227, 339–349.

Gierke, J. (1937) *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol*, 98, 351.

Jensen, J., Jebens, E., Brennesvik, E. O., Ruzzin, J., Soos, M. a, Engebretsen, E. M. L., O’Rahilly, S., Whitehead J.P. (2006). Muscle glycogen inharmoniously regulates glycogen synthase activity, glucose uptake, and proximal insulin signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.*, 290(1), E154-E162.

Jiang, S., Heller, B., Tagliabracci, V. S., Zhai, L., Irimia, J. M., DePaoli-Roach, A. a, Wells, C. D., Skurat A.V., Roach P.J. (2010). Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J. Biol. Chem.*, 285(45), 34960-34971.

Kotoulas, O. B., Kalamidas, S. A., Kondomerkos, D. J. (2004). Glycogen autophagy. *Microsc Res Techniq.* 64(1), 10-20.

Leloir, L.F., Olavarria, J.M., Goldemberg, S.H., Carminatti, H. (1959). Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 81, 508–520.

Liu, R., Wang, L., Chen, C., Liu, Y., Zhou, P., Wang, Y., Wang, X., Turnbull J., Minassian B.A., Liu Y., Zheng P. (2008). Laforin negatively regulates cell cycle progression through glycogen synthase kinase 3 β -dependent mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 28(23), 7236-7244.

Lohi, H., Ianzano, L., Zhao, X.-C., Chan, E. M., Turnbull, J., Scherer, S. W., Ackerley, C. A., Minassian B.A. (2005). Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum. Mol. Genet.*, 14(18), 2727-2736.

Mangan, F. R. and Mainwaring, W. I. P. (1972) An explanation of the antiandrogenic properties of 6 α -bromo-17 β -hydroxy-17 β -methyl-4-oxa-5 α -androstane-3-one. *Steroids*, 20, 351.

McManus, E. J., Sakamoto, K., Armit, L. J., Ronaldson, L., Shpiro, N., Marquez, R., Alessi, D. R. (2005). Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *The EMBO J.*, 24(8), 1571-1583.

Minassian, B. a, Lee, J. R., Herbrick, J. a, Huizenga, J., Soder, S., Mungall, a J., Dunham, I., Gardner R., Fong C.G., Jardim L., Carperter S., Satishchandra P., Andermann E., Carter Snead O., Lopes-Cendes I., Tsui L., Delgado-Escueta A.V., Rouleau G.A., Sherer S.W. (1998). Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nature Genet.*, 20(2), 171-174.

Minassian, B. A., Ianzano, L., Meloche, M., Andermann, E., Rouleau, G. A., Delgado-Escueta, A. V. and Scherer, S. W. (2000) Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Neurology* 55, 341–346.

Moreno, D., Towler, M. C., Hardie, D. G., Knecht, E., Sanz, P. (2010). The Laforin – Malin Complex , Involved in Lafora Disease , Promotes the Incorporation of K63-linked Ubiquitin Chains into AMP-activated Protein Kinase. *Mol. Biol.*, 21, 2578-2588.

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, 25(5), 747-806.

Pederson, B. A., Cheng, C., Wilson, W. A., Roach, P. J. (2000). Regulation of Glycogen Synthase. *Biochemistry*, 275(36), 27753-27761.

Printen, J. A. (1997). PTG, a Protein Phosphatase 1-Binding Protein with a Role in Glycogen Metabolism. *Science*, 275(5305), 1475-1478.

Re, M., Cavaniglia, G., Frajese, G., Fabbrini, A. (1973) Phosphorylase in the adult rat testis: the use of dextran in histochemical studies. *Experientia*, 29, 1544.

Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. a, Hurley, T. D., Tagliabracci, V. S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem. J.*, 441(3), 763-787.

Robinson, R., & Fritz, I. B. (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol reprod.*24, 1032-1041.

Romá-Mateo, C., Solaz-Fuster, M. D. C., Gimeno-Alcañiz, J. V., Dukhande, V. V., Donderis, J., Worby, C. a, Marina, A., Criado O., Koller A., Rodriguez de Cordova S., Gentry M.S., Sanz P. (2011). Laforin, a dual-specificity phosphatase involved in Lafora disease, is phosphorylated at Ser25 by AMP-activated protein kinase. *Biochem. J.*, 439(2), 265-275.

Ros, S., García-Rocha, M., Domínguez, J., Ferrer, J. C., Guinovart, J. J. (2009). Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 284(10), 6370-6378.

Seilicovich, A, and Lloret, A. P. (1973) Glycogen and related enzymes in normal and cryptorchid human testes: A cytochemical study. *J. Reprod. Fertil*, 33, 379.

Shepherd, P. R. (2005). Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol. Scand.* 2005, 183, 3–12.

Shulman, G.I., Rothman, D.L., Jue, T., Stein, P., DeFronzo, R.A., Shulman, R.G. (1990). Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N. Engl. J. Med.* 322, 223–228.

Simpson, F., Whitehead, J. P., James, D. E. (2001). GLUT4-at the cross roads between membrane trafficking and signal transduction. *Traffic* 2001 (2), 2-11.

Skurat, A. V. and Roach, P. J. (1995) Phosphorylation of sites 3a and 3b (Ser640 and Ser644) in the control of rabbit muscle glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 270, 12491–12497.

Skurat, A. V., Wang F., Y., Roach, P. J. (1994). Rabbit Skeletal Muscle Glycogen Synthase Expressed in COS Cells. *J. Biol. Chem.* October, 269(41), 25534-25542.

Solaz-Fuster, M. C., Gimeno-Alcañiz, J. V., Ros, S., Fernandez-Sanchez, M. E., Garcia-Fojeda, B., Criado Garcia, O., Vilchez, D., Dominguez J., Garcia-Rocha M., Sanchez-Piris M., Aguado C., Knecht E., Serratos J., Guinovart J.J., Sanz P., Rodriguez de Cordova S. (2008). Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.*, 17(5), 667-678.

Stevens, A. and Lowe, J.S. (1988). Male reproductive system. *Histology*, 304-321.

Tagliabracci, V. S., Turnbull, J., Wang, W., Girard, J.-M., Zhao, X., Skurat, A. V., Delgado-Escueta, A. V., Minassian B.A., DePaoli-Roach A.A., Roach P.J. (2007). Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA* 104(49), 19262-19266.

Turban, S., and Hajduch, E. (2011). Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS letters*, 585(2), 269–274.

Vergouwen, R. P., Jacobs, S. G., Huiskamp, R., Davids, J. A., de Rooij, D. G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.*, 93(1), 233-243.

Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez E., Medraño-Fernández I., Domínguez J., García-Rocha M., Soriano E., Rodríguez de Córdoba S., Guinovart J.J. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10, 1407 – 1413.

Wang, W., Parker, G. E., Skurat, A. V., Raben, N., Depaoli, A. A., Roach, P. J. (2006). Relationship between glycogen accumulation and the laforin dual specificity phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 350(3), 588-592.

Wang, J., Stuckey, J. a, Wishart, M. J., Dixon, J. E. (2002). A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen. *J. Biol. Chem.*, 277(4), 2377-2380.

Weber, J. E., Russell, L. D., Wong, V., Peterson, R. N. (1983). Three-Dimensional Reconstruction of a Rat Stage V Sertoli Cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ-Cell Relationships. *Am. J. Anat.*, 179, 163-179.

Wong, V., & Russell, L. D. (1983). Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: I. Methods, basic configuration, and dimensions. *Am. J. Anat.*, 167(2), 143-161.

Worby, C. a, Gentry, M. S., Dixon, J. E. (2006). Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J. Biol. Chem.*, 281(41), 30412-30418.

Worby, C. a, Gentry, M. S., Dixon, J. E. (2008). Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG). *J. Biol. Chem.*, 283(7), 4069-4076.