

11. Enfermedad de Lafora: epilepsia y regulación del metabolismo de glucógeno por laforina y malina

DAVID VÍLCHEZ, SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA
Y
JOAN J. GUINOVART

RESUMEN

Normalmente las neuronas no almacenan glucógeno. Sin embargo, en determinadas patologías acumulan unas inclusiones formadas principalmente por polímeros de glucosa poco ramificados que podrían ser considerados moléculas de glucógeno aberrantes. El caso más impactante es el de la enfermedad de Lafora, una patología neurodegenerativa y con dramáticas consecuencias. La enfermedad se asocia con alteraciones en dos proteínas, laforina y malina. Por este motivo analizamos la capacidad de las neuronas para sintetizar glucógeno, las consecuencias de su acumulación en estas células y la función de laforina y malina. Mostramos que las neuronas poseen la maquinaria para sintetizar glucógeno ya que expresan la isoforma muscular de la glucógeno sintasa (MGS). Sin embargo, esta enzima se encuentra altamente fosforilada, por lo que se mantiene inactiva. No obstante, el incremento de los niveles de PTG, una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 que le permite interaccionar con MGS y estimular su desfosforilación, induce la síntesis de glucógeno en neuronas. Sorprendentemente, estas células entran en apoptosis cuando acumulan glucógeno. Por otra parte, la formación de un complejo entre laforina y malina, estimula la degradación a través del sistema ubiquitina-proteasoma de MGS y PTG lo que contribuye a asegurar el silenciamiento de la síntesis de glucógeno. Nuestros resultados ofrecen una explicación a la acumulación de polímeros de glucosa en la enfermedad de Lafora al demostrar una función crucial de laforina y malina en la regulación de la síntesis de glucógeno.

Palabras clave: Neurodegeneración. Apoptosis. Cuerpos de poliglucosano. Glucógeno sintasa. Proteasoma.

ABSTRACT

Lafora disease: epilepsy and glycogen metabolism control by laforin and malin

Glycogen deposition is normally absent in neurons. However, inclusion bodies resembling abnormal glycogen accumulate in several neurological diseases, particularly in Lafora disease, a neurodegenerative disorder that results in progressive myoclonus epilepsy and death. Lafora disease is caused by mutations in either malin or laforin. On the basis of this observation, we analyzed the capacity of neurons to synthesize glycogen, the consequences of glycogen accumulation for these cells and the role of laforin and malin. Here we show that mouse neurons have the enzymatic machinery for synthesizing glycogen but that it is suppressed by retention of muscle glycogen synthase (MGS) in the phosphorylated, inactive state. However, overexpression of PTG, which brings protein phosphatase 1 to MGS for activation, markedly increases glycogen accumulation. Surprisingly, glycogen accumulation induces apoptosis in neurons. This suppression is further ensured by a complex of laforin and malin. The laforin-malin complex causes proteasome-dependent degradation of both PTG and MGS, thereby ensuring a blockade of neuronal glycogen synthesis even under intense glycolytic conditions. Here we explain the formation of polyglucosan inclusions in Lafora disease by demonstrating a crucial role for laforin and malin in glycogen synthesis.

Keywords: Neurodegeneration. Apoptosis. Polyglucosan bodies. Glycogen synthase. Proteasome.

Abreviaturas: **MGS**, Glucógeno sintasa muscular; **PTG**, *Protein targeting to glycogen*; **ATP**, Adenosina 5'-trifosfato; **PAS**, *Periodic-acid Schiff*; **PGBs**, Cuerpos de poliglucosano (*Polyglucosan Bodies*); **EPM2A**, *Epilepsy of progressive myoclonus type2 gene A*; **EPM2B**, *Epilepsy of progressive myoclonus type2 gene B*; **GS**, Glucógeno sintasa; **RT-PCR**, Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa; **LGS**, Glucógeno sintasa hepática; **GFAP**, Proteína fibrilar ácida de la glía; **GP**, Glucógeno fosforilasa; **G6P**, Glucosa 6-fosfato; **GK**, Glucoquinasa; **HKI**, Hexoquinasa I; **GSK3**, Glucógeno sintasa quinasa 3; **AMPK**, Quinasa estimulada por AMP; **PP1**, Proteína fosfatasa de tipo 1; **N2a**, Neuro2a; **siRNA**, Oligonucleótidos de RNA de interferencia; **GFP**, Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*); **AdCMV-GK**, Adenovirus recombinante que codifica para la GK; **AdCMV-HKI**, Adenovirus recombinante que codifica para la HKI de rata; **MOI**, Multiplicidad de infección; **AdCMV-MGS**, Adenovirus recombinante que codifica para la MGS humana; **AdCMV-GFP-MGS**, Adenovirus recombinante que codifica para la MGS humana fusionada a GFP; **AdCMV-PTG**, Adenovirus recombinante que codifica para la PTG de ratón fusionada a GFP; **AdCMV-GFP**, Adenovirus recombinante que codifica para GFP; **AdCMV-laf**, Adenovirus recombinante que codifica para la laforina humana; **AdCMV-malina**,

El cerebro de los mamíferos contiene glucógeno pero a unas concentraciones muy inferiores a las que se encuentran en otros tejidos como el hígado o el músculo esquelético. De hecho, la proporción de glucógeno entre hígado/músculo esquelético/cerebro es de 100:10:1 (1). Además, el glucógeno cerebral se halla casi exclusivamente en los astrocitos, mientras que las neuronas no lo acumulan (2-4).

Se acepta generalmente que el sistema nervioso central es dependiente de la glucosa como sustrato energético y que se encuentra a merced de la circulación sistémica para obtener una entrega de glucosa constante e interrumpida (5-7) ya que el glucógeno contenido en el cerebro bastaría sólo para unos pocos minutos. Aunque la función fisiológica de este glucógeno no ha sido del todo aclarada, se le han asignado dos importantes funciones como suministrador de sustratos energéticos en el cerebro: 1) bajo condiciones hipoglucémicas cuando el suministro de glucosa es insuficiente para afrontar los requerimientos inmediatos de energía (2, 3, 8, 9), y 2) durante periodos de incremento transitorio de la demanda energética, en los que la glucosa que llega por la circulación sistémica es insuficiente (2, 3, 8). Se acepta que, en estas condiciones, el glucógeno de los astrocitos suministraría a las neuronas un sustrato energético suplementario a la glucosa. Toda una serie de observaciones han permitido llegar a esta conclusión: el contenido de glucógeno en el cerebro incrementa durante el sueño (10, 11) y la anestesia (1, 12, 13), con la consiguiente movilización de este polisacárido al despertar o volver a estar consciente. También se ha observado que la estimulación del cerebro induce glucogenolisis, hecho que relaciona la actividad fisiológica neuronal con la utilización de glucógeno (14, 15). Esta glucogenolisis tiene lugar durante períodos de incrementada demanda energética del cerebro incluso en condiciones de normoglicemia (8).

El metabolismo del glucógeno cerebral es un claro ejemplo del acoplamiento entre neuronas y glía. Los neurotransmisores y neuromoduladores movilizan las reservas del polisacárido de los astrocitos (2, 8, 16, 17). Varias observaciones contribuyen a pensar que éste da lugar a lactato que es exportado al espacio extracelular de donde es captado por las neuronas para ser utilizado como combustible aeróbico durante períodos de incrementada actividad axonal (2, 18, 19). Así, las neuronas son capaces de funcionar si la glucosa es substituida por el

Adenovirus recombinante que codifica para la malina humana de tipo salvaje fusionada al epítipo de hemaglutinina (HA); **AdCMV-malina-D146N**, Adenovirus recombinante que codifica para la malina humana mutante D146N fusionada HA; **GAPDH**, Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; **SP**, Estaurosporina.

lactato como combustible (20, 21) y el glucógeno de los astrocitos se moviliza rápidamente durante la hipoglucemia y aparece principalmente como lactato extracelular (18). Además, el bloqueo de la degradación del glucógeno de los astrocitos o del transporte de lactato de estas células a los axones reduce de manera acelerada la actividad neuronal (22).

Por lo tanto, a pesar de que las neuronas no acumulan glucógeno, sí se benefician de las reservas almacenadas en los astrocitos. Esta característica hace aún más intrigante el hecho de que en determinadas patologías neurológicas se acumulen polímeros de glucosa en las neuronas. Tal es el caso de la enfermedad de Lafora, que fue descrita en 1911 por el español Gonzalo Rodríguez Lafora (23-25), discípulo de Santiago Ramón y Cajal. La enfermedad se caracteriza por la presencia de unas inclusiones en el soma neuronal, en dendritas y en las neuritas corticales que han sido denominadas cuerpos de Lafora. Estos agregados se tiñen intensamente con la técnica PAS, lo que indica un contenido importante de carbohidratos. Estudios bioquímicos han mostrado que los cuerpos de Lafora se componen principalmente de polímeros de glucosa pobremente ramificados (PGBs), es decir, que podrían ser considerados glucógeno aberrante ya que no presentan el patrón de ramificación característico de este polisacárido (26-29). Los cuerpos de Lafora también contienen hasta un 6% de proteína no caracterizada (26, 29). Estas inclusiones son un signo patognómico de la enfermedad y podrían ser su causa. Además, también se ha detectado la presencia de los cuerpos de Lafora en otros órganos como el hígado, músculo, corazón, retina y piel (30, 39), siendo más abundantes en los órganos con un mayor metabolismo de la glucosa, es decir, en el cerebro, corazón, hígado y músculo esquelético (39).

La enfermedad de Lafora es una patología neurodegenerativa fatal y es la causa más frecuente de epilepsia progresiva mioclónica en los países del sur de Europa. La enfermedad se inicia, en la mayoría de los casos, entre los 10 y 17 años de edad, típicamente con crisis generalizadas tónico-clónicas o crisis visuales que suelen describirse como visión de luces o estrellas (35, 37, 39, 40). Poco después el paciente presenta crisis mioclónicas, rasgo fundamental de la enfermedad.

La enfermedad de Lafora presenta un proceso de neurodegeneración progresiva. En la autopsia se observa una abundante pérdida de neuronas sin desmielinización ni inflamación. Todas las regiones del sistema nervioso central se ven involucradas en este proceso, aunque en diferentes grados. Éstas incluyen la corteza cerebral y cerebelosa, los ganglios basales, los núcleos del cerebelo, el tálamo y el hipocampo. Además, también se observa neurodegeneración en la retina (39, 41, 42). Como consecuencia aparece una demencia rápidamente

progresiva poco tiempo después del comienzo de las crisis tónico-clónicas y las mioclonías. Otras manifestaciones neurológicas que el paciente presenta a lo largo del curso de la enfermedad son ataxia, y neuropatía y miopatía periféricas (39, 43). A medida que la enfermedad avanza, la mayoría de los pacientes acaban presentando mioclonías continuas y evolucionan a un estado vegetativo terminal en el que deben ser alimentados por sonda. La mayoría de los enfermos fallecen antes de 10 años después del comienzo de la enfermedad, normalmente por complicaciones debidas a la degeneración del sistema nervioso y al estado epiléptico (35, 39, 40).

La enfermedad de Lafora se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo y muestra heterogeneidad genética. Al menos dos loci son responsables de esta enfermedad: EPM2A (*epilepsy of progressive myoclonus type2 gene A*) y EPM2B (*epilepsy of progressive myoclonus type2 gene B*). Mutaciones en EPM2A son responsables de aproximadamente el 48% de los casos mientras que otro 40% se debe a mutaciones en EPM2B. Además, la enfermedad se caracteriza por una elevada heterogeneidad alélica ya que se han identificado un gran número de mutaciones, en ambos genes, que dan lugar a la enfermedad. A pesar de ello, tanto los pacientes con mutaciones en EPM2A como en EPM2B presentan manifestaciones clínicas similares (44-46), aunque estos últimos tienden a vivir más tiempo que aquellos con defectos en EPM2A (45). Se ha postulado que un tercer gen, todavía desconocido, sería responsable de un pequeño porcentaje de los pacientes de Lafora (47).

EPM2A fue el primer gen identificado como responsable de la enfermedad de Lafora (48, 49). El gen EPM2A está organizado en 4 exones y codifica una proteína de 331 aminoácidos, denominada laforina, que presenta en la región C-terminal un dominio proteín-fosfatasa dual (HCXXGXXRS/T). Por consiguiente, la laforina recombinante puede hidrolizar *in vitro* sustratos de fosfo-tirosina y fosfo-serina/treonina (50, 51). La región N-terminal de laforina contiene un dominio de unión a carbohidratos (35, 52), que promueve su unión a glucógeno tanto *in vitro* (43) como *in vivo* (51). Recientemente, se ha descrito la capacidad de laforina para desfosforilar carbohidratos tales como la amilopectina o el glucógeno (53, 54). Además, se ha demostrado mediante ensayos de doble híbrido en levaduras que laforina interacciona con ella misma y con PTG (55). Todos estos datos situaban a laforina en el contexto de un complejo multiproteico asociado con las partículas de glucógeno intracelulares junto con las proteínas clásicas del metabolismo de este polisacárido y sugería que la laforina podría estar implicada en la regulación del metabolismo del glucógeno, quizás promoviendo una adecuada síntesis de este polisacárido o eliminando el glucógeno aberrante.

El segundo gen asociado a la enfermedad identificado fue EPM2B (56, 57). El gen EPM2B, que posee un sólo exón, codifica una proteína de 395 aminoácidos, denominada malina. Esta proteína tiene un dominio de dedos de zinc del tipo RING-HC (58). La presencia de dedos de zinc RING es característica de una clase de E3 ubiquitin-ligasas (58, 59). La modificación de proteínas por ubiquitina ocurre mediante un proceso de tres pasos en el cual la ubiquitina es activada y transferida desde la enzima activadora (E1) a la enzima conjugadora (E2) y, finalmente, a un sustrato con la implicación de una ubiquitina ligasa (E3) (60). Lo más frecuente es que la ubiquitinización de una proteína la lleve a su degradación por el proteasoma, pero alternativamente, la ubiquitinización puede cambiar su actividad, capacidad de interacción o su localización (59, 61). La actividad E3 ubiquitina ligasa de malina fue confirmada en varios trabajos publicados posteriormente a la secuenciación del gen (62, 63). Además, se identificaron seis dominios repetidos NHL (57). Estos dominios están implicados en la interacción proteína-proteína.

Uno de los descubrimientos clave fue que los dominios NHL de malina le permiten interaccionar con laforina (62). La interacción de malina con laforina estimula la ubiquitinización de esta última, conduciéndola a su degradación (62). Por lo tanto, una de las funciones críticas de malina consiste en regular los niveles intracelulares de laforina a través de su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma. Aunque estos resultados mostraban, por primera vez, una relación e interacción entre dos de las proteínas cuyas alteraciones dan lugar a la patología, la degradación de laforina por la formación de un complejo con malina parecía estar en conflicto con la genética de la enfermedad de Lafora, dado que mutaciones recesivas tanto en un gen como en el otro causan la patología.

A pesar de todos estos avances, se desconocían los mecanismos moleculares por los que mutaciones en estos genes dan lugar a la enfermedad de Lafora y la función celular que desempeñan ambas proteínas. Además, desde la descripción original de la enfermedad, en el ya lejano 1911, continuaba siendo un reto el origen de los cuerpos de Lafora. El que estén formados principalmente por polímeros de glucosa sugería que podían originarse por un defecto en el metabolismo del glucógeno, porque no hay otra fuente de polímeros de glucosa en los tejidos animales. La presencia de los cuerpos de Lafora sugería la existencia de una vía bioquímica, relacionada con el metabolismo del glucógeno, cuya desregulación resultaría en la producción de acumulaciones celulares de polímeros de glucosa poco ramificados. En esta vía podrían estar implicadas laforina y malina. Tal como hemos comentado anteriormente, las neuronas evitan la

acumulación intracelular de este polisacárido, a pesar de que a simple vista podría reportarles grandes beneficios, aunque sí se detecta en determinadas enfermedades neurológicas.

La única proteína capaz de formar polímeros de glucosa en mamíferos es la glucógeno sintasa (GS), enzima sometida a complejos mecanismos de regulación. Por lo tanto, el primer objetivo era estudiar su expresión y regulación en neuronas.

Primero, mediante la técnica cualitativa RT-PCR, pusimos de manifiesto que en cerebro se expresa la isoforma muscular de GS (MGS) pero no la isoforma hepática (LGS) (Figura 1a). Mediante la técnica de *western blot*, usando anticuerpos específicos, pudimos detectar MGS pero no LGS (Figura 1b). Estos datos muestran que en el sistema nervioso central se expresa GS, concretamente, la isoforma muscular. Sin embargo, para conocer si las neuronas expresan MGS, era necesario realizar un estudio más específico en cultivos que sólo contuvieran estas células. Preparamos cultivos que no mostraban expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), proteína específica de este tipo celular, por lo que estaban libres de contaminación por astrocitos. Mediante RT-PCR y *western blot*, observábamos que las neuronas expresaban MGS (Figura 1c, d). También pudimos comprobar que las neuronas no expresan la glucógeno fosforilasa (GP), la enzima responsable de la degradación del glucógeno (Figura 1d).

A pesar de expresar MGS, las neuronas no acumulaban glucógeno, ni tan solo cuando eran cultivadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (30 mM) (Figura 1e). En cambio, los cultivos primarios de astrocitos cultivados en las mismas condiciones, acumulaban cantidades significativas del polisacárido (Figura 1e).

La incapacidad de las neuronas para acumular glucógeno podría explicarse por unos niveles insuficientes de glucosa-6-fosfato (G6P) intracelular. Este metabolito no es tan solo un precursor de la UDP-Glucosa, sustrato de la GS, sino que es clave en el proceso de activación de esta enzima. Además de causar la activación alostérica de GS, promueve también su activación covalente al incrementar la susceptibilidad de la enzima a su desfosforilación por fosfatasas (64-67). La sobreexpresión de glucoquinasa (hexoquinasa IV (GK)) y hexoquinasa I (HKI) en neuronas, utilizando adenovirus recombinantes, nos permitió incrementar los niveles intracelulares de G6P. No obstante, un incremento de 5 veces en los niveles del metabolito (Figura 2a) no conseguía incrementar los niveles de glucógeno (Figura 2a) en estas células. Estos resultados indican que la falta de acumulación de glucógeno en neuronas no es debida a un bajo contenido de G6P.

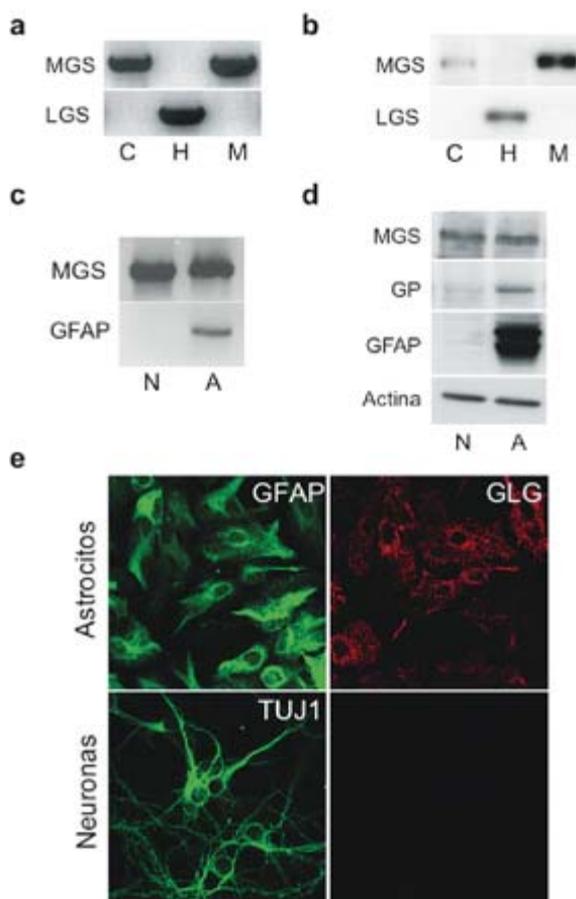


FIGURA 1. **Las neuronas expresan MGS, pero no acumulan glucógeno.** (a) Análisis mediante RT-PCR de la expresión de MGS y LGS en cerebro (C), hígado (H) y músculo (M) de ratón. (b) Análisis mediante western blot de la expresión de MGS y LGS en cerebro (C), hígado (H) y músculo (M) de ratón. (c) Análisis mediante RT-PCR de la expresión de MGS y LGS en cultivos primarios de neuronas (N) y astrocitos (A) de ratón. Utilizamos GFAP como marcador de astrocitos. (d) Análisis mediante western blot de la expresión de MGS en homogenizados de cultivos primarios de neuronas y astrocitos. La señal de GP y GFAP era prácticamente indetectable en cultivos de neuronas. Utilizábamos actina como control de carga. (e) Análisis mediante inmunofluorescencia, en cultivos primarios de astrocitos y de neuronas, de la acumulación de glucógeno utilizando un anticuerpo contra este polisacárido (GLG). Como marcadores de astrocitos y neuronas utilizamos GFAP y β -III-tubulina (TUJ1), respectivamente.

Otra posible explicación sería que los niveles de MGS no fueran suficientes. Por ese motivo, sobreexpresamos dicha enzima en estas células mediante adenovirus recombinantes. A pesar de aumentar drásticamente (más de 12 ve-

ces) el contenido de MGS, no observábamos ningún cambio en la síntesis de glucógeno (Figura 2b). En otros tipos celulares, aumentos menores de los niveles de MGS suponen un incremento en la acumulación de glucógeno (65).

La actividad de la GS se regula mediante fosforilación y desfosforilación. La fosforilación en múltiples residuos de serina (Ser) cerca de los extremos N- y C-terminales (68) genera formas menos activas. Varias quinasas están implicadas en este proceso entre las que destacan GSK3 que fosforila las Ser640, Ser644, Ser448 y Ser652 o AMPK que fosforila la Ser7. El análisis por *western blot* mostró que la MGS en neuronas está altamente fosforilada en los residuos Ser640 y Ser7/10, precisamente los sitios cuya fosforilación desempeña un papel más importante en la actividad de la enzima (68) (Figura 2c, d). Ello mantenía a la enzima inactivada y, por lo tanto, silenciado el proceso de síntesis de glucógeno.

La MGS expresada en neuronas se encontraba principalmente localizada en el núcleo (Figura 2e, panel de arriba). Dicha situación sólo se observa en otros tipos celulares cuando se encuentran completamente deplecionados de reservas de glucógeno. Sorprendentemente, en neuronas la MGS muestra esta distribución incluso cuando cultivamos estas células en presencia de altas concentraciones de glucosa (30 mM). En cambio, la mayoría de astrocitos no presentaban tinción nuclear de MGS. Ahí, la enzima se agrupaba en puntos discretos en el citoplasma, distribución característica de esta proteína bajo condiciones de síntesis activa de glucógeno (Figura 2e, panel de abajo).

A pesar de estar altamente inactivada, mediante el tratamiento de las neuronas con LiCl, un inhibidor de GSK3 (69), se consiguió la activación de la enzima. En estas condiciones las neuronas acumulaban glucógeno (Figura 2e, panel central) y se observaba un desfosforilación moderada de la Ser640 (Figura 2d). La MGS alteraba su localización subcelular y se acumulaba en sitios específicos del citoplasma, coincidiendo con las partículas de glucógeno crecientes (Figura 2e, panel central).

Un mecanismo más efectivo para lograr la activación de MGS requiere su desfosforilación intensiva mediante la proteína fosfatasa 1 (PP1) (70). Esta fosfatasa está implicada en la regulación de diversos procesos celulares. Por este motivo, juegan un importante papel sus subunidades reguladoras, que le confieren especificidad de sustrato (70). Se ha descrito una familia de proteínas que dirigen PP1 hacia la molécula de glucógeno. Una de ellas es la PTG (71) que se expresa en cerebro (72). PTG forma complejos entre PP1 y sus sustratos y actúa como un «andamio» molecular ensamblando PP1 con sus sustratos en las

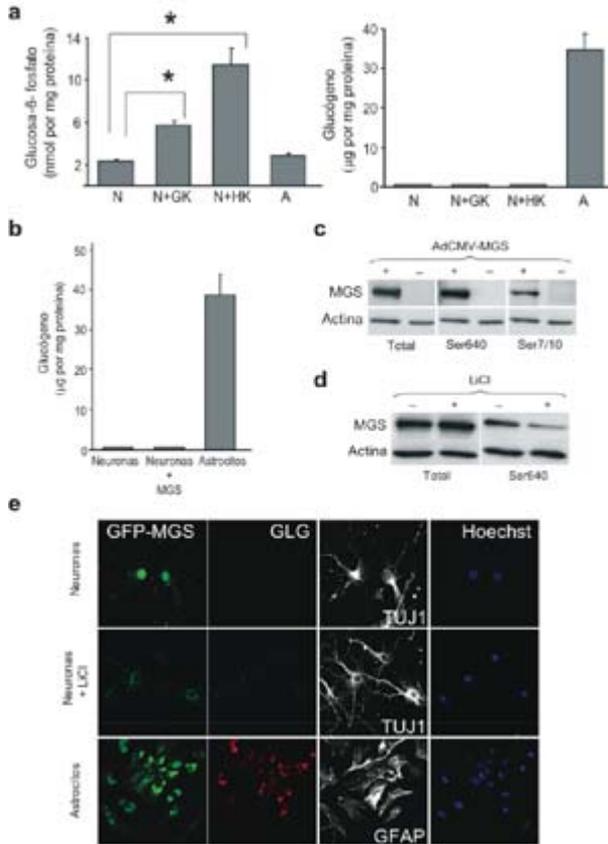


FIGURA 2. Efecto del incremento de los niveles intracelulares de G6P en neuronas. Inactivación de MGS por fosforilación. (a) Los gráficos muestran los niveles intracelulares de G6P (izquierda) y el contenido de glucógeno (derecha) de neuronas que sobreexpresan glucoquinasa (N + GK) o hexoquinasa I (N + HK) y neuronas sin infectar (N). Un incremento de 5 veces en los niveles intracelulares de G6P no incrementaba la acumulación de glucógeno. Los niveles de G6P representan la media \pm s.e.m. (n = 5-7) de tres experimentos independientes. * $P < 0,001$ no infectada versus neuronas infectadas con AdCMV-GK o AdCMV-HKI. El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n = 6-10) de tres experimentos independientes. (b) Contenido de glucógeno en cultivos primarios de neuronas y astrocytos. El glucógeno era indetectable en las neuronas infectadas con AdCMV-MGS (N+MGS, MOI (multiplicidad de infección) 100). El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n = 6) de tres experimentos independientes. (c) Análisis por western blot de neuronas infectadas con AdCMV-MGS (+, MOI 100) o sin infectar (-). Para este análisis utilizamos anticuerpos que reconocían la MGS total, la MGS fosforilada en la Ser640 o la fosforilada en la Ser7/10. (d) Western blot de neuronas que sobreexpresaban MGS y que habían sido cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de LiCl 20 mM (24 h). (e) Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra glucógeno (GLG) y marcadores específicos de neuronas (TUJ1) y astrocytos (GFAP). Marcábamos los núcleos mediante Hoechst 33342. Las células fueron tratadas con AdCMV-GFP-MGS (MOI 50 para neuronas y MOI 5 para astrocytos). Las neuronas acumulaban glucógeno cuando las tratábamos con LiCl 20 mM durante 24 h.

partículas de glucógeno. De esta manera, PTG estimula la desfosforilación de GS y, en consecuencia, incrementa la acumulación de glucógeno (71).

Para estudiar los efectos de la PTG en neuronas, utilizamos adenovirus recombinantes que expresan esta proteína fusionada a GFP, lo que nos permitía estudiar su localización intracelular y controlar sus niveles de expresión. El incremento en los niveles intracelulares de PTG supuso un gran estímulo en la acumulación de glucógeno. El contenido de este polisacárido incrementaba de manera dramática en las células neuronales, que pasaban de no acumular glucógeno a contener elevadas cantidades (Figura 3). El glucógeno acumulado dependía de los niveles de PTG (Figura 3a) e incrementaba progresivamente con el tiempo (Figura 3b). Mediante inmunofluorescencia pudimos observar que el glucógeno sintetizado se distribuía por todo el soma celular pero también en neuritas y axones (Figura 3c).

La actividad de MGS incrementaba drásticamente con la PTG y se acercaba a valores próximos a la plena activación (Figura 3d), tal como observábamos al determinar la relación de actividades (-G6P/+G6P), que es una medida no lineal del estado de activación del enzima. La activación de MGS estimulada por PTG se correspondía con una desfosforilación de la enzima en Ser640 y Ser7/10 (Figura 3e), tal como observábamos por *western blot*. Además, la enzima mostraba una movilidad electroforética incrementada, característica del estado desfosforilado (73).

Es importante resaltar que los niveles endógenos de la proteína PTG en neuronas son bajos en comparación con otras células. Además, la relación de PTG/MGS es muy baja en comparación a lo que ocurre en músculo o astrocitos (Figura 3f), lo que podría sugerir que en neuronas es más difícil que la PPI actúe sobre MGS.

Debido a que los cuerpos de Lafora están formados principalmente por polímeros de glucosa pobremente ramificados, analizamos el estado de ramificación del glucógeno acumulado por las neuronas. Para ello aplicamos el método de Schlamowitz (74), consistente en determinar el espectro de absorción del complejo del polisacárido con yodo. Para el glucógeno sintetizado en neuronas en respuesta a PTG el pico del complejo se daba a 511 nm, indicando que estaba pobremente ramificado.

Para determinar el papel de laforina y malina en la generación de los cuerpos de Lafora, analizamos su capacidad para modular la acumulación de glucógeno inducida por PTG. La estrategia consistía en sobreexpresar laforina o malina junto con PTG. Dado que queríamos sobreexpresar simultáneamente de manera

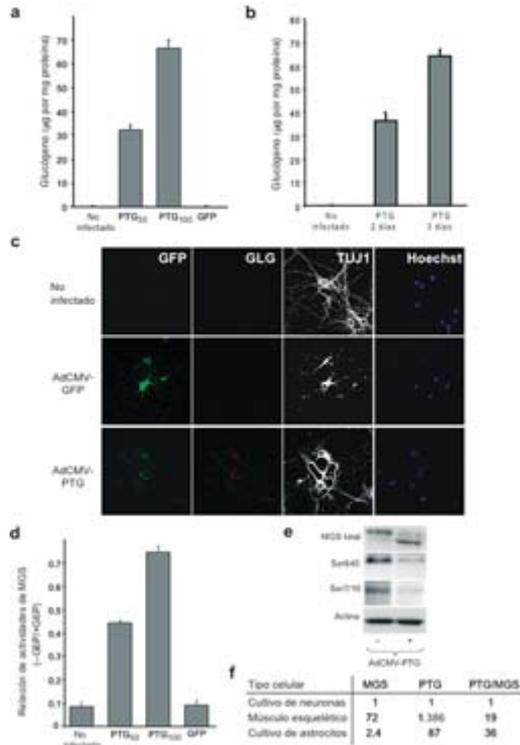


FIGURA 3. El incremento de los niveles de PTG en neuronas estimula la desfosforilación de MGS y activa la acumulación de glucógeno en estas células. (a) Contenido de glucógeno en neuronas tratadas con AdCMV-PTG a baja (PTG₅₀) y alta (PTG₁₀₀) MOI. La sobreexpresión de PTG tenía un marcado efecto en la estimulación de glucógeno en neuronas. El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n= 6-10) de tres experimentos independientes. (b) Contenido de glucógeno en neuronas tratadas con AdCMV-PTG a baja MOI (PTG₅₀) después de 2 y 3 días de expresión de la proteína recombinante. La acumulación de glucógeno incrementaba progresivamente con el tiempo después de la infección con el adenovirus. El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n= 6-9) de tres experimentos independientes. (c) Inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo contra glucógeno (GLG), de cultivos primarios de neuronas tratados con AdCMV-PTG (MOI 50). Utilizamos TUJ1 y Hoechst 33342 como marcadores de neuronas y núcleos, respectivamente. Como control de la infección con adenovirus, las neuronas fueron tratadas con AdCMV-GFP (MOI 50). El glucógeno se acumula en el soma celular y en las neuritas. (d) Relación de actividades de MGS (-G6P/+G6P) en neuronas tratadas con AdCMV-PTG a baja (PTG₅₀) y alta (PTG₁₀₀) MOI. La sobreexpresión de PTG tenía un marcado efecto en la estimulación de la actividad de MGS. La relación de actividades de MGS representa la media \pm s.e.m., n=6-12, de tres experimentos independientes. (e) Western blot de neuronas tratadas (+) con AdCMV-PTG (MOI 100) o sin infectar (-). Utilizamos anticuerpos que reconocían la MGS total o la MGS fosforilada en la Ser640 o en la Ser710. La sobreexpresión de PTG estimulaba la desfosforilación de MGS en estos sitios. (f) Análisis mediante Real-Time PCR de la expresión de PTG y MGS. Los niveles de transcritos de MGS y PTG en músculo o astrocitos fueron comparados con los valores obtenidos en cultivos de primarios de neuronas, a los que les fue asignado un valor de 1. La relación entre los transcritos de PTG respecto a los de MGS (PTG/MGS) en neuronas era más baja que en músculo o astrocitos.

controlada varias proteínas y que el número de condiciones experimentales era elevado, trabajamos inicialmente en células Neuro2a diferenciadas (N2a), línea celular obtenida a partir de un neuroblastoma espontáneo de un ratón albino y que habíamos mostrado que, por lo que respecta al metabolismo del glucógeno, tenían un comportamiento similar a los cultivos primarios de neuronas (75). En las condiciones en que laforina o malina eran expresadas cada una por separado junto con PTG, no observábamos ningún efecto en la acumulación de glucógeno (Figura 4a). No obstante, al sobreexpresar laforina y malina simultáneamente junto a PTG los resultados obtenidos fueron espectaculares, ya que se bloqueaba completamente la síntesis del polisacárido (Figura 4a). Estos resultados demuestran que laforina y malina participan en el control del metabolismo del glucógeno.

Dado que malina tiene actividad E3 ubiquitina ligasa, pudiendo así estimular la degradación de proteínas vía proteasoma, decidimos estudiar si se producían variaciones en los niveles de las proteínas implicadas en la síntesis del glucógeno. Mediante *western blot*, observábamos que en condiciones de sobreexpresión conjunta de laforina y malina, se producía una reducción drástica en los niveles de MGS y PTG (Figura 4b), tanto en N2a como en neuronas. Además, los niveles de laforina también disminuían en presencia de malina (Figura 4b), aunque en menor medida. En cambio, los niveles intracelulares de malina aumentaban sustancialmente cuando ésta era coexpresada junto a laforina (Figura 4b), sugiriendo que laforina estabiliza los niveles de malina. Por lo tanto, los niveles de malina estaban inversamente correlacionados con los de MGS, PTG y laforina. La reducción en los niveles de MGS observada por *western blot* en las células que expresaban conjuntamente laforina y malina correlacionaba con una reducción de la actividad total de esta enzima, que llegaba a ser prácticamente indetectable (Figura 4c). Los efectos observados eran específicos, ya que los niveles de otras proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno, como hexoquinasa I o GSK3, no variaban (75). Para analizar la probable participación del sistema ubiquitina-proteasoma en este proceso, utilizamos dos inhibidores del proteasoma: MG-132 y lactacistina (76). Ambos bloqueaban la reducción de MGS, PTG y laforina inducida por la acción conjunta de laforina y malina (Figura 4d). Además, mediante *Real-Time PCR*, confirmamos que los niveles de transcripción de MGS, PTG y laforina no estaban afectados, indicando que los cambios observados no eran causados por alteraciones en los niveles de transcripción (75). Hay que hacer notar que la cantidad de malina expresada en ausencia de laforina era más elevada cuando las células eran incubadas con los inhibidores de proteasoma (Figura 4d). Esta observación sugiere que malina también es degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma. En cultivos primarios de neuronas obtuvimos resultados similares (75).

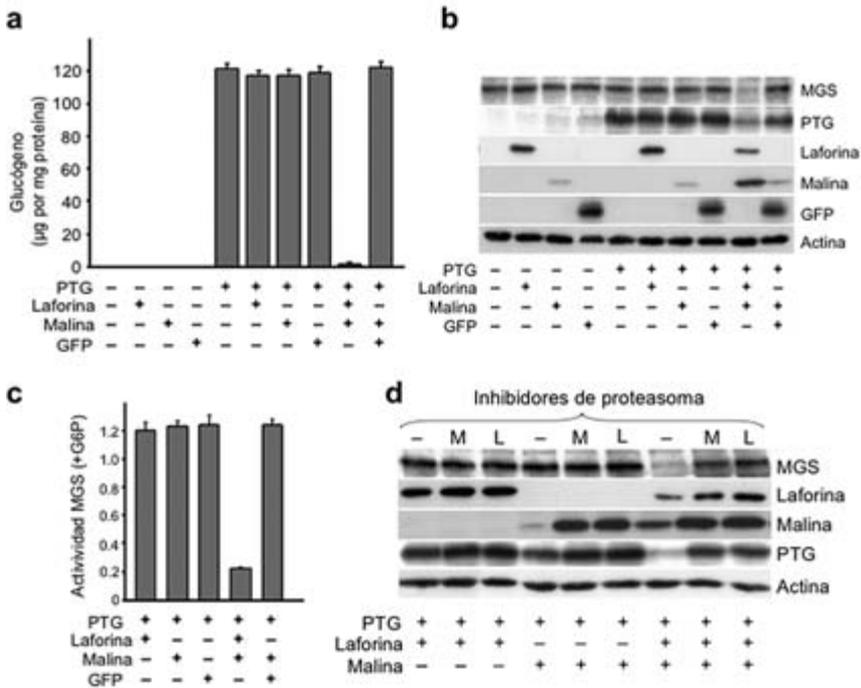


FIGURA 4. **Bloqueo de la síntesis de glucógeno por laforina y malina.** (a) Contenido de glucógeno en células N2a (media \pm s.e.m., $n= 14-23$, de seis experimentos independientes) incubadas con los adenovirus indicados en la figura, utilizados a una MOI de 20, con la excepción del AdCMV-PTG, el cual fue utilizado a una MOI de 5. La coexpresión de laforina y malina bloqueaba la acumulación de glucógeno inducida por PTG. (b) Análisis por western blot de células N2a tratadas con adenovirus recombinantes en las mismas condiciones que se han descrito en a. MGS, PTG y laforina experimentaban una marcada reducción cuando coexpresábamos laforina y malina. (c) Medida de la actividad total de MGS (+G6P) de células N2a (media \pm s.e.m., $n= 6-8$, de tres experimentos independientes) después de su infección con AdCMV-PTG, AdCMV-laf, AdCMV-malina y AdCMV-GFP en las mismas condiciones que se han descrito en a. La coexpresión de laforina y malina reducía la actividad total de MGS. (d) Western blot de células N2a incubadas con los adenovirus recombinantes indicados en la figura y tratadas durante 18 h con los inhibidores del proteasoma MG-132 (M) a una concentración de 1 μ M o lactacistina (L) a 5 μ M. Los inhibidores de proteasoma fueron añadidos 4 h después de la incubación con los adenovirus. Las células fueron procesadas para western blot 22 h después de la infección. Todos los virus fueron utilizados a una MOI de 10, excepto el AdCMV-PTG que fue utilizado a una MOI de 2. El tratamiento con los inhibidores de proteasoma bloqueaba la degradación de MGS, PTG y laforina observada en células que coexpresaban laforina y malina. Además, incrementaba los niveles de malina bloqueando la marcada degradación de esta proteína que se producía cuando no era coexpresada conjuntamente con laforina.

Los dominios NHL de malina le permiten interactuar con laforina (62). En algunos enfermos de Lafora, se ha identificado la mutación D146N que, sin alterar su actividad enzimática, afecta a su capacidad para interactuar con laforina (62, 77). Al sustituir la malina de tipo salvaje por el mutante D146N no se producía el bloqueo de la acumulación de glucógeno (Figura 5a) y, en contraste a la malina de tipo salvaje, el mutante no inducía la degradación de PTG, MGS o laforina (Figura 5b). Además, los niveles del mutante D146N no podían ser estabilizados por laforina tal como ocurre con la malina de tipo salvaje (Figura 5b). El conjunto de estos resultados nos mostraba que la interacción entre laforina y malina es crucial para su acción.

Si el complejo laforina -malina es capaz de reducir los niveles de MGS y PTG, la ausencia de cualquiera de los dos componentes del complejo debería resultar en unos niveles de MGS y PTG incrementados. Así, conseguimos el silenciamiento de laforina en N2a usando oligonucleótidos de ARN de interferencia (*siRNA*) (Figura 5c). En esas células *knockdown* de laforina observábamos un marcado incremento de los niveles de MGS y PTG en comparación con aquellas células transfectadas con los *siRNA* control (Figura 5d, e). Además, estas células acumulaban más glucógeno bajo condiciones glucogénicas (Figura 5f).

Estos resultados desvelan un nuevo mecanismo de regulación de la síntesis de glucógeno en el que juegan un importante papel las dos proteínas cuyas mutaciones causan la enfermedad de Lafora y ofrece una explicación a la formación de los característicos cuerpos de Lafora. Estos datos, en conjunto, establecen la implicación del sistema laforina-malina en el control de la estabilidad de MGS y PTG y, por consiguiente, en la síntesis de glucógeno. Sin embargo, estos resultados hacen aún más intrigante el hecho de que las neuronas no acumulen glucógeno en condiciones normales. La pregunta que surge a partir de esta información es por qué las neuronas han conservado la capacidad de sintetizar glucógeno, aunque mantienen la maquinaria inactivada con la participación de un complicado proceso de degradación de proteínas que probablemente les supone consumir energía.

Existen varios ejemplos en que la acumulación de inclusiones intracelulares en neuronas tiene efectos devastadores para estas células. Tal es el caso del Alzheimer o la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Por lo tanto, era interesante estudiar si las neuronas evitan a toda costa formar glucógeno por resultarles perjudicial la acumulación de polímeros de glucosa.

La apoptosis es un proceso de suicidio celular y es uno de los principales tipos de muerte celular programada. Se trata de un conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en una célula de un organismo pluricelular, encami-

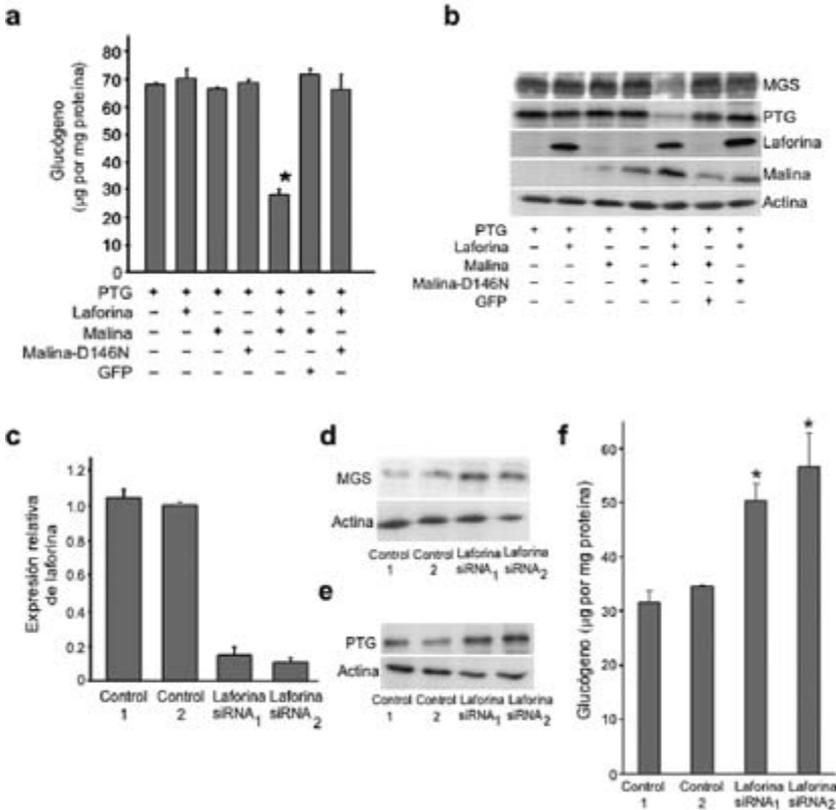


FIGURA 5. **La interacción entre laforina y malina es clave para ejercer su regulación sobre el metabolismo del glucógeno.** (a) Contenido de glucógeno en células N2a (media \pm s.e.m., n= 6-8, de tres experimentos independientes) incubadas con los adenovirus recombinantes indicados en la figura, utilizados a una MOI de 5, con la excepción del AdCMV-PTG, el cual fue utilizado a una MOI de 3. El mutante D146N de malina no era efectivo en la inhibición de la acumulación de glucógeno. * $p < 10^{-5}$ versus infecciones únicas, dobles y las infecciones triples con AdCMV-PTG + AdCMV-malina + AdCMV-GFP y AdCMV-PTG + AdCMV-laforina + AdCMV-malinaD146N. (b) Análisis por western blot de células N2a tratadas con adenovirus en las mismas condiciones que se han descrito en a. El mutante de malina (D146N) no reducía los niveles de MGS y PTG. Los niveles de malina fueron estabilizados en presencia de laforina (compárese las líneas 3 ó 6 con la línea 5). En contraste, el mutante de malina- D146N no era estabilizado por laforina (compárese las líneas 4 y 7). (c) Cuantificación de la expresión de laforina por Real-Time PCR. Los niveles de los transcritos de laforina se muestran como valores relativos respecto a las N2a que fueron tratadas con siRNA control (Control 1, GAPDH; Control 2, scrambled siRNA). Los niveles de transcritos de mRNA representan la media \pm s.e.m., n= 3-5, de tres experimentos independientes. (d) Análisis por western blot de los niveles de MGS en células N2a knockdown de laforina. (e) Análisis por western blot de los niveles de PTG en células N2a knockdown de laforina infectadas con AdCMV-PTG (MOI 2). (f) Contenido de glucógeno (media \pm s.e.m. de tres experimentos independientes) en células N2a knockdown de laforina infectadas con AdCMV-PTG (MOI 2). * $p < 0,05$ versus células Control 1 y Control 2.

nadas, a diferencia de la necrosis, a producir la muerte de manera controlada. La membrana celular no se destruye durante el proceso de apoptosis, impidiendo de esta manera que se libere su contenido intracelular al espacio extracelular. Durante la apoptosis se producen dos eventos claves, la activación de enzimas proteolíticas (caspasas) y la condensación y fragmentación de la cromatina. Por este motivo, utilizamos dos pruebas que nos permitieran valorar si la acumulación de glucógeno generaba apoptosis: la técnica de TUNEL, que permite teñir los residuos de uridina de los fragmentos nucleares de DNA característicos de la apoptosis, y la activación de caspasa-3, una de las principales proteasas involucradas en el proceso de apoptosis. Sorprendentemente, si manteníamos a las neuronas acumulando glucógeno durante períodos prolongados, se producía un gran incremento en el porcentaje de células apoptóticas, tal como observábamos con la técnica TUNEL (Figura 6a) y en el porcentaje de neuronas que eran positivas para la caspasa-3 activada (Figura 6b). La activación de la apoptosis dependía del tiempo que transcurría desde el inicio de la acumulación de glucógeno (Figura 6b).

El siguiente paso fue estudiar que ocurría en los astrocitos, que normalmente acumulan glucógeno, cuando los forzábamos a acumular más cantidad de este polisacárido por sobreexpresión de PTG. En estas células no se producía activación de caspasa-3 (Figura 6c, d) a pesar de que acumulaban 20 veces más glucógeno que las neuronas en las mismas condiciones (Figura 6e) y, además, sobreexpresaban niveles de PTG más elevados (Figura 6c).

En base a estos resultados, parece lógico concluir que las neuronas eviten acumular glucógeno a toda costa ya que el polisacárido desencadena, en estas células, mecanismos de muerte. La inducción de la apoptosis por la acumulación de glucógeno abre un nuevo campo de investigación ya que, hasta la fecha, era un proceso desconocido cuyo estudio nos puede deparar interesantes resultados. En cambio, los astrocitos, células que normalmente acumulan glucógeno en gran parte para satisfacer las demandas energéticas de las neuronas, no mueren cuando son forzados a acumular más cantidad de glucógeno.

Nuestros resultados muestran que las neuronas tienen la capacidad de sintetizar glucógeno pero, en cambio, al no poseer GP, no pueden degradarlo. No obstante, a pesar de expresar MGS, las neuronas normalmente no almacenan este polisacárido ya que se ponen en funcionamiento toda una serie de mecanismos con el objetivo de silenciar la actividad de MGS y, de esta manera, evitar la síntesis de glucógeno. Un gran número de datos apoyan esta conclusión. De entrada, la relación de actividades (-G6P/+G6P) de la MGS es muy baja en neuronas y la enzima está fosforilada en los sitios más importantes que regulan

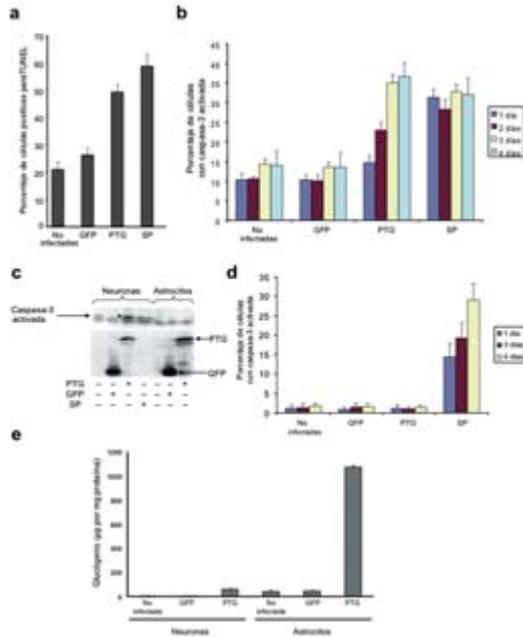


FIGURA 6. La acumulación de glucógeno induce la apoptosis en cultivos primarios de neuronas. (a) El porcentaje de células TUNEL-positivas (media \pm s.e.m.) fue estimado en 8-14 campos (550-600 células en total) por cubre, tres cubres por cada condición experimental correspondientes a tres experimentos diferentes. La acumulación de glucógeno fue inducida por expresión de PTG durante 4 días (AdCMV-PTG, MOI 50). En la figura, GFP indica las células incubadas con AdCMV-GFP (MOI 50). Como control positivo de apoptosis tratábamos las neuronas durante 24 h con estaurosporina a una concentración de 0,1 μ M (SP). El glucógeno incrementa el número de neuronas TUNEL-positivas. **(b)** Porcentaje de neuronas con caspasa-3 calculado mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra caspasa-3 activada y Hoechst 33342 como marcador de núcleos. Las células fueron tratadas en las mismas condiciones que se han indicado en **a**. La acumulación de glucógeno fue inducida por expresión de PTG durante 1, 2, 3 y 4 días (AdCMV-PTG, MOI 50). El porcentaje de células que presentan activación de la caspasa-3 representa la media \pm s.e.m. de 8-14 campos (550-600 células en total) por cada cubre, tres cubres por tratamiento correspondientes a tres experimentos diferentes **(c)** Análisis mediante western blot de la activación de caspasa-3 en cultivos primarios de neuronas y astrocitos. La acumulación de glucógeno fue estimulada mediante la expresión de PTG durante 96 h (AdCMV-PTG, MOI 50 en neuronas, MOI 10 en astrocitos). Como control de infección utilizamos el AdCMV-GFP (MOI 50 en neuronas, MOI 10 en astrocitos). El asterisco indica la señal correspondiente a la caspasa-3 activada. El panel inferior muestra un western blot utilizando el anticuerpo contra GFP. **(d)** Porcentaje de astrocitos con caspasa-3 activada (media \pm s.e.m., 9-14 campos (550-600 células en total) por cada cubre, tres cubres por tratamiento correspondientes a tres experimentos diferentes). La acumulación de glucógeno fue inducida por expresión de PTG durante 1, 3 y 4 días (AdCMV-PTG, MOI 10). En la figura, GFP indica las células incubadas con AdCMV-GFP (MOI 10). Como control positivo de apoptosis tratábamos los astrocitos durante 24 h con estaurosporina a una concentración de 0,1 μ M (SP). **(e)** Diferencias entre los niveles intracelulares de glucógeno en neuronas y astrocitos. Contenido de glucógeno en células tratadas con AdCMV-PTG durante 72 h (AdCMV-PTG, MOI 50 en neuronas, MOI 10 en astrocitos). El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n= 4-6) de tres experimentos independientes. PTG induce una mayor acumulación de glucógeno en astrocitos que en neuronas.

su activación, lo que indica que se encuentra altamente inactivada. Además, toda una serie de estímulos que normalmente logran activar la síntesis de glucógeno resultan infructuosos en neuronas. En la mayoría de tipos celulares un aumento de los niveles de G6P conlleva una activación de GS y un incremento en el contenido de glucógeno (64, 65). Sin embargo, este no es el caso de las neuronas, lo que indica que la concentración de G6P no es una señal para desencadenar la síntesis de glucógeno en estas células. Esta «insensibilidad» de MGS a la activación por G6P podría ser una consecuencia de su estado hiperfosforilado, que reduce la afinidad de MGS por G6P (66, 78, 79). La «insensibilidad» a G6P podría tener una explicación fisiológica ya que en condiciones de elevada actividad neuronal y, por lo tanto, de elevada demanda energética, los niveles de G6P podrían incrementar debido a una mayor entrada de glucosa. Esta G6P debe de ser dirigida a la vía de la glucólisis para satisfacer las demandas energéticas y asegurar el correcto funcionamiento del sistema nervioso, por lo que las neuronas se muestran prevenidas para evitar la acumulación de glucógeno inducida por G6P ya que necesitan este metabolito para obtener energía. Además, los efectos pro-apotóticos de la acumulación de glucógeno en neuronas podrían ser también una buena razón para bloquear la estimulación de MGS por G6P, cuyo incremento se puede producir en situaciones fisiológicas.

Otra evidencia de la gran capacidad que tienen las neuronas para inactivar MGS es el hecho de que pueden llegar a silenciar niveles muy incrementados de esta enzima. La sobreexpresión de MGS en neuronas no conduce a la acumulación de glucógeno ya que la enzima es fosforilada en los sitios más importantes implicados en su regulación. No obstante, estas células sintetizan glucógeno si bloqueamos mediante litio la acción inactivadora de GSK3 sobre la MGS. Por lo tanto, las neuronas pueden sintetizar glucógeno si se consigue disminuir la fosforilación de MGS. La prueba más evidente de esta capacidad la obtuvimos al incrementar los niveles intracelulares de PTG. La sobreexpresión de esta proteína conduce a la síntesis masiva de glucógeno como consecuencia de la activación prácticamente total de la MGS por desfosforilación. Por lo tanto, la PTG podría jugar un papel fundamental en el metabolismo del glucógeno neuronal. Sin embargo, los niveles endógenos de PTG en neuronas son bajos en comparación con otras células que normalmente sintetizan glucógeno. Además, el hecho de que la relación entre los transcritos de PTG respecto a los de MGS sea tan baja en comparación con el músculo o los astrocitos, indica que la activación de la MGS por PTG no está favorecida en neuronas. Estos datos sugieren que la facilidad de las neuronas para inactivar a la MGS por fosforilación, unida a su poca capacidad para revertir este proceso, puede ser fundamental para mantener la síntesis de glucógeno a cero. A este bien coordinado proceso

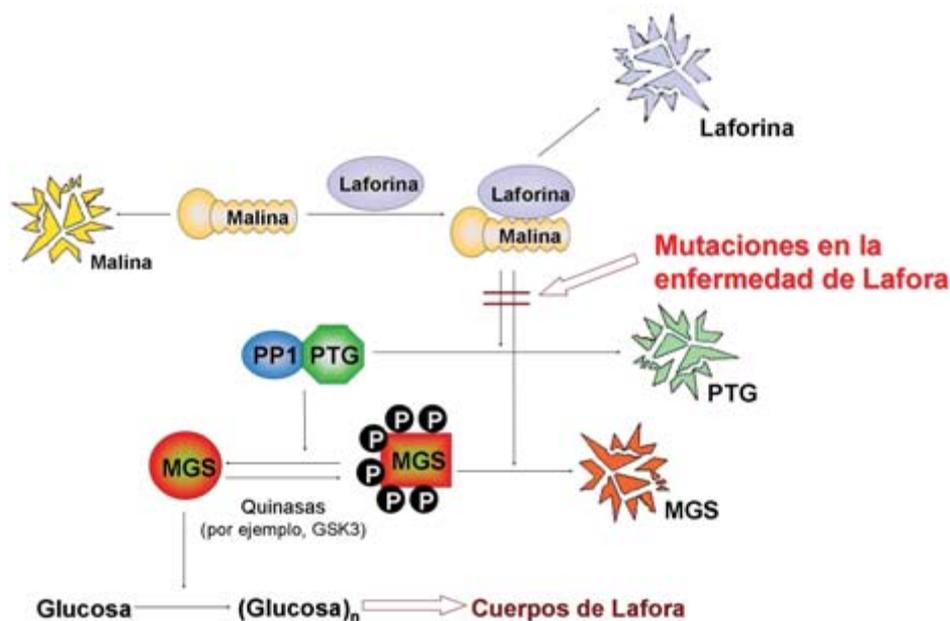


FIGURA 7. Esquema general de la función del complejo laforina-malina en la regulación del metabolismo del glucógeno en neuronas.

de regulación de la síntesis de glucógeno se suma la acción de las dos proteínas cuya alteración da lugar a la enfermedad de Lafora, es decir, laforina y malina. Estas proteínas, a través de la formación de un complejo entre ambas, son capaces de regular los niveles intracelulares de MGS y PTG mediante el sistema ubiquitina-proteasoma (Figura 7) ejerciendo así un papel clave en la regulación de la síntesis de glucógeno. De hecho, se trata de un mecanismo muy potente de regulación ya que es capaz de inducir la degradación de las dos proteínas claves para sintetizar glucógeno, es decir, la enzima capaz de formar polímeros de glucosa y la proteína que permite su activación. Por lo tanto, los datos mostrados proporcionan un enlace molecular entre el fallo en la función de laforina o malina y la acumulación anómala de glucógeno en neuronas en pacientes con enfermedad de Lafora.

Este mecanismo era completamente desconocido hasta ahora y puede ser fundamental no tan solo para entender la enfermedad de Lafora y otras enfermedades que cursan con acumulación de poliglucosanos en neuronas, sino que establecen el papel de estos dos nuevos jugadores en el metabolismo del glucógeno. La acción del complejo laforina-malina se suma a los bien conocidos

de activación alostérica y regulación por fosforilación/desfosforilación, con el que está estrechamente relacionado ya que también regula los niveles intracelulares de PTG. Así, el complejo laforina-malina ejerce un control adicional superpuesto a los mecanismos de regulación previamente conocidos y añade un nuevo nivel de complejidad al control global de la síntesis de glucógeno. Aunque pudiera ser predominante en neuronas, este mecanismo está probablemente implicado en la regulación de la síntesis de glucógeno de manera más general, ya que la expresión de laforina y malina no está restringida a neuronas. Probablemente, funcione para prevenir el exceso de síntesis de glucógeno en ciertos tejidos o detener su síntesis bajo condiciones fisiológicas específicas.

Una de las características más intrigantes del sistema es que malina, además de interactuar con laforina, promueve su degradación. Y es intrigante porque parece estar en conflicto con una de las características de la enfermedad, es decir, el hecho de que mutaciones recesivas tanto en una proteína como en la otra dan lugar a la patología. Nosotros proponemos que la degradación de laforina podría ser un interruptor de seguridad. Es decir, cuando los niveles de laforina son bajos no se forma el complejo laforina-malina y entonces la degradación de MGS y PTG se detiene. Cuando malina está unida a laforina, se activa la degradación de ésta última junto con la de MGS y PTG. Así llega un momento en que los niveles de laforina son insuficientes con lo que se detiene la degradación de MGS y PTG. Por lo tanto, la degradación de laforina permitiría a malina autorregularse. Además, los niveles de malina también se ven reducidos en ausencia de laforina, a través del sistema ubiquitina-proteasoma. Este hecho nos sugiere que cuando los niveles de laforina son reducidos la malina se degrada; lo que contribuiría a detener su acción sobre sus proteínas diana. Esta doble regulación debería asegurar que MGS y PTG no se degradan más allá de lo necesario. Siguiendo esta línea, la autorregulación del sistema no acaba aquí porque también funciona en sentido inverso. A medida que los niveles de malina van reduciéndose, llegará el momento en que los niveles de laforina vuelvan a aumentar al no ser degradada. De esta manera, laforina vuelve a interactuar con malina y, de nuevo, se estabilizan los niveles de la ubiquitina ligasa. El control de la degradación de ambas proteínas podría ser muy importante en células que normalmente sintetizan glucógeno.

Nuestros resultados muestran además que la acumulación de glucógeno deriva en problemas para las neuronas. Un fallo en el mecanismo que mantiene a MGS bajo control puede tener efectos letales para estas células debido a que almacenar glucógeno conlleva su entrada en apoptosis. Sin duda, este es uno de los resultados más sorprendentes de nuestro trabajo y puede dar un nuevo enfoque al estudio del metabolismo del glucógeno en cerebro. Los efectos apop-

tóticos del glucógeno parecen ser específicos de neuronas ya que, por ejemplo, no tiene este efecto en astrocitos, células que normalmente acumulan este polisacárido. El hecho de que el glucógeno induzca la apoptosis en neuronas nos permite responder a la pregunta de porqué las neuronas, a pesar de tener la maquinaria, ponen en funcionamiento toda esta serie de sistemas bien coordinados con el objetivo de evitar la síntesis de glucógeno. Por lo tanto, parece que estas células tienen una relación ambivalente con el glucógeno ya que, por un lado, se benefician de su acumulación en los astrocitos mientras que, por el otro, si lo almacenan en su interior se activa la apoptosis. En relación a los beneficios que tiene para las neuronas la acumulación de glucógeno en astrocitos, se ha descrito que el incremento de este polisacárido en la glía tiene un efecto neuroprotector (2, 80). Una de las definiciones que resume a la perfección el proceso es que el glucógeno actúa como un caballo de Troya en neuronas (81). Es probable que estos efectos sean el motivo por el cual estas células mantengan activos una serie de procesos bien coordinados que impidan la acumulación de glucógeno a pesar de ser muy complejos y de que probablemente consuman energía (interacciones proteína-proteína, degradación de proteínas,...).

Hay que hacer notar que la activación de MGS en neuronas da lugar a un glucógeno pobremente ramificado que además tendrá problemas para ser degradado ya que no encontramos cantidades detectables de GP. Todos estos factores reflejan la necesidad de mantener bajo control la síntesis de glucógeno y, probablemente, el complejo laforina-malina tenga un papel importante para prevenir la acumulación de una molécula potencialmente peligrosa para las neuronas. La alteración de este sistema explicaría la acumulación en la enfermedad de cuerpos de inclusión de composición similar al glucógeno. De momento, desconocemos el alcance que tiene este fenómeno en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lafora. Aunque nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que en esta enfermedad el glucógeno da lugar a alteraciones en la función neuronal, no podemos excluir la posibilidad de que existan otras dianas potenciales del complejo laforina-malina que también estén implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Lafora.

Aunque hemos ofrecido nuevas respuestas y aclaraciones a la enfermedad de Lafora y a la regulación del glucógeno en cerebro, este trabajo plantea algunas cuestiones sobre las que podría ser muy interesante profundizar en un futuro. Por ejemplo, ¿a través de qué mecanismos la acumulación de glucógeno desencadena la apoptosis en neuronas? ¿Por qué los astrocitos y otras células son inmunes a los efectos proapoptóticos de la acumulación de glucógeno? ¿Existen otras células sensibles de esta manera a la acumulación de glucógeno? Además, todavía queda por elucidar el enlace real entre la acumulación de glucógeno y el fenoti-

po clínico de la enfermedad de Lafora ¿por qué los síntomas empiezan a partir de una determinada edad? Por ejemplo, los niveles de expresión de PTG también podrían variar en función del estado hormonal. De hecho, ya se han descrito cambios de su expresión en cerebro en función de varias hormonas y neuromoduladores (72), por lo que podrían tener lugar determinadas situaciones en las que el complejo laforina-malina deba funcionar al máximo para controlar a PTG. Quizás, exista un estímulo que desencadene la activación de MGS en neuronas en una determinada edad y que necesite al complejo laforina-malina a pleno rendimiento. O quizás el hecho de que laforina o malina fallen desde el inicio provoque que se vaya acumulando glucógeno poco a poco hasta llegar a un punto en el que sea neurotóxico. Otros aspectos que permanecen desconocidos son, por ejemplo, el sustrato de la actividad fosfatasa de laforina, la importancia y la función de su actividad como fosfatasa de carbohidratos, la búsqueda de otras posibles dianas del complejo laforina-malina y la profundización en la regulación de este complejo. Otro de los misterios de la enfermedad de Lafora es la identidad del tercer gen implicado que se postula está afectado en aproximadamente un 10% de los pacientes... ¿Tendrá un papel en el metabolismo del glucógeno?

Sin duda, una de las preguntas más interesantes es por qué las neuronas están dotadas con el potencial para sintetizar glucógeno, si deben activar sistemas complejos para mantenerlo inactivo. Una posibilidad es que la estructura genómica del gen que codifica para la MGS (*gys1*) no permita el silenciamiento de la expresión de esta enzima sin interferir con la expresión de otros genes relevantes para la correcta función neuronal o que, simplemente, debido a su importancia para el funcionamiento del organismo este gen esté programado inicialmente para expresarse de manera ubicua. Aunque la hipótesis más interesante es que MGS pueda tener un papel independiente de la capacidad de sintetizar glucógeno y que pueda tener una función importante en neuronas. El hecho de que se acumule en el núcleo podría ser relevante para esta hipotética función alternativa.

La enfermedad de Lafora podría ser considerada el paradigma de las enfermedades neurológicas que acumulan glucógeno por la edad en que se manifiestan sus síntomas, su rápida progresión y sus dramáticas consecuencias. Sin embargo, la acumulación de polímeros de glucosa también tiene lugar en otras enfermedades neurológicas o neurodegenerativas y en aquellas asociadas con el envejecimiento. Una vez demostrados los efectos deletéreos de la acumulación de glucógeno en neuronas, no podemos dejar de formular la teoría de que la acumulación de glucógeno aberrante pueda estar implicada en la neurodegeneración o contribuir a los síntomas de algunas de estas enfermedades.

Es decir, que los efectos neurotóxicos del glucógeno sean un fenómeno más generalizado y no específico de la enfermedad de Lafora. Nosotros planteamos que esta enfermedad sea uno de los casos más extremos donde la acumulación de glucógeno tiene unos efectos más claros y graves. En este caso, al fallar directamente los «guardianes» del metabolismo del glucógeno se dispara su acumulación y los efectos neurotóxicos se observan rápidamente y de manera drástica. Quizás, en otras enfermedades, los cambios sobre el metabolismo del glucógeno son más sutiles y el polisacárido se acumula de forma ralentizada respecto a la enfermedad de Lafora. La posibilidad de que la acumulación de glucógeno esté implicada en varias enfermedades neurodegenerativas podría abrir un nuevo campo de investigación hacia la búsqueda de estrategias terapéuticas preventivas que permitan controlar el metabolismo del glucógeno. Tal vez, estos resultados sean la punta de lanza que le den una nueva dimensión al estudio de la formación de depósitos de polímeros de glucosa en neuronas y sirvan para dar relevancia a este proceso. La lista de enfermedades neurológicas que cursan con acumulación de glucógeno es extensa. En algunas de ellas, los efectos pueden parecer más obvios mientras que en otros probablemente representen un papel menor ya que la deposición de otras moléculas parece tener mucha más importancia relativa. Existe una amplia variación en el número de PGBs hallados que depende de la edad y de la enfermedad neurológica. Entre estas enfermedades, podemos encontrar las clásicas donde la acumulación de glucógeno anómalo se ha descrito como una característica inseparable: La enfermedad de Bielschowsky, la enfermedad de los cuerpos de poliglucosano del adulto y la enfermedad de Anderson. No hay que dejar de lado los cuerpos amiláceos, cuyo estudio se ha descuidado durante mucho tiempo debido a su aparente irrelevancia en enfermedades neurológicas. Estos depósitos están formados principalmente por polisacáridos, y presentan una composición muy similar a los cuerpos de Lafora con una estructura más similar al almidón que al glucógeno. La cantidad y dimensiones de estos cuerpos de inclusión son extraordinariamente bajas en jóvenes. Sin embargo, a partir de los 30-40 años se vuelven mucho más grandes y su número incrementa drásticamente. Su tamaño y número crecen de manera constante después de los 50 años, siendo mucho más numerosos en casos como el Parkinson. Por este motivo se asocian al envejecimiento y existe una opinión general basada en evidencias anecdóticas de que enfermedades neurológicas crónicas están asociadas con un incremento en su número, como el Alzheimer y la esclerosis múltiple (82). Por ejemplo, en la corteza cerebral de enfermos de Alzheimer se ha descrito la acumulación de PGBs (83). También se ha visto en estudios post-mortem que su cantidad incrementa en enfermos con encefalopatías vasculares (84). Existen

trabajos que sugieren que los cuerpos amiláceos podrían ser un indicador de neurodegeneración (85). En otras situaciones patológicas, también se ha encontrado una acumulación masiva de estos cuerpos amiláceos, como en epilepsias del lóbulo temporal (86-88). La cuantificación del contenido de glucógeno en cerebro de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, muestra un incremento de su contenido en cerebro (89). Otras situaciones patológicas muestran también una deposición de glucógeno en determinadas neuronas. Por ejemplo, la administración de drogas psicotrópicas (como la clorpromazina), la isquemia y la hipoxia. También se han observado acumulaciones de glucógeno en las neuronas adyacentes a tumores cerebrales. Además, se han observado depósitos de glucógeno en neuronas de pacientes diabéticos que muestran neuropatía y en ratas diabéticas crónicas.

Esperamos que este trabajo dé lugar a un renovado interés sobre el metabolismo del glucógeno en cerebro, un campo que se ha desarrollado de manera discreta aunque constante durante los últimos 25 años. Además, confiamos que contribuya a encontrar nuevas terapias que ayuden a combatir la enfermedad de Lafora, que resulta tan terrible tanto para los pacientes como para los familiares. Quizás, los efectos neurotóxicos del glucógeno puedan ser extrapolados a otras enfermedades con lo que se podrían desarrollar nuevas terapias que tengan en cuenta la acumulación de este polisacárido como un factor clave.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Susana Ros, Daniel Cifuentes, Lluís Pujadas, Jordi Vallès, Belén García-Fojeda, Olga Criado-García, Elena Fernández-Sánchez, Iria Medraño-Fernández, Jorge Domínguez, Mar García-Rocha y Eduardo Soriano su contribución a este trabajo. Agradecemos a Emma Veza y Anna Adrover su ayuda técnica y a José María Serratos y Pascual Sanz su asesoramiento. Este estudio fue financiado mediante subvenciones de *Fundació La Caixa*, *Fundació la Marató de TV3*, Fundación Marcelino Botín, por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-00913; BFU2005-02253), por el Instituto de Salud Carlos III (CIBER-ER y CIBERDEM) y por la *Generalitat de Catalunya* (2005-SGR-00570).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) NELSON, S.R. ET AL. (1968) Control of glycogen levels in brain. *J. Neurochem.* 15: 1271-9.

- (2) BROWN, A.M. (2004) Brain glycogen re-awakened. *J. Neurochem.* 89: 537-52.
- (3) BROWN, A.M. AND RANSOM, B.R. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia.* 55: 1263-71.
- (4) CATALDO, A.M. AND BROADWELL, R.D. (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J. Neurocytol.* 15: 511-24.
- (5) FRIER, B.M. AND FISHER, B.M. (1999) Hypoglycaemia in Clinical Diabetes. New York: John Wiley and Sons, Ltd.
- (6) GARRETT, R.H. AND GRISHAM, C.M. (1999) *Biochemistry*. Fort Worth: Saunders College Publishing.
- (7) STRYER, L. (1995) *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman & Co.
- (8) BROWN, A.M.; TEKKOK, S.B. AND RANSOM, B.R. (2003) Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J. Physiol.* 549: 501-12.
- (9) CHOI, I.Y.; SEAQUIST, E.R. AND GRUETTER, R. (2003) Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism *in vivo*. *J. Neurosci. Res.* 72: 25-32.
- (10) KONG, J. ET AL. (2002) Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J. Neurosci.* 22: 5581-7.
- (11) PALLADIN, A.V. (1965) *Biochemistry of the Nervous System*. Washington DC: Herschkopf S, ed.
- (12) FOLBERGROVA, J.; LOWRY, O.H. AND PASSONNEAU, J.V. (1970) Changes in metabolites of the energy reserves in individual layers of mouse cerebral cortex and subadjacent white matter during ischaemia and anaesthesia. *J. Neurochem.* 17: 1155-62.
- (13) ROSENGARTEN, H. (1970) Glycogen level and oxygen consumption of rabbit brain tissue slices under ethyl ether and halothane anesthesia. *Agressologie.* 11: 159-62.
- (14) CRUZ, N.F. AND DIENEL, G.A. (2002) High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 22: 1476-89.
- (15) SWANSON, R.A. ET AL. (1992) Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography. *Neuroscience.* 51: 451-61.
- (16) MAGISTRETTI, P.J. (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J. Exp. Biol.* 209: 2304-11.
- (17) MAGISTRETTI, P.J.; SORG, O. AND M. J.L. (1993) Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: physiological, pharmacological, and pathological aspects., in *Astrocytes: Pharmacology and Function*, S. Murphy, ed., Editor. Academic Press, Inc.: San Diego. p.: 243-265.

- (18) DRINGEN, R.; GEBHARDT, R. AND HAMPRECHT, B. (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 623: 208-14.
- (19) POITRY-YAMATE, C.L.; POITRY, S. AND TSACOPOULOS, M. (1995) Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J. Neurosci.* 15: 5179-91.
- (20) SCHURR, A.; WEST, C.A. AND RIGOR, B.M. (1988) Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science.* 240: 1326-8.
- (21) WENDER, R. ET AL. (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J. Neurosci.* 20: 6804-10.
- (22) BROWN, A.M. ET AL. (2005) Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J. Neurosci. Res.* 79: 74-80.
- (23) LAFORA, G.R. (1911) Über das Vorkommen amyloider Körperchen im Innern der Ganglienzellen; zugleich Ein zum Studium der amyloiden Substanz im Nervensystem. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 205: 294-303.
- (24) LAFORA, G.R. AND GLUECK, B. (1911) Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 6: 1-14.
- (25) NANDURI, A.S. ET AL. (2008) The maestro don Gonzalo Rodriguez-Lafora. *Epilepsia.*
- (26) SAKAI, M. ET AL. (1970) Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amyloidea. *Neurology.* 20: 160-76.
- (27) YOKOI, S.; AUSTIN, J. AND WITMER, F. (1967) Isolation and characterization of Lafora bodies in two cases of myoclonus epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26: 125-7.
- (28) YOKOI, S. ET AL. (1968) Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). I. Isolation and preliminary characterization of Lafora bodies in two cases. *Arch. Neurol.* 19: 15-33.
- (29) YOKOI, S.; NAKAYAMA, H. AND NEGISHI, T. (1975) Biochemical studies on tissues from a patient with Lafora disease. *Clin. Chim. Acta.* 62: 415-23.
- (30) BERKOVIC, S.F. ET AL. (1993) Progressive myoclonus epilepsies: clinical and genetic aspects. *Epilepsia.* 34: S19-30.
- (31) BUSARD, B.L. ET AL. (1986) Lafora's disease. Comparison of inclusion bodies in skin and in brain. *Arch. Neurol.* 43: 296-9.

- (32) BUSARD, H.L. ET AL. (1987) Axilla skin biopsy: a reliable test for the diagnosis of Lafora's disease. *Ann. Neurol.* 21: 599-601.
- (33) CAVANAGH, J.B. (1999) Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 29: 265-95.
- (34) HARRIMAN, D.G.; MILLAR, J.H. AND STEVENSON, A.C. (1955) Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis. *Brain.* 78: 325-49.
- (35) MINASSIAN, B.A. ET AL. (2000) Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Neurology.* 55: 341-6.
- (36) NISHIMURA, R.N. ET AL. (1980) Lafora disease: diagnosis by liver biopsy. *Ann. Neurol.* 8: 409-15.
- (37) ROGER, J. ET AL. (1992) Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence. Ed. J. Roger, et al. London: Libbey.
- (38) ROGER, J. ET AL. (1983) Early diagnosis of Lafora disease. Significance of paroxysmal visual manifestations and contribution of skin biopsy. *Rev. Neurol. (Paris).* 139: 115-24.
- (39) VAN HEYCOPTEN HAM, M.W. (1974) The Epilepsies. Handbook of Clinical Neurology, ed. P.J. Vinken and G.W. Bruyn. Vol. 15. Amsterdam: North Holland Publishing Group Company.
- (40) MINASSIAN, B.A. (2001) Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. *Pediatr. Neurol.* 25: 21-9.
- (41) CARPENTER, S. ET AL. (1974) Lafora's disease: peroxisomal storage in skeletal muscle. *Neurology.* 24: 531-8.
- (42) SCHWARZ, G.A. AND YANOFF, M. (1965) Lafora's Disease. Distinct Clinico-Pathologic Form of Unverricht's Syndrome. *Arch. Neurol.* 12: 172-88.
- (43) GANESH, S. ET AL. (2002) Genotype-phenotype correlations for EPM2A mutations in Lafora's progressive myoclonus epilepsy: exon 1 mutations associate with an early-onset cognitive deficit subphenotype. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1263-71.
- (44) GANESH, S. ET AL. (2006) Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *J. Hum. Genet.* 51: 1-8.
- (45) GOMEZ-ABAD, C. ET AL. (2005) Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology.* 64: 982-6.
- (46) MINASSIAN, B.A. ET AL. (1999) Genetic locus heterogeneity in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Ann. Neurol.* 45: 262-5.
- (47) CHAN, E.M. ET AL. (2004) Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosans (Lafora disease): evidence for a third locus. *Neurology.* 63: 565-7.

- (48) MINASSIAN, B.A., ET AL. (1998) Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 20: 171-4.
- (49) SERRATOSA, J.M., ET AL. (1999) A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum. Mol. Genet.* 8: 345-52.
- (50) GANESH, S., ET AL. (2000) Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2251-61.
- (51) WANG, J., ET AL. (2002) A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen. *J. Biol. Chem.* 277: 2377-80.
- (52) GANESH, S., ET AL. (2001) Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 1046-53.
- (53) TAGLIABRACCI, V.S. ET AL. (2007) Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104: 19262-6.
- (54) WORBY, C.A.; GENTRY, M.S. AND DIXON, J.E. (2006) Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 281: 30412-8.
- (55) FERNANDEZ-SANCHEZ, M.E. ET AL. (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: 3161-71.
- (56) CHAN, E.M. ET AL. (2003) Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22. *J. Med. Genet.* 40: 671-5.
- (57) CHAN, E.M. ET AL. (2003) Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 35: 125-7.
- (58) FREEMONT, P.S. (2000) RING for destruction? *Curr. Biol.* 10: R84-7.
- (59) PICKART, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 503-33.
- (60) HERSHKO, A. ET AL. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258: 8206-14.
- (61) SUN, L. AND CHEN, Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 119-26.
- (62) GENTRY, M.S.; WORBY, C.A. AND DIXON, J.E. (2005) Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 8501-6.

- (63) LOHI, H. ET AL. (2005) Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 14: 2727-36.
- (64) FERRER, J.C. ET AL. (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* 546: 127-32.
- (65) GOMIS, R.R. ET AL. (2002) Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase. *J. Biol. Chem.* 277: 23246-52.
- (66) SKURAT, A.V.; DIETRICH, A.D. AND ROACH, P.J. (2000) Glycogen synthase sensitivity to insulin and glucose-6-phosphate is mediated by both NH₂- and COOH-terminal phosphorylation sites. *Diabetes.* 49: 1096-100.
- (67) VILLAR-PALASI, C. (1991) Substrate specific activation by glucose 6-phosphate of the dephosphorylation of muscle glycogen synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1095: 261-7.
- (68) SKURAT, A.V.; WANG, Y. AND ROACH, P.J. (1994) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 269: 25534-42.
- (69) MACAULAY, K. ET AL. (2003) Use of lithium and SB-415286 to explore the role of glycogen synthase kinase-3 in the regulation of glucose transport and glycogen synthase. *Eur. J. Biochem.* 270: 3829-38.
- (70) BRADY, M.J. AND SALTIEL, A.R. (2001) The role of protein phosphatase-1 in insulin action. *Recent Prog. Horm. Res.* 56: 157-73.
- (71) PRINTEN, J.A.; BRADY, M.J. AND SALTIEL, A.R. (1997) PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science.* 275: 1475-8.
- (72) ALLAMAN, I.; PELLERIN, L. AND MAGISTRETTI, P.J. (2000) Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. *Glia.* 30: 382-91.
- (73) GREENBERG, C.C. ET AL. (2003) Protein targeting to glycogen overexpression results in the specific enhancement of glycogen storage in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 30835-42.
- (74) SCHLAMOWITZ, M. (1951) On the nature of rabbit liver glycogen. II. Iodine absorption spectrum. *J. Biol. Chem.* 190: 519-27.
- (75) VÍLCHEZ, D. ET AL. (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10: 1407-13.
- (76) LEE, D.H. AND GOLDBERG, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8: 397-403.

- (77) SOLAZ-FUSTER, M.D. ET AL. (2007) Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.*
- (78) ROACH, P.J. AND LARNER, J. (1976) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. II. Enzyme phosphorylation state and effector concentrations as interacting control parameters. *J. Biol. Chem.* 251: 1920-5.
- (79) SALAVERT, A. ET AL. (1979) Multiple phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-1. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties. *FEBS Lett.* 106: 279-83.
- (80) SWANSON, R.A. AND CHOI, D.W. (1993) Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation *in vitro*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13: 162-9.
- (81) MAGISTRETTI, P.J. AND ALLAMAN, I. (2007) Glycogen: a Trojan horse for neurons. *Nat. Neurosci.* 10: 1341-2.
- (82) SINGHRAO, S.K., ET AL. (1995) A functional role for corpora amylacea based on evidence from complement studies. *Neurodegeneration.* 4: 335-45.
- (83) HUANG, L. ET AL. (2004) Accumulation of high-molecular-weight amylose in Alzheimer's disease brains. *Glycobiology.* 14: 409-16.
- (84) LEEL-ÖSSY, L. (1991) Pathological significance and characteristics of corpus amylaceum. *Neuropatholgy.* 11: 105-114.
- (85) SINGHRAO, S.K.; NEAL, J.W. AND NEWMAN, G.R. (1993) Corpora amylacea could be an indicator of neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19: 269-76.
- (86) LOISEAU, H. ET AL. (1992) Occurrence of polyglucosan bodies in temporal lobe epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 55: 1092-3.
- (87) LOISEAU, H. ET AL. (1993) Polysaccharide bodies: an unusual finding in a case of temporal epilepsy. Review of the literature. *Rev. Neurol. (Paris).* 149: 192-7.
- (88) MACKENZIE, J.M. (1993) Polyglucosan bodies are not an unusual finding in temporal lobe epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 56: 577.
- (89) DALSGAARD, M.K. ET AL. (2007) High glycogen levels in the hippocampus of patients with epilepsy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27: 1137-41.