

Sección Química de los Pioneros/ Artículo de revisión

## La Proteína Constituyente del Glucógeno (The Protein Constituent of Glycogen)

Por Juan Agustín Curtino

[juancurtino@fcq.unc.edu.ar](mailto:juancurtino@fcq.unc.edu.ar)

Profesor Consulto de la U.N.C. e Investigador Principal de CONICET, Departamento de Química Biológica, CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

### Resumen:

El glucógeno es el único polímero de glucosa que existe como proteoglucógeno, unido en su extremo reductor a un aminoácido de la proteína glucogenina. Este particular diseño estructural responde a la necesidad de formación de un corto polímero de doce a catorce glucosas, unido a la glucogenina, con el que se inicia la polimerización de glucosa. La glucogenina es una enzima de la familia de las glicosiltransferasas que posee la inusual característica de ser sustrato de su propia actividad catalítica. Esta actividad resulta en la transferencia de glucosa desde el sustrato dador UDP-glucosa a una tirosina de la glucogenina primero y luego, en forma sucesiva, a cada una de las restantes glucosas transferidas. La glucogenina autoglucosilada constituye el *primer* o sustrato requerido por la glucógeno sintetasa para producir la glucopolimerización que, con las ramificaciones introducidas por la enzima ramificante, conducen a la biosíntesis *de novo* de proteoglucógeno. Como un zimógeno, precursor inactivo de enzima, el proteoglucógeno puede liberar la glucogenina y reiniciar la glucopolimerización, cuando su porción polisacárido es consumida para cubrir la demanda celular de energía. En el presente artículo se mencionan los estudios que permitieron dilucidar la etapa de iniciación de la glucopolimerización ligada a la glucogenina y el mecanismo molecular de su autoglucosilación. Dicha etapa permaneció sin resolverse por largo tiempo desde que en 1957, Leloir y colaboradores describieron que la glucógeno sintetasa era la enzima responsable de la glucopolimerización que origina glucógeno, la forma de almacenamiento celular de glucosa descubierta y bautizada hace ciento cincuenta años por Claude Bernard.

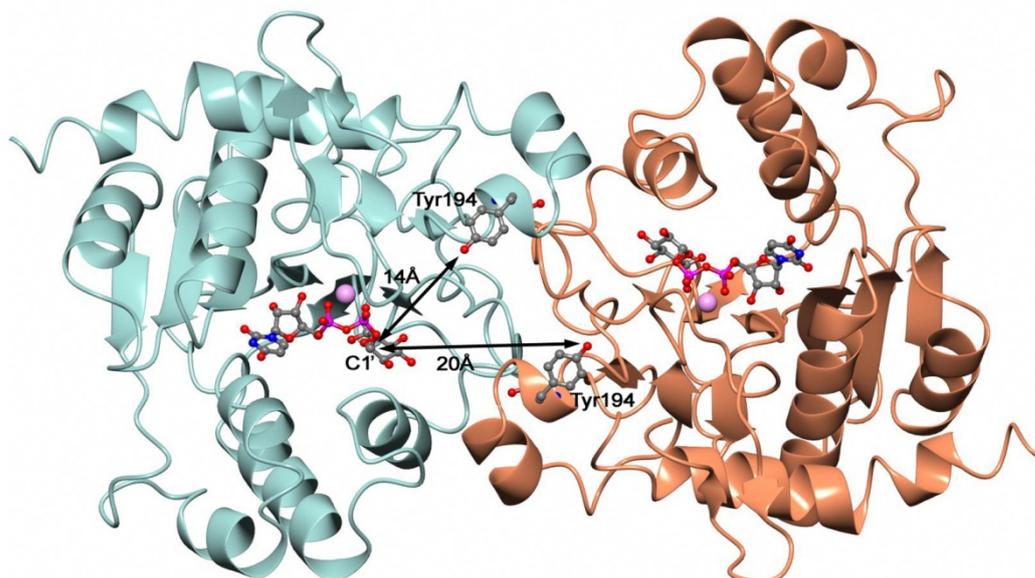
### Abstract

*Glycogen is the unique glucose polymer existing as proteoglycogen, with the reducing end linked to an amino acid of the protein glycogenin. This structural design results from the required formation of a short polymer of 12-14 glucose units linked to glycogenin, which initiates the glucose polymerization. Glycogenin is an enzyme of the glycosyltransferase family possessing the uncommon property of being the substrate of its own catalytic activity. This activity results in the transfer of glucose from the donor substrate UDP-glucose to a tyrosine residue of glycogenin first and then, successively to each of the next transferred glucoses. The autoglucosylated glycogenin product is the primer substrate required by glycogen synthase to carry out, together with the branching enzyme, the biosynthesis of proteoglycogen. Like a zymogen, the inactive precursor of some enzymes, proteoglycogen releases glycogenin to initiate a new glucopolimerization when its polysaccharide moiety results exhausted by the cellular energy demands. In the present article the work dealing with the initiation step of the glycogenin-dependant glucopolimerization and the autoglucosylation mechanism is reviewed. The initiation of glucopolimerization remained unknown since Leloir et al. described glycogen synthase in 1957, the enzyme responsible for the glucopolimerization involved in the synthesis of glycogen, the cellular way of glucose storage discovered and named by Claude Bernard, about 150 years ago.*

### Palabras clave

Glucógeno, Iniciación de la Glucopolimerización, Proteoglucógeno, Glucogenina, Autoglucosilación

### Resumen gráfico



**Figura 1. Estructura cristalina del dímero de glucogenina.** Se indican las distancias entre el C1 de la glucosa del UDP-glucosa unido en el sitio activo, y el hidroxilo fenólico de la Tirosina-194, en la misma (14Å) y opuestas (20Å) subunidades.

#### Glucogenina, una enzima singular

La proteína constituyente del glucógeno es una enzima con características relevantes:

- Es la única glicosiltransferasa sustrato de su propia actividad enzimática.
- Es un catalizador que se “consume” en la autoglicosilación, cesando su actividad al adquirir el máximo grado de glicosilación.
- Existe en la célula en forma inactiva como proteoglucógeno, activándose al quedar libre de polisacárido.
- Produce la única O-glicosilación de tirosina hasta ahora descrita.
- La autoglicosilación de su tirosina con la primer unidad glucosa, requeriría un considerable cambio conformacional, para poder acercar el aminoácido al dador de glucosa unido en el sitio activo.

Uno de los importantes avances de la bioquímica a los que dio origen el descubrimiento del *primer* nucleótido azúcar, UDP-glucosa, por Cardini, Paladini, Caputto y Leloir en 1950 (1) fue la dilucidación de la etapa de glucopolimerización del glucógeno llevada a cabo por la enzima glucógeno sintetasa, a partir de glucógeno preexistente como aceptor y el nucleótido azúcar como dador de glucosa (2). No obstante haberse complementado dicho estudio con la inclusión de enzima ramificante (3), encargada de dar lugar a la estructura arbórea ramificada del polisacárido, faltaba resolver de qué manera comenzaba la glucopolimerización. Ni

glucosa ni oligosacáridos de dos a seis unidades glucosa derivados del glucógeno, eran utilizados por la sintetasa como sustrato iniciador de la polimerización.

#### **Descubrimiento de la glucogenina y de la iniciación de la glucopolimerización**

Uno de los intentos por resolver el interrogante acerca del inicio de la biosíntesis de glucógeno, dio origen a la hipótesis cuya verificación condujo a los resultados que se describen a continuación. La mencionada hipótesis, elaborada por Krisman y Barenco en 1975 proponía que, a través de la glicosilación de una proteína por una “enzima iniciadora de glucógeno”, se formaba el *primer* o

sustrato con el que la glucógeno sintetasa producía la glucopolimerización dando origen a un proteoglucano (4). Fundamentalmente basada en el comportamiento frente a un agente precipitante de proteínas, la hipótesis era cuestionada por que los resultados con los que se intentaba sustentarla carecían de evidencias directas, que demostraran que el producto que se glucosilaba era proteína y no una fracción de glucógeno, que estuviese coprecipitando con membranas de los extractos celulares utilizados en los estudios.

El *primer* avance significativo en la verificación de la hipótesis del primer proteico, se produjo utilizando la estrategia de marcar la putativa proteína del glucógeno, por yodinación de residuos tirosina con yodo radiactivo, a fin de verificar su existencia y determinar la estabilidad de su supuesta unión al polisacárido (5). Así se logró demostrar que el glucógeno contenía proteína covalentemente unida, constituyendo un nuevo glicoconjugado que

fue denominada proteoglucógeno. Una exhaustiva digestión glucolítica y proteolítica del proteoglucógeno yodinado permitió demostrar que tirosina, aislada e identificada bajo la forma de yodotirosina, era el aminoácido unido al polisacárido a través de su hidroxilo fenólico, en unión O-glucosídica con el átomo de C1 del extremo reductor del glucógeno (6). El constituyente proteico del proteoglucógeno fue aislado como un polipéptido de 38 kDa y denominado glucogenina (7). Descripta su estructura primaria, el residuo glucosilable Tirocina-194 fue identificado (8). La caracterización de la glucogenina permitió demostrar su actividad autoglucosiltransferasa, Mn-dependiente, capaz de glucosilarse a sí misma por mecanismo de reacción intramolecular. El oligomaltósido unido a glucogenina que se formaba, era utilizado por la glucógeno sintetasa para extender su glucopolimerización (9).

#### **Hitos en el descubrimiento de una enzima oculta en el glucógeno**

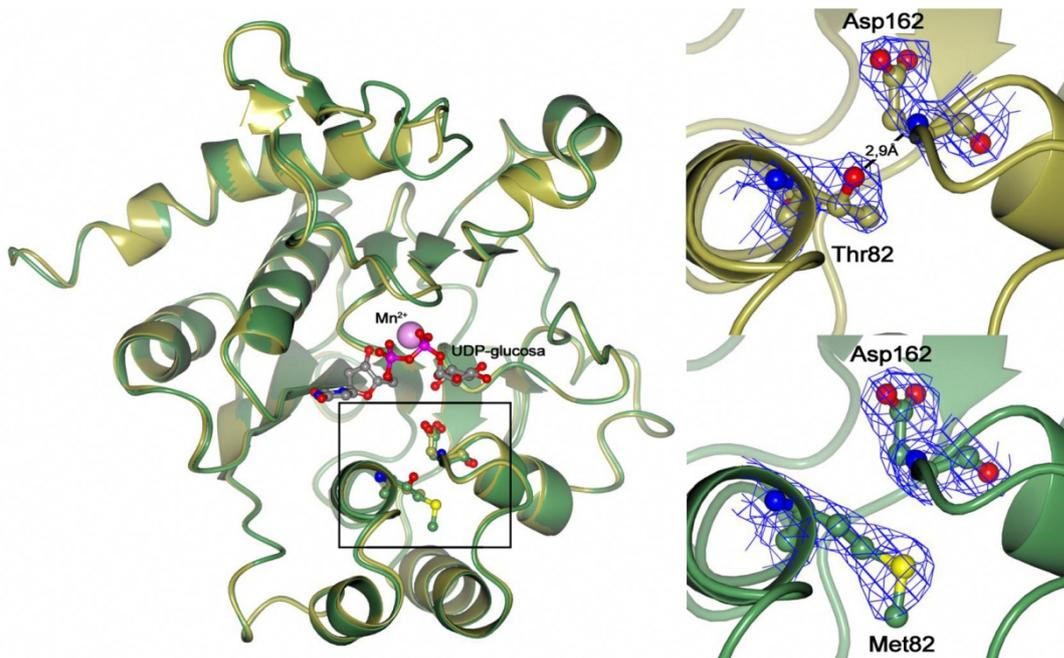
**El largo tiempo transcurrido sin que se pudiera conocer la manera en que se inicia la biosíntesis de glucógeno es entendible, si se considera que la enzima implicada, oculta en forma inactiva en el glucógeno, no podía ser hallada buscándola por su actividad. Encontrar proteína covalentemente unida al glucógeno y caracterizarla luego de separada del polisacárido, constituyeron dos hitos fundamentales en su hallazgo. En 1976, el grupo de Philip Cohen había descripto la purificación de glucógeno sintetasa a partir de glucógeno, al que la sintetasa se asocia con alta afinidad (10). Bastaba hidrolizar el polímero con  $\alpha$ -amilasa para liberar a la glucógeno sintetasa, que aparecía acompañada de una "proteína contaminante", finalmente eliminada. En ese momento, Cohen ignoraba que la "proteína contaminante" era glucogenina. Después que Aon y Curtino (1984) demostraron que existía proteína covalentemente unida al glucógeno a través de su residuo tirosina y que era liberada del polisacárido con  $\alpha$ -amilasa (5, 6), no quedaron dudas que la proteína unida al glucógeno era la misma que Cohen había considerado un contaminante. Utilizando su protocolo de purificación de glucógeno sintetasa, Cohen y col. (1987) aislaron la glucogenina antes desechada como contaminante y la caracterizaron, demostrando su actividad autoglucosiltransferasa para formar el sustrato de la glucógeno sintetasa (9). Se consiguió así demostrar que la proteína del proteoglucógeno era la enzima y a la vez el sustrato sobre el que se inicia la glucopolimerización, una etapa fundamental que conduce a la biosíntesis de glucógeno, la vía metabólica que utiliza la célula para almacenar 6.000 a 12.000 glucosas en una sola molécula, sin afectar la presión osmótica como lo haría una cantidad similar de moléculas de glucosa libres.**

#### **Estructura cristalina de la glucogenina y mecanismo de autoglucosilación**

Demostrada la iniciación de la biosíntesis de glucógeno a partir de la nueva enzima-sustrato, los estudios se orientaron a determinar las

características estructurales de la glucogenina y el mecanismo molecular de autoglucosilación.

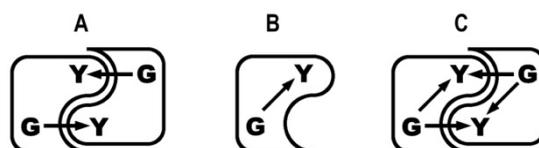
El gen de la glucogenina de músculo de conejo fue clonado y la proteína expresada en *E. coli* (11). Estudios cristalográficos de la glucogenina



**Figura 3.** Superposición de las estructuras cristalinas de los monómeros de las glucogeninas nativa (dorado) y mutante Thr82Met (verde). El recuadro magnificado (derecha) muestra el puente hidrógeno entre el hidroxilo de la Treonina-82 y el nitrógeno amídico del Aspártico-162 (arriba), ausente en la mutante (abajo).

recombinante mostraron que, a las concentraciones altas requeridas para la formación de los cristales, la glucogenina existe como dímero (12) (**Fig. 1**). La forma dimérica de la glucogenina lleva a cabo su autoglucosilación intramolecular por mecanismo de glucosilación intersubunidades (13) (**Fig. 2, A**). Pero también la forma monomérica, estado en el que la enzima existe a bajas concentraciones (submicromolar), puede autoglucosilarse por mecanismo intramolecular (14) (**Fig. 2, B**). Esto condujo a determinar que en el dímero los dos mecanismos de glucosilación, intrasubunidad e intersubunidad, se complementan para completar la autoglucosilación (**Fig. 2, C**), y que tanto el dímero como el monómero, pueden alcanzar el mismo grado de autoglucosilación máxima (15). La propiedad autocatalítica de la glucogenina, capaz de iniciar su glucopolimerización inmediatamente después de sintetizada, antes de alcanzar la concentración necesaria para dimerizar, señalan al monómero como la forma molecular con más probabilidad de ser utilizada por la célula para la iniciación de la síntesis de proteoglucógeno. La distancia entre el C1 de la glucosa del UDP-glucosa, unido en el centro activo de la glucogenina, y el hidroxilo de la tirosina aceptora, es de 14 a 20 Å (**Fig. 1**), lejos de los 3 Å requeridos como máximo para la transferencia de la primera

glucosa a la tirosina. Esto plantea la necesidad de un cambio conformacional de la glucogenina para que la reacción pueda ocurrir; un nuevo desafío para avanzar en el conocimiento del mecanismo de autoglucosilación.



**Figura 2.** Esquema del mecanismo de autoglucosilación de glucogenina. A y C, glucosilaciones intradímero, intersubunidades (A) e inter-intrasubunidades (C). B, glucosilación intramonómero. G, UDP-glucosa. Y, Tirosina.

### Confirmación *in vivo* del rol de la glucogenina en la biosíntesis *de novo* de glucógeno

Por biosíntesis *de novo* se entiende la formación de glucógeno desde su inicio, a partir de glucogenina, a diferencia de la biosíntesis producida por la glucógeno sintetasa, para completar glucógeno que ha sido parcialmente deglucosilado por la enzima glucógeno fosforilasa.

La imprescindible participación de la glucogenina en la biosíntesis *de novo* de glucógeno ha sido concluyentemente demostrada en un caso de deficiencia humana de glucógeno (16). Existen dos isoformas de glucogenina humana. La glucogenina-1, con peso molecular 38 kDa y codificada por el gen GYG1, es la isoforma de músculo, también presente en otros tejidos y en menor grado en hígado. La glucogenina-2, con peso molecular 66 kDa y codificada por GYG2, es la isoforma de hígado, que también se expresa en algún grado en otros tejidos pero no en músculo. En la mencionada deficiencia humana de glucógeno, la glucogenina-1 de músculo se expresa pero en forma inactiva, debido a la mutación de un residuo treonina por metionina. La manifestación clínica de esta glucogenosis se presenta con debilidad muscular y falla cardíaca asociada con la ausencia de glucógeno muscular (16). Analizada por difracción

de rayos X (17), la estructura 3D de la forma mutada de la glucogenina no muestra ninguna diferencia con la forma nativa, salvo la pérdida de un puente hidrógeno entre la serina mutada y un residuo aspártico implicado en el centro activo de la enzima, lo que daría cuenta de la inactividad causante de la ausencia del glucógeno muscular (**Fig. 3**).

**Es importante destacar** que la glucogenina existe en la célula unida al glucógeno, no libre (16). Sólo la forma libre es activa, actividad que cesa cuando la glucogenina alcanzan su máximo grado de autoglucosilación (18, 19). Esto convierte al proteoglucógeno en una especie de zimógeno o precursor inactivo de enzima, capaz de convertirse en glucogenina activa y reiniciar la polimerización de glucosa, cuando queda libre de su porción polisacárido, consumida por demanda celular de energía metabólica.

## Bibliografía

- Cardini, C.E., Paladini, A.C., Caputto, R. y Leloir, L.F. Uridine diphosphate glucose: the coenzyme of the galactose-glucose phosphate isomerization. (1950) *Nature*, 164, 191-192.
- Leloir, L.F. y Cardini, C.E. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. (1957) *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 6340.
- Mordoh, J., Leloir, L.F. y Krisman, C.R. In vitro biosynthesis of particulate glycogen. (1965) *Proc. Natnl. Ac. Sci.* 53, 86-90.
- Krisman, C.R. and Barengo, R. A precursor of glycogen biosynthesis:  $\alpha$ -1,4-glucan-protein. (1975) *Eur. J. Biochem.* 52, 117-123.
- Aón, M. A., and Curtino, J. A. Evidence for the glycoprotein nature of retina glycogen. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140, 557-566.
- Aón, M. A., and Curtino, J. A. Protein-bound glycogen is linked to tyrosine residues. (1985) *Biochem. J.* 229, 269-272.
- Rodríguez, I. and Whelan, W. A novel glycosil-amino acid linkage: rabbit muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 829-836.
- Campbell, D.G. and Cohen, P. The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle glycogenin. (1989) *Eur. J. Biochem.* 185, 119-125.
- Pitcher, J., Smythe, C., Campbell, D.G. and Cohen, P. Identification of the 38-kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin. (1987) *Eur. J. Biochem.* 169, 497-502.
- Nimmo, H.G., Proud, C.G. and Cohen, P. The purification and properties of rabbit skeletal muscle glycogen synthase. (1976) *Eur. J. Biochem.* 68, 21-30.
- Viskupic, E., Cao, Y., Zhang, W., Cheng, C., DePaoli-Roach, A. and Roach, P. Rabbit skeletal muscle glycogenin. Molecular cloning and production of fully functional protein in *Escherichia coli*. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25759-25763.
- Gibbons, B.J., Roach, P.J. and Hurley, T.D. Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. (2002) *J. Mol. Biol.* 319, 463-477.
- Lin, V., Mu, J., Yang, J., and Roach, P.J. Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an inter-subunit reaction. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 163-170.
- Bazán, S., Issoglio, F.M., Carrizo, M.E. and Curtino, J.A. The intramolecular autoglucosylation of monomeric glycogenin. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 328-332.
- Issoglio, F.M., Carrizo, M.E., Romero, J.M. and Curtino, J.A. Mechanisms of monomer and dimer glycogenin autoglucosylation. (2012) *J. Biol. Chem.* 287, 1955-1961.
- Moselmi, A-R., Lindberg, C., Nilsson J., Tajsharghi, H., Andersson, B. and Oldfors, A. Glycogenin-1 deficiency and inactivated priming of glycogen synthesis. (2010) *N. England J. Med.*, 362, 1203-1210.
- Carrizo, M.E., Romero, J.M., Issoglio, F.M. and Curtino, J.A. Structural and biochemical insight into glycogenin inactivation by the glycogenosis-causing T82M mutation. (2012) *FEBS Lett.* 586, 254-257.
- Carrizo, M.E., Proteoglucógeno zimógeno, proteoglucógeno activo PG-200 y glucogenina: aislamiento y propiedades estructurales y funcionales. (2000) Tesis Doctoral, CIQUIBIC, CONICET y Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C., Córdoba.
- Romero, J., Carrizo, M., Montich, G. and Curtino, J.A. Inactivation and thermal stabilization of glycogenin by linked glycogen. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 69-74.