

# Glucógeno sintasa del tejido del manto de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

Y. Ruiz Muñoz, P. Suárez Alonso y F. San Juan Serrano

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo. Lagoas-Marcosende, s/n. E-36200 Vigo (Pontevedra), España. Correos electrónicos: yruiz@uvigo.es, psuarez@uvigo.es, fsanjuan@uvigo.es

Recibido en septiembre de 2005. Aceptado en junio de 2007.

## RESUMEN

La enzima glucógeno sintasa del tejido del manto de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 se encuentra principalmente en su forma dependiente (D) de G6P, con una actividad cuatro veces mayor que la forma independiente (I) de G6P. Ambas formas presentan la mayor actividad a pH:7, pero la forma D mantiene el 60 % de su actividad a valores extremos de pH, donde la forma I disminuye la suya al 25 %. La temperatura óptima está entre 30 y 35 °C en ambos casos, pero la forma I es más estable entre 30 y 40 °C. Los datos cinéticos de ambas formas enzimáticas indican la existencia de efectos cooperativos respecto al sustrato y el efector. La constante de afinidad de la forma I para el sustrato UDPG es 1,9-2,3 mM y la de la D es 0,9-1,3 mM. La forma D muestra, además, una constante de activación de 5,2-5,6 mM para el efector G6P.

**Palabras clave:** *Mytilus galloprovincialis*, glucógeno sintasa, características cinéticas.

## ABSTRACT

### *Glycogen synthase in mantle tissue of Mytilus galloprovincialis Lamarck, 1819*

*Glycogen synthase (GS) from Mytilus galloprovincialis Lamarck, 1819 mantle tissue is primarily in G6P-dependent form, whose activity is four times that of the G6P-independent form. Both forms present higher activity to pH: 7, but the D-form maintains 60 % of its maximum activity at extreme pH values, whereas that of the I-form drops to 25 %. The optimum temperature is 30-35 °C for both forms, but the I-form is more stable between 30 and 40 °C. Kinetic data on both enzymatic forms indicate the existence of cooperative effects with regard to the substrate and effector. The I-form affinity constant for the substrate UDPG is 1.9-2.3 mM and that of the D-form is 0.9-1.3 mM. Moreover, the D-form shows an activation constant for the effector G6P of 5.2-5.6 mM.*

**Keywords:** *Mytilus galloprovincialis*, *Glycogen synthase*, *kinetic characteristics*.

## INTRODUCCIÓN

La reproducción y el engorde son aspectos clave en el cultivo de *Mytilus*, y ambos están relacionados con la capacidad de almacenar sustancias de reserva en el tejido del manto, principalmente en forma de glucógeno (80 % del peso seco).

El tejido del manto de *Mytilus* tiene dos funciones fisiológicas: la acumulación de sustancias de reserva y el desarrollo de la gónada, por la que es invadido y que prolifera a sus expensas. Las células del tejido de reserva siguen una evolución inversa al desarrollo gametogénico (Lubet, 1959; Lubet *et al.*, 1976; Lowe, Moore y Bayne, 1982; Villalba,

1995; Danton *et al.*, 1996) que indica una íntima coordinación entre el ciclo gonadal y el del tejido de reserva. De entre los metabolitos acumulados en el tejido del manto de *Mytilus*, el glucógeno constituye el principal soporte energético de la gametogénesis (Lubet, 1959; De Zwaan y Zandee, 1972; Gabbott, 1983; Suárez, 2002).

En la ría de Vigo (Galicia, noroeste de España), la acumulación tiene lugar durante primavera-verano, coincidiendo con los *bloom* fitoplanctónicos. En invierno, la escasez de nutrientes en el medio y el inicio de la gametogénesis imponen la utilización del glucógeno almacenado como principal fuente energética y de precursores biosintéticos (Suárez, 2002). A principios de primavera, coincidiendo con un periodo de intensa y rápida gametogénesis que da lugar a las principales puestas, se observan sucesivos aumentos y caídas del contenido en glucógeno del tejido del manto que indican que *Mytilus* no utiliza directamente la glucosa ingerida, sino que depende del glucógeno almacenado para la maduración de los gametos (Suárez, 2002). Esto entraña la activación simultánea de rutas opuestas como la glucogenogénesis y la glucogenolisis, que en vertebrados están sometidas a un riguroso y antagónico control hormonal, covalente y alostérico.

La enzima clave de la glucogenolisis es la glucógeno fosforilasa. Su existencia en el tejido del manto de *Mytilus*, sus características moleculares y cinéticas y la variación durante la gametogénesis han sido documentadas por San Juan Serrano *et al.* (1991, 1993, 1995a,b, 1998), San Juan Serrano, Sánchez López y García Martín (1995, 1998) y Suárez (2002).

La responsable de la biosíntesis *de novo* del glucógeno es la enzima glucógeno sintasa (GS; EC 2.4.1.11), que utiliza como donador glucosídico la UDP-glucosa (UDPG).

En vertebrados, la GS existe en dos formas interconvertibles entre sí mediante reacciones de fosforilación y desfosforilación: la forma fosforilada, o forma D, dependiente de glucosa-6-fosfato (G6P) y la forma desfosforilada, o forma I, independiente de G6P. A su vez, la forma D se corresponde con la forma inactiva de la enzima, o forma b, mientras que la forma I se corresponde con la forma activa, o forma a, de la enzima. La existencia de esta actividad enzimática ha sido demostrada en *Mytilus edulis* L., 1758 (Cook y Gabbott, 1978).

En previsión de un posterior estudio sobre el especial control que el metabolismo del glucógeno parece ejercer en el tejido del manto de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 durante el desarrollo gametogénico, el presente trabajo pone de manifiesto la actividad glucógeno sintasa en este tejido, optimiza el método de medida de las dos formas de la enzima y las caracteriza cinéticamente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Reactivos

Los sustratos, enzimas auxiliares y coenzimas fueron obtenidos en Sigma Chemical Company. Las sales, tampones y otros productos químicos de análisis eran de la firma Merck.

### Material biológico

Se utilizaron ejemplares de *M. galloprovincialis* recogidos directamente de bateas en la ría de Vigo en febrero de 2004, con tallas entre 8 y 10 cm (medida en su eje mayor) con el objetivo de evitar posibles diferencias debidas a la edad y grado de crecimiento. Los individuos recolectados fueron trasladados al laboratorio. La disección del tejido del manto se realizó tras la apertura de las valvas de 20 de los mejillones seleccionados, seccionando el músculo aductor posterior. Todos los hemimantos fueron escurridos en papel de filtro y reunidos para la obtención inmediata del extracto enzimático.

### Obtención del extracto enzimático

Se partió de una cantidad de 30 g de tejido, que se homogeneizó con tampón Tris-acetato 40 mM, pH:7,0, conteniendo 5 mM de imidazol, 5 mM de EDTA, 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM de NaF y 0,12 M de KCl, en una proporción 1/5 (peso/volumen). El EDTA, como agente acomplejante de iones, es un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa y estabiliza la forma desfosforilada (forma I). El uso de iones  $F^-$  tiene la finalidad de estabilizar la forma fosforilada de la glucógeno sintasa (forma D) por inhibición de la fosfoproteína fosfatasa. El  $\beta$ -mercaptoetanol y el imidazol desempeñan

una función protectora de los restos sulfhidrilo de las estructuras proteínicas, evitando su oxidación, y el KCl se utiliza para mantener la isotonicidad con el tejido del manto de *Mytilus*. El homogeneizado obtenido se centrifugó a  $15\,400 \times g_{av}$  durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante, conteniendo la fracción citosólica, fue filtrado a través de una gasa para eliminar grasas. El extracto bruto así obtenido fue dividido en alícuotas de 1 ml y congeladas a -80 °C hasta su utilización. Previamente a los diversos análisis realizados cada alícuota de solución enzimática fue dializada frente a 30 volúmenes del mismo tampón de extracción durante 30 min a 4 °C en agitación, con el fin de eliminar metabolitos contenidos en la muestra que pudieran interferir en la medida de la actividad enzimática.

#### Determinación de la actividad glucógeno sintasa

La determinación de la actividad GS se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Passonneau y Rottenberg (1973), acoplando la liberación de UDP a su fosforilación a UTP vía piruvato quinasa (PK) y la producción de piruvato en esta reacción a la oxidación de NADH vía lactato deshidrogenada (LDH). La disminución de densidad óptica (DO) provocada por la desaparición de NADH se midió espectrofotométricamente a 340 nm en relación con el tiempo. La mezcla de reacción empleada, en un volumen de 1 ml, contenía tampón Tris-acetato 40 mM, pH:7,0, imidazol 5 mM, EDTA 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,4 mM, NaF 10 mM, acetato magnésico 5 mM, UDPG 5 mM, glucógeno 2 mg/ml, G6P 10 mM, PEP 5 mM, NADH 0,15 mM, 3 unidades internacionales (UI) PK, 5 UI LDH y 20  $\mu$ l de muestra. Preparada la mezcla de reacción, se incubó durante 20 minutos a 20 °C y posteriormente se midió el descenso de absorbancia también durante 20 min.

Se midió así la actividad conjunta de las dos formas presentes en el extracto enzimático (I + D). La forma I se midió en las mismas condiciones en ausencia de G6P. Posteriormente, la actividad de la forma D se calculó como la diferencia de la actividad conjunta (I + D) y la actividad de la forma I. La actividad enzimática se expresó en UI, medida definida como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de 1 mmol de glucógeno por minuto en las condiciones de ensayo.

#### Puesta a punto del método de medida de la actividad enzimática

Para la puesta a punto del método se estableció la concentración óptima de sustrato a la cual la enzima de *Mytilus* alcanza la actividad máxima de reacción, así como la linealidad de la actividad enzimática frente al tiempo de reacción. Para determinar la concentración saturante de sustrato se midió la reacción de la enzima a concentraciones crecientes del mismo (0,5-6 mM). Para determinar la concentración óptima de efector se midió la reacción de la enzima a concentraciones crecientes del mismo (4-14 mM). Para determinar la linealidad de la reacción y el tiempo necesario de incubación, se midió su actividad a diferentes tiempos hasta 40 min.

#### Determinación del pH óptimo

El pH óptimo de la glucógeno sintasa fue determinado analizando el efecto de este parámetro sobre la actividad de cada forma enzimática (I y D). Los ensayos se realizaron a 20 °C utilizando una mezcla de tampones tris-maleato y acético-acetato en concentraciones variables para obtener el valor de pH deseado en cada medida. El rango de valores de pH utilizado fue de 3 a 5,5 con el tampón acético-acetato y de 5,5 a 9,5 con el tris-maleato.

#### Efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura, tanto sobre la estabilidad como sobre la velocidad de reacción de ambas formas enzimáticas. Para determinar la temperatura óptima se ensayó la actividad enzimática en un rango de temperaturas de 5 a 55 °C. Para el estudio de la termoestabilidad se incubaron las muestras durante 1 h a diferentes temperaturas entre 15 y 50 °C. Transcurrido este tiempo, se ensayó la actividad enzimática como se describe en apartados anteriores.

#### Propiedades cinéticas

Las variables y constantes cinéticas fueron analizadas bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura determinadas previamente, variando respectivamente las concentraciones de sustrato y efector

en la mezcla de reacción entre rangos de 0,5 a 6 mM de UDPG y de 4 a 14 mM de G6P. Para el análisis cinético se emplearon las representaciones de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk,  $1/V$  frente a  $1/[S]^2$  y de Hill.

En las representaciones gráficas de estas variables cada punto corresponde a la media de tres determinaciones independientes, y las diferentes rectas de regresión y sus coeficientes de correlación han sido calculados teniendo en cuenta todos los ensayos realizados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Linealidad de la actividad enzimática en función del tiempo

La linealidad de la reacción de la glucógeno sintasa se determinó midiendo la actividad enzimática en función del tiempo de reacción (figura 1A). Puede observarse un aumento de la actividad enzimática proporcional al tiempo de reacción desde los primeros 20 minutos, en los que la reacción comienza a ser estable, hasta los 40 min. Se establecieron así sendos periodos de 20 min para la incubación de la mezcla de reacción y la medida de la actividad enzimática. Se observa también en esta gráfica que la forma D presenta una actividad cuatro veces mayor que la forma I, reflejando que la enzima glucógeno sintasa del manto de *Mytilus* se encuentra principalmente en su forma dependiente de G6P.

### Determinación del pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad de la glucógeno sintasa del tejido del manto de *Mytilus* se recoge en la figura 1B. Las dos formas de la enzima (I y D) presentan un pH óptimo de 7,0, similar al descrito para la enzima de hígado humano y de rata (Westphal y Nuttall, 1992) y dentro del amplio rango citado en la bibliografía para esta enzima (desde pH:6,0 hasta pH:9,0) (Brown y Larner, 1971; Issa y Mendicino, 1973; Killilea y Whelan, 1976; Hanigan, Donahue y Masaracchia, 1985).

Aunque no se observa una diferencia significativa entre los óptimos encontrados para ambas formas de la enzima del manto de *Mytilus*, la forma D conserva más del 60 % de su actividad a valores de pH extremos, donde la actividad de la forma I cae

hasta valores inferiores al 25 %. La diferencia de actividad entre las dos formas parece más notable en la parte ácida del rango de pH.

El mejillón es un organismo que presenta en muchos momentos una acusada dependencia del metabolismo anaeróbico, el cual conlleva una disminución del rendimiento energético y la acumulación de productos finales como cetoácidos, que disminuyen el pH del entorno celular. La síntesis de glucógeno a partir de glucosa requiere un paso previo de activación de la glucosa para originar UDPG, proceso que consume energía. La disminución del pH cuando el metabolismo anaeróbico se incrementa podría implicar en el manto de *Mytilus* un factor de control de la actividad de la glucógeno sintasa I, disminuyendo, de esta forma, el gasto energético.

### Determinación de la temperatura óptima

La temperatura es uno de los principales factores ambientales determinantes de la velocidad del metabolismo en animales poiquiloterms, principalmente de hábitats intermareales, como *Mytilus*. Estos organismos, aunque son incapaces de regular su temperatura corporal frente al medio externo, presentan mecanismos de aceleración o disminución de su metabolismo, así como modificaciones de la actividad de moléculas particulares que los mantienen relativamente protegidos de los cambios bruscos de temperatura.

Los resultados de temperatura óptima obtenidos para ambas formas de la glucógeno sintasa se muestran en la figura 1C. La forma I parece responder a temperaturas algo mayores que la forma D, alcanzando su actividad máxima a 35 °C, mientras que la forma D lo hace a temperaturas más bajas y alcanza su máxima actividad a 30 °C. Estos valores de temperatura óptima obtenidos para la enzima de *Mytilus* se encuentran dentro del rango de temperaturas óptimas descritas para esta enzima en otras especies (Takahara y Matsuda, 1978; Westphal y Nuttall, 1992). A temperaturas extremas (5 y 55 °C), la actividad de ambas formas disminuye hasta alcanzar valores mínimos. El descenso de actividad a altas temperaturas es debido al aumento de la agitación térmica de las moléculas de enzima y sustrato, y a la desnaturalización térmica de la enzima. A bajas temperaturas, el descenso de la actividad es provocada por la disminución de la energía cinética de las moléculas (Robyt y Whelan, 1968).

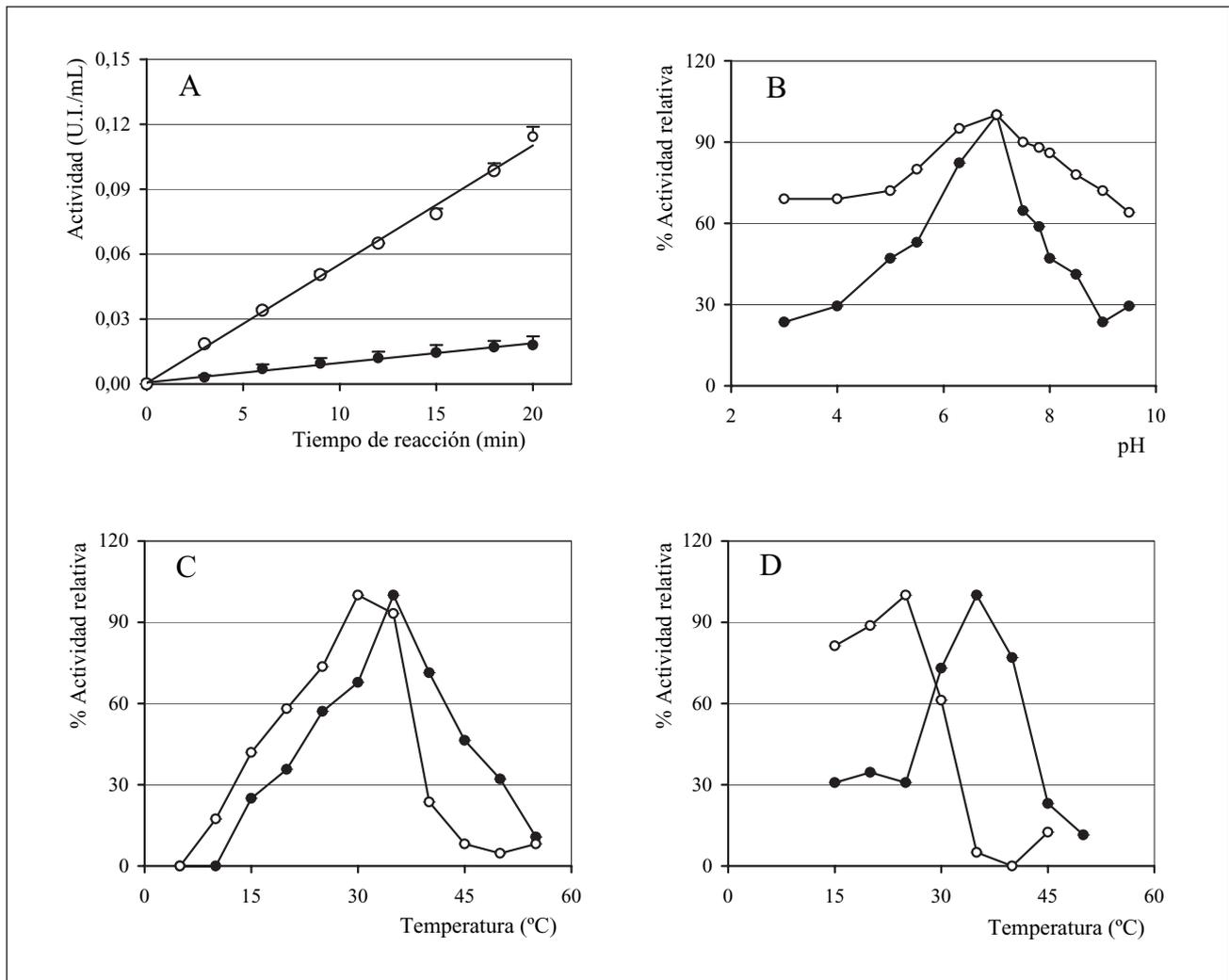


Figura 1. Actividad glucógeno sintasa del tejido del manto de *M. galloprovincialis*. (●): forma I; (○): forma D. (A): linealidad de la reacción enzimática; (B): efecto del pH sobre la actividad; (C): efecto de la temperatura sobre la actividad; (D): estabilidad térmica.

### Determinación de la termoestabilidad

La estabilidad de la enzima fue determinada como su actividad residual después de una hora de incubación a cada temperatura indicada. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1D. Las dos formas de la glucógeno sintasa (I y D) presentan diferentes márgenes de estabilidad térmica. La forma I conserva una alta actividad entre 30-40 °C y la forma D entre 20 y 30 °C.

Aunque los ejemplares de mejillón utilizados en este estudio proceden de sistemas de cultivo (bateras) constantemente sumergidos, el hábitat natural de esta especie es la zona intermareal, donde principalmente se recoge la semilla que es encordada para su engorde en batea. En determinadas condiciones de bajamar y exposición solar, el mejillón

puede alcanzar temperaturas críticas de hasta 38-40 °C en el interior de las valvas (Bayne, Widows y Thompson, 1976). Teniendo esto en cuenta, los resultados mostrados parecen indicar que la temperatura podría constituir otro importante factor de control de esta enzima en el manto de *Mytilus* y su significado adaptativo deberá ser analizado en posteriores trabajos.

### Propiedades cinéticas de la forma independiente de G6P (forma I)

Como primera aproximación al estudio cinético de la forma desfosforilada e independiente de G6P de la enzima de *Mytilus*, se analizó el efecto de la concentración de su sustrato, UDPG. La represen-

tación de Michaelis-Menten de velocidad de reacción ( $V$ ) frente a la concentración del sustrato ([UDPG]) muestra una clara interrupción o quiebro para el valor 4 mM (figura 2A). Igualmente, la representación de Lineweaver-Burk de dobles recíprocos ( $1/V$  frente a  $1/[S]$ ) no se ajusta a una recta, sino que, a concentraciones por encima y por debajo de 4 mM, parece seguir dos cinéticas diferentes (figura 2B). Esta tendencia indica la presencia de dos o más formas enzimáticas en la preparación, con distintas velocidades máximas y constantes de afinidad. La diferencia entre las dos partes de la representación se acentúa con el aumento de la diferencia entre los valores de sus variables cinéticas (Segel, 1993).

A concentraciones por debajo de 4 mM de UDPG la representación de dobles recíprocos no es lineal, indicando cooperatividad e inhibición por sustrato. Para el cálculo de las constantes cinéticas en este rango de concentraciones se utilizaron las representaciones de  $1/V$  frente a  $1/[S]^2$  y la representación de Hill ( $\log V/(V_{\text{máx}} - V)$  frente a  $\log [\text{UDPG}]$ ) (Segel, 1993), obteniendo valores de  $K_{0,5}$  de 1,9 mM y  $V_{\text{máx}}$  de 0,013 UI y valores de  $S_{0,5}$  de 2,3 mM, respectivamente (figura 2C,D). Este valor de la constante de afinidad es similar a los citados en la bibliografía para la forma independiente (I) de la glucógeno sintasa de *M. edulis* (Cook y Gabbott, 1978). El cálculo del índice de Hill ( $n_H$ ) a partir de la representación de  $\log V/(V_{\text{máx}} - V)$  frente a  $\log [\text{UDPG}]$  arroja valores de 1,9 (figura 2D), mientras que algunos autores citan valores cercanos a 1 para la forma I de la GS (Roach, Takeda y Larner, 1976). Según Segel (1993), este índice indica el número de sitios de unión del sustrato por molécula de enzima, por lo que un valor de 1,9 sugiere que la forma I de la GS de manto de *Mytilus* presenta un segundo sitio de unión diferente del centro activo.

A concentraciones de UDPG superiores a 4 M, la representación parece seguir una cinética michaeliana, y las variables  $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$ , calculadas a partir de la representación de Lineweaver-Burk, fueron 11,65 mM y 0,015 UI respectivamente. Este valor de  $K_m$  es muy superior a los citados en la bibliografía, que se encuentran entre 0,113 y 2,8 mM (Passoneau, Schwartz y Rottenberg, 1975; Cook y Gabbott, 1978).

En el caso de la enzima de *Mytilus*, este comportamiento podría indicar la presencia de una forma totalmente independiente del efector (I) y otra for-

ma dependiente del efector (D) con una actividad residual en ausencia del mismo y afinidad muy baja por el sustrato (alta  $K_m$ ), y no tanto reflejar la existencia de más de una forma I de la GS. Algo similar está descrito para la enzima glucógeno fosforilasa del manto de *Mytilus*, cuya forma dependiente de AMP, en ausencia de este activador, muestra una actividad mínima y la pérdida de los efectos alostéricos y cooperativos (San Juan *et al.*, 1993).

### Propiedades cinéticas de la forma dependiente de G6P (forma D)

La forma fosforilada y dependiente de G6P de la GS de manto de *Mytilus*, también presenta una peculiar cinética no lineal respecto a su sustrato UDPG. En este caso, se observa también una interrupción o quiebro para el valor 4 mM de UDPG (figura 3A) y la representación de Lineweaver-Burk de dobles recíprocos ( $1/V$  frente a  $1/[S]$ ) no se ajusta a una recta, sino que presenta dos tramos discontinuos (figura 3B). De forma similar a lo ya discutido, esta tendencia podría indicar la presencia de más de una forma D o bien la coexistencia en el extracto de las dos formas de la enzima: dependiente e independiente del efector G6P.

La representación de Lineweaver-Burk a concentraciones de UDPG inferiores a 4 mM tampoco es lineal (figura 3B), y para el cálculo de sus constantes cinéticas se recurrió a su transformación en lineal mediante la representación de  $1/V$  frente a  $1/[S]^2$  (Segel, 1993) (figura 3C). De esta forma se obtuvieron los valores 0,040 UI/ml de  $V_{\text{máx}}$  y 0,9 mM de  $K_{0,5}$  para la UDPG, que se encuentran dentro del rango en el que varían los descritos en la bibliografía para la forma D (Passoneau, Schwartz y Rottenberg, 1975; Huang y Robinson, 1976). La representación de Hill (figura 3D) corrobora el valor de  $K_{0,5}$ , con un valor de  $S_{0,5}$  de 1,3 mM. Sin embargo, en este caso, el índice  $n_H$  presenta un valor de 0,9, indicativo de un único sitio de unión para la UDPG sobre la estructura de la enzima. La comparación de este valor del índice  $n_H$  con el obtenido para la forma no fosforilada e independiente de G6P (forma I) ( $n_H = 1,9$ ) parece sugerir que la fosforilación de la enzima conlleva un enorme aumento de la afinidad del sitio efector por la G6P, y que en la forma no fosforilada independiente de la G6P el sitio secundario de unión de la UDPG descrito podría corresponderse con el sitio del efector

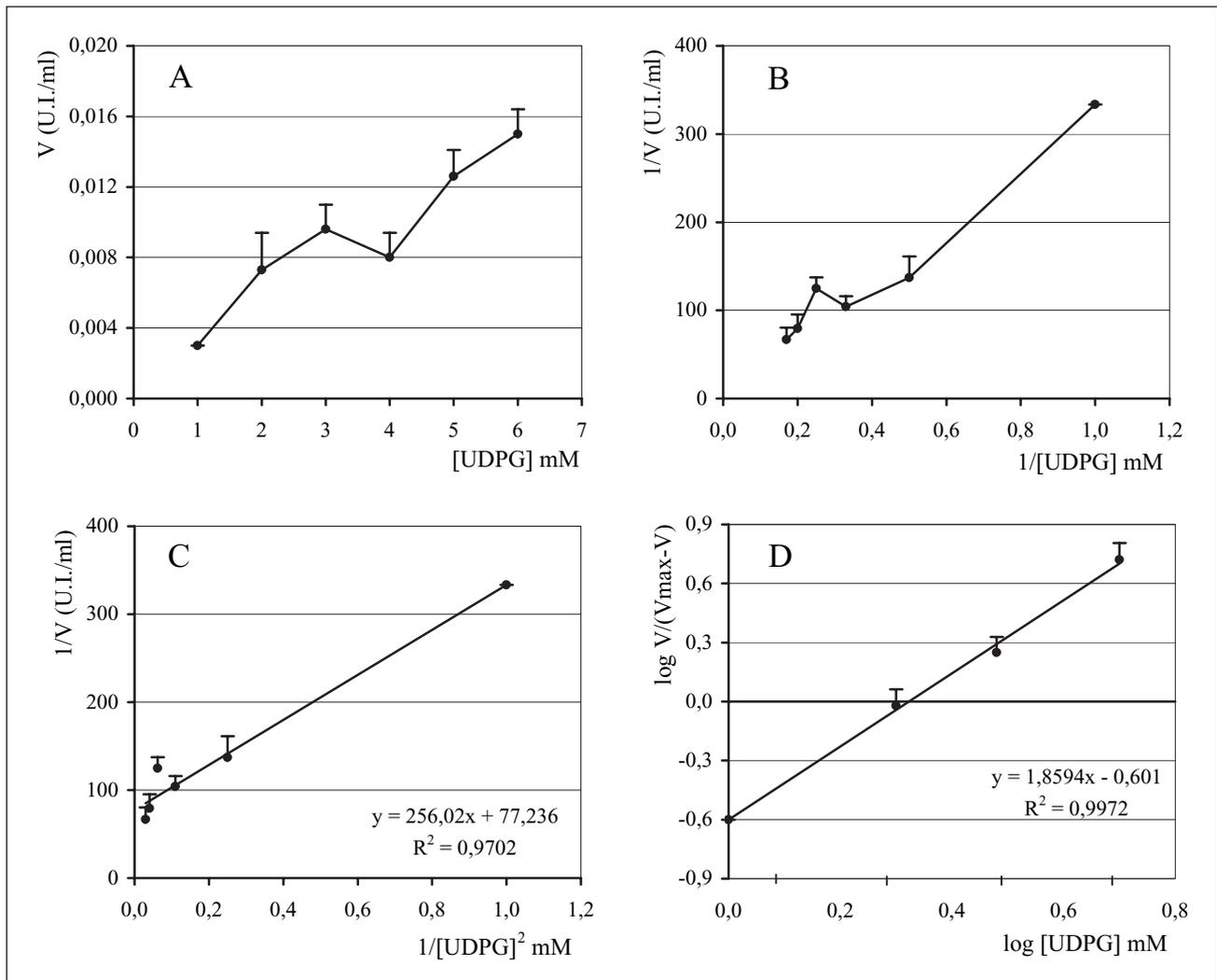


Figura 2. Cinética de la forma independiente de G6P (forma I) de la enzima glucógeno sintasa del tejido del manto de *M. galloprovincialis* respecto al sustrato UDPG. (A): representación de Michaelis-Menten ( $V$  frente a  $[UDPG]$ ); (B): representación de Lineweaver-Burk ( $1/V$  frente a  $1/[UDPG]$ ); (C): representación de  $1/V$  frente a  $1/[UDPG]^2$  a concentraciones inferiores a 4 mM; (D): representación de Hill ( $\log V/(V_{máx} - V)$  frente a  $\log [UDPG]$ ).

alostérico. La  $V_{máx}$  de esta forma es aproximadamente cuatro veces mayor que la de la forma I, y la afinidad por su sustrato es dos veces mayor, a pesar de estar considerada en vertebrados como una forma inactiva o menos activa (forma b).

La glucógeno sintasa es una enzima polimérica cuya dependencia del efector G6P viene determinada por la modulación covalente por fosforilación (Killilea y Whelan, 1976; Huang y Cabib, 1974; Cook y Gabbott, 1978). En algunos organismos se han descrito formas parcialmente fosforiladas, con características de actividad intermedias entre la forma fosforilada y la no fosforilada (Brown y Larner, 1971; Issa y Mendicino, 1973; Lin y Segal, 1973). Se analizó también la dependencia y el efecto del modulador G6P sobre la forma D de la enzima de

*Mytilus*. Para ello se midió la actividad enzimática a saturación de sustrato (5 mM) y variando la concentración de G6P entre 4 y 14 mM. Este rango de concentraciones de G6P fue determinado a partir de las concentraciones utilizadas por otros autores para la medida de la forma D (Passoneau, Schwartz y Rottenberg, 1975; Cook y Gabbott, 1978; Hanigan, Donahue y Masaracchia, 1985). Se observó un efecto inhibitorio a concentraciones superiores a 11 mM de G6P no representado en las gráficas. Entre 4 y 10 mM de G6P, la cinética respecto al efector es ligeramente sigmoide, y la representación de Lineweaver-Burk se aleja de la linealidad (figura 4A,B).

A partir de la representación de  $1/V$  frente a  $1/[S]^2$  se obtuvieron los valores 0,06 UI de  $V_{máx}$  y

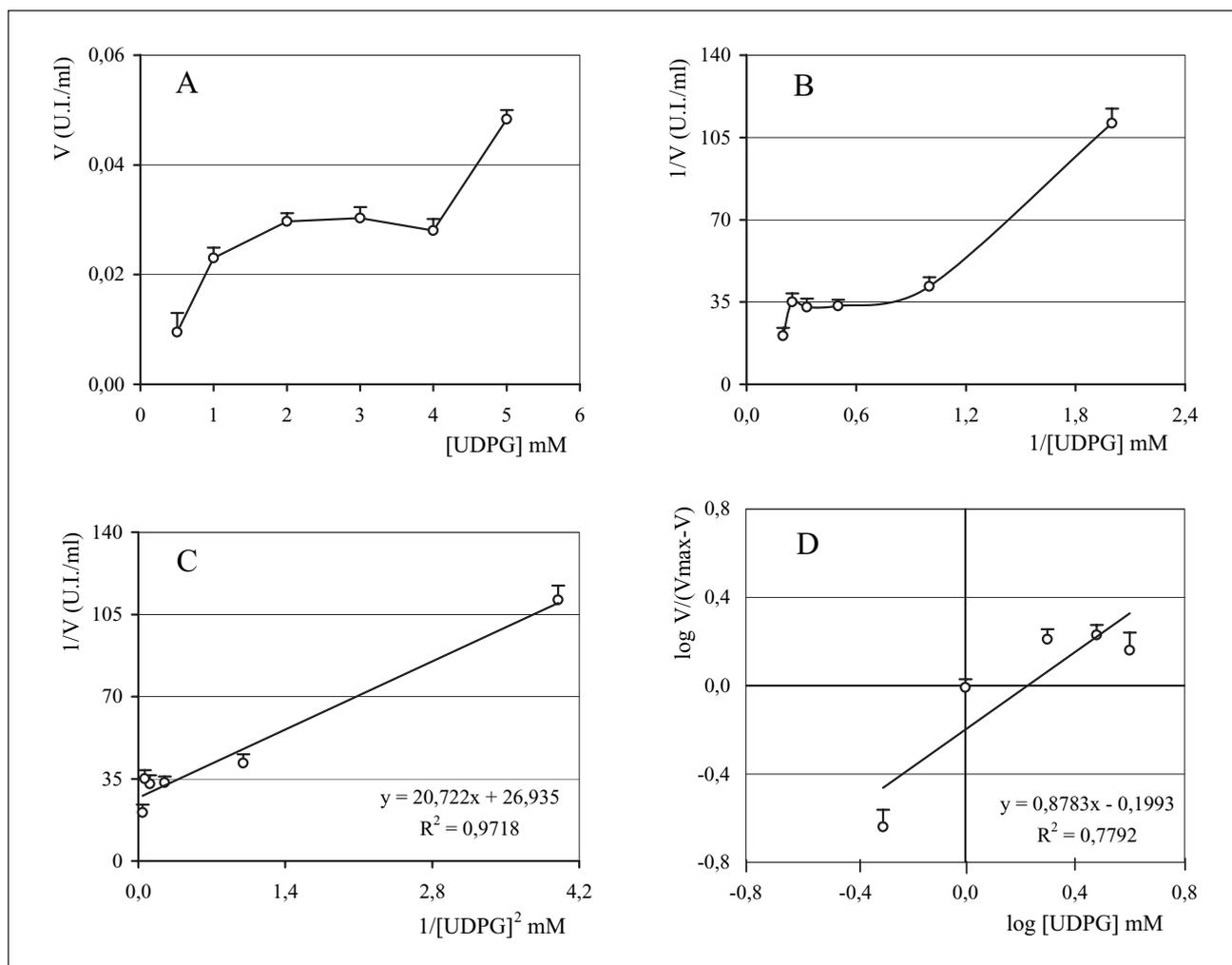


Figura 3. Cinética de la forma dependiente de G6P (forma D) de la enzima glucógeno sintasa del tejido del manto de *M. galloprovincialis* respecto al sustrato UDPG en presencia de 10 mM del efector G6P. (A): representación de Michaelis-Menten (V frente a [UDPG]); (B): representación de Lineweaver-Burk (1/V frente a 1/[UDPG]); (C): representación de 1/V frente a 1/[UDPG]<sup>2</sup>; (D): representación de Hill ( $\log V/(V_{\max} - V)$  frente a  $\log [UDPG]$ ).

5,6 mM de  $K_{0,5}$  (figura 4C). La representación de Hill ofrece el valor 5,2 de  $S_{0,5}$ , confirmando así el obtenido a partir de la representación anterior. El valor del índice  $n_H$  es 2,3 (figura 4D), indicando más de un sitio de unión para el efector sobre la estructura de la enzima. Este sitio de unión secundario de la G6P podría corresponder al centro activo, de forma que a altas concentraciones desplazaría al sustrato, provocando un efecto inhibitor. Estos datos sugieren que la G6P desempeña un papel importante en la activación y regulación de la actividad glucógeno sintasa de este organismo. No obstante, estos resultados respecto a la enzima glucógeno sintasa del manto de *Mytilus* deberán ser confirmados tras la separación y purificación de cada una de las posibles formas existentes, con un estudio más profundo a escala molecular.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está incluido dentro de un proyecto subvencionado por la Xunta de Galicia (PGI-DIT03RMA30102PR) y la Universidad de Vigo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bayne, B. L., J. Widdows y R. J. Thompson. 1976. Physiological integrations. En: *Marine Mussels: their Ecology and Physiology*. B. L. Bayne (ed.): 261-299. Cambridge University Press. Londres.
- Brown, N. E. y J. Larner. 1971. Molecular characteristics of the totally dependent and independent forms of glycogen synthase of rabbit skeletal muscle. I. Preparation and characteristics of the totally glucose-6-phosphate dependent form. *Biochim. Biophys. Acta* 242: 69-80.

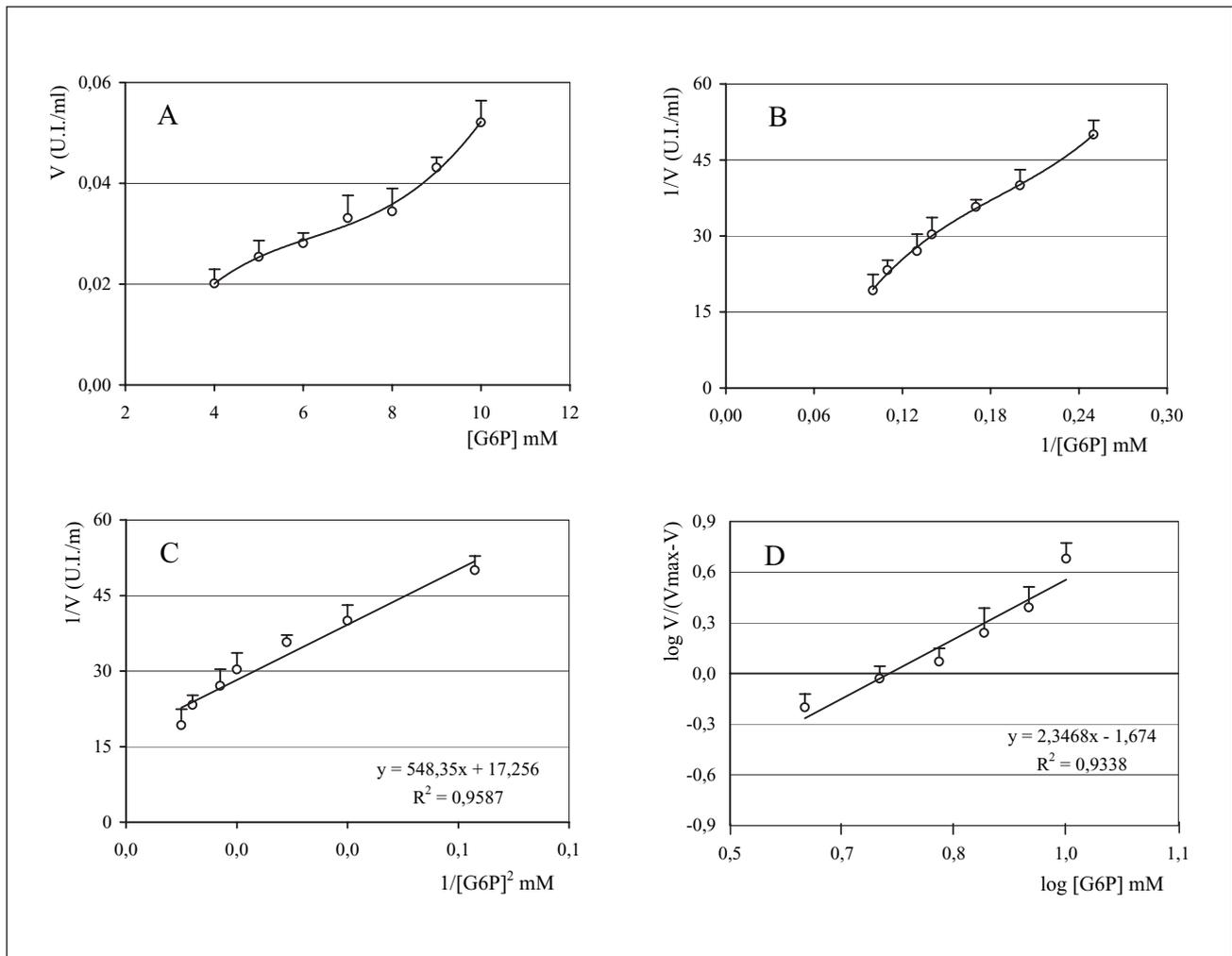


Figura 4. Cinética de la forma dependiente de G6P (forma D) de la enzima glucógeno sintasa del tejido del manto de *M. galloprovincialis* respecto al efector G6P a saturación de sustrato (UDPG) (5 mM). (A): representación de Michaelis-Menten ( $V$  frente a  $[G6P]$ ); (B): representación de Lineweaver-Burk ( $1/V$  frente a  $1/[G6P]$ ); (C): representación de  $1/V$  frente a  $1/[G6P]^2$ ; (D): representación de Hill ( $\log V/(V_{\max} - V)$  frente a  $\log [G6P]$ ).

- Cook, M. J. y P. A. Gabbott. 1978. Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. I. Purification, interconversion and kinetic properties of the I and D forms. *Comp. Biochem. Physiol.* 60 B: 419-421.
- Danton, E., M. Kiyomoto, A. Komaru, K. T. Wada, M. Awaji y M. Mathieu. 1996. Comparative analysis of storage tissue and insulin-like neurosecretion in diploid and triploid mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in relation to their gametogenesis cycle. *Invertebr. Reprod. Dev.* 29: 37-46.
- De Zwaan, A. y D. I. Zandee. 1972. Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 43 A: 53-58.
- Gabbott, P. A. 1983. Developmental and seasonal changes metabolic activities in marine molluscs. En: *The Mollusca, Environmental Biochemistry and Physiology*. P. W. Hochachka (ed.) 2: 165-217. Academic Press. Nueva York.
- Hanigan, L. L., M. J. Donahue y R. A. Masaracchia. 1985. Comparative purification and characterization of inver-

- tebrate muscle glycogen synthetase from the porcine parasite *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* 260: 16099-16105.
- Huang, K. P. y E. Cabib. 1974. Yeast glycogen synthetase in the glucose-6-phosphate-dependent. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 249: 3851-3857.
- Huang, K. P. y J. C. Robinson. 1976. A rapid and sensitive assay method for protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 583-589.
- Issa, H. A. y J. Mendicino. 1973. Role of enzyme-enzyme interactions in the regulation of glycolysis and gluconeogenesis. Properties of glycogen synthetase isolated from wine kidney. *J. Biol. Chem.* 248: 685-696.
- Killilea, S. D. y W. J. Whelan. 1976. Purification and properties of rabbit liver glycogen synthetase. *Biochem.* 15: 1349-1356.
- Lin, D. C. y H. L. Segal. 1973. Homogeneous glycogen synthetase b from liver. *J. Biol. Chem.* 248: 7007-7011.
- Lowe, D. M., M. N. Moore y B. L. Bayne. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. (UK)* 62: 133-145.

- Lubet, P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et las Pectinidés. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 23: 389-545.
- Lubet, P., P. Herlin, M. Mathieu y F. Collin. 1976. Tissu de réserve et cycle sexuel chez les Lamelibranches. *Haliotis* 7: 59-62.
- Passoneau, J. V. y D. A. Rottenberg. 1973. An assessment of methods for measurement of glycogen synthetase activity including a new one-steo assay. *Anal. Biochem.* 51: 528-541.
- Passoneau, J. V., J. P. Schwartz y D. A. Rottenberg. 1975. The partial purification and properties of pig brain glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 250: 2287-2292.
- Roach, P. J., Y. Takeda y J. Larner. 1976. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. I. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 251: 1913-1919.
- Robyt, J. F. y W. J. Whelan. 1968. The  $\alpha$ -amylases. En: *Starch and its derivates*. J. A. Radley (ed.): 430-476. Chapman and Hall. Londres.
- San Juan Serrano, F., M. Fernández González, J. L. Sánchez López y L. O. García Martín. 1991. Purification and molecular properties of glycogen phosphorylase b from mantle tissue of mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 98 B: 33-39.
- San Juan Serrano, F., M. Fernández González, J. L. Sánchez López y L. O. García Martín. 1993. A kinetic study of glycogen phosphorylase b from mantle tissue of mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 B: 925-932.
- San Juan Serrano, F., M. Fernández González, J. L. Sánchez López y L. O. García Martín. 1995a. Modification of kinetic parameters of glycogen phosphorylase from mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis* by a phosphorylation mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 917-922.
- San Juan Serrano, F., M. Fernández González, J. L. Sánchez López y L. O. García Martín. 1995b. Molecular mechanism of the control of glycogenolysis by calcium ions and cycle AMP in the mantle of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 110 B: 577-582.
- San Juan Serrano, F., J. L. Sánchez López y L. O. García Martín. 1995. Caffeine inhibition of glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle tissue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 911-916.
- San Juan Serrano, F., J. L. Sánchez López y L. O. García Martín. 1998. Regulation by ATP and energy charge of glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle. *Comp. Biochem. Physiol.* 120 B: 483-491.
- San Juan Serrano, F., P. Suárez Alonso, S. L. Blanco López y L. O. García Martín. 1998. Regulation of *Mytilus galloprovincialis* glycogen phosphorylase by glucose and glucose-6-phosphate. *J. Shellfish Res.* 17: 159-163.
- Segel, I. H. 1993. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. J. Wiley and Sons. Nueva York: 57-71 y 346-382.
- Suárez, P. 2002. *Rutas glucogenolíticas en el tejido del manto de Mytilus galloprovincialis Lmk. y su incidencia en el desarrollo gametogénico*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. Vigo (Pontevedra), España: 158-164 y 180-187.
- Takahara, H. y K. Matsuda. 1978. Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. Kinetic mechanism of UDP-glucosa: glycogen 4- $\alpha$ -glucosyltransferase. *Biochim. Biophys Acta* 522: 363-374.
- Villalba, A. 1995. Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 130: 269-277.
- Westphal, J. A. y F. Q. Nuttall. 1992. Comparative characterization of human and rat liver glycogen synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 479-486.