

Tesis de Posgrado

Organización subcelular y topografía de la O-glicosilación en células de mamífero

Abeijón, Claudia

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Abeijón, Claudia. (1987). Organización subcelular y topografía de la O-glicosilación en células de mamífero. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2086_Abeijon.pdf

Cita tipo Chicago:

Abeijón, Claudia. "Organización subcelular y topografía de la O-glicosilación en células de mamífero". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2086_Abeijon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ORGANIZACION SUBCELULAR Y TOPOGRAFIA DE
LA O-GLICOSILACION EN CELULAS DE MAMIFERO

Lic. Claudia Abeijón

Tesis para optar el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Director de Tesis: Dr. Carlos Benjamín Hirschberg

Lugar de Trabajo: Departamento de Bioquímica,
Saint Louis University, School of
Medicine, SAINT LOUIS, MO, (USA).

Departamento de Bioquímica,
University of Massachusetts,
Medical Center, WORCESTER, MA, (USA).

- Tesis 2086 -

Ej. 2

1987

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos B. Hirschberg, por su persistente apoyo y clara guía durante este trabajo.

Al Dr. Julio M. Azcurra, en cuya cátedra inicié mi formación científica, y a su entonces Jefe de Trabajos Prácticos, el Dr. Juan M. Capasso, por las oportunidades y el estímulo que me brindaron.

A Norberto Gherbesi, mi esposo, por haber editado este trabajo, y por su aliento y comprensión constante a lo largo de estos años.

Al Lic. Marcos Milla, por la lectura crítica y corrección de esta tesis, y a la Lic. Patricia Berninsone, por su dedicada ayuda.

Por último, pero de modo igualmente sincero, a mis padres, María y Virginio, demás familiares y amigos, que de una u otra manera me alentaron con su entusiasmo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AcNeu:	ácido N-acetilneuramínico = ácido siálico.
AMP:	adenosina 5'monofosfato.
CMP:	citocina 5'monofosfato.
CMP-AcNeu:	citocina 5'monofosfato ácido N-acetilneuramínico.
cpm:	cuentas por minuto.
g:	gramos.
G:	aceleración de la gravedad.
GMP:	guanosina 5'monofosfato.
h:	hora.
KD:	kilo dalton.
KM:	constante de Micaelis-Menten.
PAGE:	electroforesis en geles de poliacrilamida.
psi:	(pound per square inch) libra por pulgada al cuadrado.
RE:	retículo endoplásmico.
REL:	retículo endoplásmico liso.
RER:	retículo endoplásmico rugoso.
SDS:	dodecil sulfato de sodio.
Ser:	serina.
Thr:	treonina.
UDP-Gal:	uridina 5'difosfato galactosa.
UDP-GalNAc:	uridina 5'difosfato N-acetilgalactosamina.
UDP-GlcNAc:	uridina 5'difosfato N-acetilglucosamina.
UMP:	uridina 5'monofosfato.

CAPITULO 1: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

1.1. Las glicoproteínas.	1
1.2. Tipos de enlace glicosídico.	7
1.3. O-glicosilación: distribución y funciones.	10
1.4. Biosíntesis de los enlaces glicosídicos.	13
Figura I.	18
Figura II.	20
1.5. Topografía de las reacciones de glicosilación.	22
1.6. Objetivos específicos.	27

CAPITULO 2: DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA UDP-GalNAc: POLIPEPTIDO (ALFA 1-O) N-ACETILGALACTOSAMINILTRANSFERASA.

2.1. Materiales y métodos.	30
2.1.a. Obtención de vesículas derivadas del aparato de Golgi, RER y REL de hígado de rata.	30
2.1.b. Marcadores enzimáticos.	32
2.1.c. Preparación del aceptor exógeno: apomucina.	34
2.1.d. Ensayo para la UDP-GalNAc: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa.	35
2.1.e. Separación de acetilhexosaminas.	36
Figura III.	37
2.2. Resultados.	38
2.2.a. Estabilidad del sustrato UDP-GalNAc durante la reacción.	38
2.2.b. Distribución subcelular de la UDP-GalNAc: polipéptido (alfa 1-O) N-acetilgalactosaminiltransferasa.	39
2.2.c. Topografía de la UDP-GalNAc: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa.	42
2.2.d. Resumen.	44
Tabla I.	45
Tabla II.	47
Tabla III.	48

CAPITULO 3: TRANSPORTE DE UDP-GalNac A TRAVES DE MEMBRANAS DEL APARATO DE GOLGI.

3.1. Materiales y métodos.	49
3.1.a. Obtención de vesículas derivadas del aparato de Golgi de hígado de rata.	49
3.1.b. Síntesis de [³ H]UDP-GalNac.	50
3.1.c. Preparación de [¹⁴ C]GalNac 1-fosfato.	52
3.1.d. Ensayo de translocación.	52
3.1.e. Separación de especies solubles radioactivas luego de la incubación con nucleótidos azúcar.	54
3.1.f. Cálculos usados para determinar la translocación de nucleótidos azúcar.	56
Figura IV.	60
3.2. Resultados.	61
3.2.a. Incubación de vesículas de Golgi con UDP-GalNac.	61
3.2.b. Incubación de vesículas de Golgi con una mezcla de [³ H]UDP-GalNac y UDP-[¹⁴ C]GalNac: evidencia de la translocación del nucleótido azúcar entero.	64
3.2.c. Resumen.	66
Tabla IV.	67
Figura V.	69
Tabla V.	71
Tabla VI.	73

CAPITULO 4: MECANISMO DE TRANSPORTE Y DISTRIBUCION DE LOS ACEPTORES ENDOGENOS PARA GalNac.

4.1. Materiales y métodos.	75
4.1.a. Aislamiento de RER, REL y Golgi de hígado de rata.	75
4.1.b. Integridad y topografía de las vesículas aisladas del retículo endoplásmico (RER y REL).	76
4.1.c. Ensayo de translocación.	77

4.2. Resultados.	78
4.2.a. Mecanismo de transporte de UDP-GalNAc a vesículas derivadas del aparato de Golgi.	78
4.2.b. Comparación de la velocidad de transporte de UDP-GalNAc con otros nucleótidos azúcar.	80
4.2.c. Caracterización del transporte de UDP-GalNAc a vesículas del retículo endoplásmico y aparato de Golgi.	81
4.2.d. Ubicación de los aceptores endógenos para GalNAc en el hígado de rata.	83
4.2.e. Resumen.	85
Tabla VII.	86
Tabla VIII.	88
Tabla IX.	89
Tabla X.	91

CAPITULO 5: DISTRIBUCION TOPOGRAFICA DE LA N-ACETILGLUCOSAMINA TERMINAL EN PROTEINAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO.

5.1. Materiales y métodos.	92
5.1.a. Obtención de las distintas fracciones subcelulares de hígado de rata.	92
5.1.b. Determinación de proteínas y ARN.	96
5.1.c. Autogalactosilación de la galactosiltransferasa de la leche bovina.	96
5.1.d. Marcado de las diferentes fracciones subcelulares con UDP-Gal radioactiva y galactosiltransferasa.	97
5.1.e. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS).	98
5.2. Resultados.	100
5.2.a. El retículo endoplásmico contiene en su membrana glicoproteínas intrínsecas con aceptores para galactosa orientados al lado citosólico.	103

5.2.b.	Los aceptores para galactosa orientados hacia el lado citosólico de las vesículas del retículo endoplásmico, no están presentes en el aparato de Golgi.	108
5.2.c.	Los aceptores para galactosa orientados hacia el lado citosólico de las vesículas del retículo endoplásmico, no están presentes en el citoplasma, los lisosomas, la membrana plasmática o el núcleo celular.	110
5.2.d.	Resumen.	112
	Figura VI.	113
	Figura VII.	115
	Figura VIII.	117
	Figura IX.	119
	Figura IX-A.	121
	Figura X.	123
	Figura XI.	125
	Figura XII.	127

CAPITULO 6: DETERMINACION DEL TIPO DE UNION GLICOSIDICA ENTRE LA N-ACETILGLUCOSAMINA TERMINAL Y LAS PROTEINAS INTEGRALES DE LA MEMBRANA DEL RETICULO ENDOPLASMICO.

6.1.	Materiales y métodos.	129
6.1.a.	Tratamiento con la enzima péptido: N-glicosidasa F.	129
6.1.b.	Análisis de la unión entre la proteína y el oligosacárido: reacción de beta-eliminación.	130
6.1.c.	Procedimientos cromatográficos.	131
6.1.d.	Cuantificación de radioactividad.	132
6.2.	Resultados.	133
6.2.a.	La proteína galactosilada de 56 KD del REL es resistente a tratamiento con péptido: N-glicosidasa F.	134

6.2.b.	La proteína galactosilada de 56 KD del REL contiene O-GlcNAc orientado al lado citoplasmático.	136
6.2.c.	Resumen.	137
	Figura XIII.	138
	Figura XIV.	140
CAPITULO 7: DISCUSION, CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS.		
7.1.	Iniciación de la O-glicosilación (tipo mucina).	142
7.2.	Ocurrencia de proteínas intrínsecas de membrana en el retículo endoplásmico con los azúcares orientados al lado citoplásmico.	149
7.3.	Conclusiones.	154
7.4.	Direcciones futuras.	156
	LITERATURA CITADA.	160

CAPITULO 1

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

1.1 LAS GLICOPROTEINAS.

Las glicoproteínas son un grupo de compuestos biológicos caracterizados por tener hidratos de carbono covalentemente unidos a ciertos aminoácidos del esqueleto polipeptídico. Son ubicuos constituyentes de casi todos los organismos vivientes. Ellas existen dentro de la célula unidas a membranas y en forma soluble, así como también formando parte de la matriz extracelular y de los fluidos intercelulares.

La mayoría de las glicoproteínas unidas a membrana se encuentran en la membrana plasmática con los azúcares expuestos a la superficie celular (Nicolson y Singer, 1974; Steck, 1974; Rothman y Lenard, 1977). Estudios inmunoquímicos con lectinas, y bioquímicos con glicosidasas han mostrado que, dentro de la célula, los oligosacáridos unidos a proteínas se encuentran, fundamentalmente, en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y del aparato de Golgi (Rodríguez-Boulan et al., 1978; Tartakoff y Vassalli, 1983).

El mecanismo por el cual se establece esta asimetría es conocido actualmente. Las proteínas de membrana y proteínas secretorias son traducidas en polirribosomas unidos a membrana y son co- o post-traduccionalmente insertadas, con el grupo amino terminal primero, en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), o liberados en el lumen del mismo. (Sabatini et al., 1982; Wickner y Lodish, 1985). Los azúcares son adheridos co- y post-traduccionalmente en el lumen del RER y del aparato de Golgi (Katz, et al, 1977; Rothman y Lodish, 1977; Lingappa et al., 1978; Bergman y Kuehl, 1978). Poco tiempo despues de haber sido glicosiladas en el RER, la mayoría de las proteínas solubles, pasan al lumen del aparato de Golgi, desde donde son destinadas al lumen de los lisosomas, o son secretadas por exocitosis (Sabatini et al., 1982). Las proteínas intrínsecas de membrana que son glicosiladas en el RE, migran, a través de vesículas, al aparato de Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática. En dicha membrana las vesículas son incorporadas por fusión exocítica. Este es el evento que explica como los azúcares de las glicoproteínas ensambladas en el lumen del RE y aparato de Golgi, son expuestos al exterior en la superficie celular (Rothman y Lenard, 1977). La cara extracelular de la membrana plasmática es topográficamente equivalente al lumen de las organelas intracelulares.

Los monosacáridos, como los aminoácidos y los nucleótidos, pueden formar cadenas poliméricas con una gran variedad de estructuras específicas. No obstante la diversidad de estructuras que pueden ser formadas por un número limitado de monómeros es mucho mayor en las cadenas hidrocarbonadas que en los péptidos u oligonucleótidos. Esto se debe a que un monosacárido tiene tres o cuatro sitios diferentes para ser sustituido por el siguiente azúcar, a diferencia de los aminoácidos y nucleótidos que tienen un solo sitio de unión con la siguiente unidad monomérica. Otro factor que contribuye a la multiplicidad de estructuras de las cadenas hidrocarbonadas es que los monosacáridos pueden formar dos estructuras anoméricas: alfa y beta.

Estos factores posibilitan que los carbohidratos puedan modificar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, cambiando su hidrofobicidad, su carga eléctrica, su masa y su forma. Pueden estabilizar la conformación de las proteínas y servir como señales específicas de reconocimiento.

Los carbohidratos presentes en las glicoproteínas no tienen una función universal, sino que están implicados en una variedad de importantes funciones celulares. Entre ellas:

-Regulación del crecimiento celular, reconocimiento intercelular y adhesión celular (Olden et al., 1982; Feizi y Childs, 1985).

-Regulación de la respuesta inmune (Higgins et al., 1980).

-Transformación celular (Meezan et al., 1969; Buck et al., 1970; Buck et al., 1971; Smets et al., 1977; Van Nest y Grimes, 1977).

-Biogénesis de membrana (Balch et al., 1984; Braell et al., 1984).

-Reciclaje de membranas (Wall et al., 1980; Brown et al., 1983; Snider y Rogers, 1985).

-Distribución de proteínas a diferentes organelas (Sly et al., 1981; Guan y Rose, 1984; Sambrook et al., 1985).

-Control de la vida media de las glicoproteínas en el sistema circulatorio de los animales superiores (Ashwell et al., 1974; Hudgin et al., 1974).

-Control de la internalización de glicoproteínas por parte de las células (Kawasaki y Ashwell, 1977; Rome et al., 1979; Kawasaki et al., 1978).

El descubrimiento de las dos últimas funciones mencionadas, ha abierto nuevas posibilidades para destinar drogas a sitios específicos del organismo y para tratamiento de enfermedades genéticas por reemplazo de moléculas deficientes. Como ejemplo de importancia médica, citaremos el caso de la eritropoyetina, glicoproteína que estimula la diferenciación de los glóbulos rojos. Recientemente se ha publicado la estructura de los carbohidratos de la eritropoyetina producida mediante

tecnología de DNA recombinante en células de mamíferos (CHO) (Sasaki et al., 1987). Es importante destacar que la eritropoyetina producida en E. coli (organismo que no glicosila proteínas), o en levaduras (cuya glicosilación terminal difiere de la de los mamíferos), fue inactiva o muy poco activa in-vivo. Por otro lado, la eritropoyetina producida en células de mamífero, CHO, tiene plena actividad cuando es inyectada en el torrente circulatorio. (Sasaki et al., 1987).

Es evidente que para poder aprovechar cabalmente la posibilidad de síntesis en cantidad de macromoléculas biológicas de importancia médica o económica, que ofrece el desarrollo de la ingeniería genética, se debiera avanzar concomitantemente en el conocimiento de los mecanismos de glicosilación y en la regulación de los mismos.

Muchas hormonas proteicas son glicoproteínas, y en las hormonas hipofisarias humanas y bovinas recientemente se encontraron oligosacáridos sulfatados característicos (Green et al., 1985, 1986).

La inhibición de la glicosilación y/o el procesamiento de los oligosacáridos tienen efectos en la multiplicación viral. La estabilidad de las glicoproteínas virales disminuye, por aumento de su susceptibilidad a la proteólisis intracelular (Holmes et al., 1981; Rottier et al., 1981). El procesamiento proteolítico de las

poliproteínas precursoras de las distintas proteínas virales, es defectuoso o inexistente (Klenk y Rot, 1980; Bosch et al., 1984). El tránsito intracelular y destino final de las partículas virales también se ve afectado (Repp et al., 1985).

En ciertos casos no se ha encontrado rol funcional a la parte glicosídica de las moléculas. Por ejemplo la ribonucleasa A bovina, no posee carbohidratos y tiene exactamente las mismas propiedades cinéticas que la ribonucleasa B, que es glicosilada (Jutisz y De la Llosa, 1972). La remoción de los carbohidratos de muchas enzimas glicosiladas no tiene efecto en sus actividades catalíticas (Pazur y Aronson, 1973; Schauer, 1973; Spiro, 1973). Pero en estos experimentos se ve que las enzimas deglicosiladas tienen mucha menor estabilidad térmica, indicando un efecto estabilizador de los carbohidratos sobre las proteínas.

1.2. TIPOS DE ENLACE GLICOSIDICO.

Un modo conveniente de clasificar las cadenas de oligosacaridos, es de acuerdo al enlace covalente entre el aminoácido del polipéptido y el primer azúcar en el oligosacárido. Se definen así, las uniones N-glicosídica y O-glicosídica.

El enlace N-glicosídico se produce entre el carbono anomérico de la N-acetilglucosamina y el nitrógeno del grupo amida de la asparagina. Este enlace fue establecido para la ovoalbúmina en una serie de trabajos de Marshall, Neuberger y sus colaboradores (Johansen et al., 1961; Fletcher et al., 1963; Marks et al., 1963), y simultaneamente por otros grupos de investigadores (Nuenke y Cunningham, 1961; Yamashina y Makino, 1962). En los eucariotes existe solo un tipo de enlace N-glicosídico.

El enlace O-glicosídico se produce entre el oxhidrilo de los beta hidroxiaminoácidos, serina y treonina, y la N-acetilgalactosamina en las glicoproteínas (Anderson et al., 1964; Tanaka et al., 1964; Harbon et al., 1964) o la xilosa en los proteoglicanes (Grebner et al., 1966 a,b).

En el colágeno y proteínas similares, se ha encontrado un tipo particular de enlace O-glicosídico entre hidroxilisina y galactosa (Butler y Cunningham, 1966; Spiro, 1967 a,b).

Recientemente se han descrito dos nuevos tipos de enlace O-glicosídico a serina o treonina.

Uno de ellos consiste de O-Nacetilglucosamina, unida a serina o treonina. Este enlace fue identificado en la superficie de linfocitos (Torres y Hart, 1984) y posteriormente, en el interior de varios tipos celulares (Holt y Hart, 1986). Consiste de una única N-Acetilglucosamina unida por unión O-glicosídica a serina o treonina. El hecho de que se trate de un único residuo glicosídico, es quizás, una de las causas por las cuales este enlace había pasado inadvertido hasta ahora. Su naturaleza está claramente establecida, pues se ha aislado el fragmento peptídico conteniendo serina/treonina formando enlace O-glicosídico con N-acetilglucosamina (Holt et al., 1987).

En proteoglicanos de cerebro se encontró manosa en enlace O-glicosídico con el polipéptido, sustituido luego por un trisacárido terminado en ácido siálico (Krusius et al., 1986).

Hasta el momento, los autores no han podido aislar el fragmento proteolítico con el enlace entre el carbohidrato y el péptido conteniendo solo la manosa y serina o treonina; por ello no está excluida la posibilidad de que la manosa este indirectamente unida al polipéptido mediante fosfato o sulfato, por ejemplo. Enlaces entre manosa y serina o treonina han sido encontrados en algunos

microbios y en invertebrados (Nakajima y Ballou, 1974; Raizda et al., 1975; Spiro y Bhoyroo, 1971), pero hasta el presente no habían sido encontrados en tejidos de mamífero.

En una misma glicoproteína pueden estar presentes, simultáneamente, cadenas de oligosacáridos unidas por enlaces N-glicosídicos y O-glicosídicos (Spiro, 1973; Samor et al., 1982).

1.3.0-GLICOSILACION: DISTRIBUCION Y FUNCIONES.

Como mencionaramos previamente, el tipo mas abundante de O-glicosilación en las glicoproteínas es el iniciado por N-acetilgalactosamina unida a serina o treonina.

Esta unión es característica de glicoproteínas presentes en las membranas mucosas, llamadas mucinas. Estas proteínas son generalmente ricas en ácido siálico y/o azúcares sulfatados que tienen carga neta a pH fisiológico. Estas moléculas forman geles viscoelásticos que protegen la superficie de las mucosas del ataque por proteasas o de invasión bacteriana. Típicamente mas del cincuenta por ciento del peso de las mucinas es carbohidrato. La parte peptídica puede contener mas de la mitad de sus aminoácidos como serina y/o treonina, siendo los restantes prolina, ácido glutámico, glicina y alanina (Hill et al., 1977 a,b). Las propiedades físicas de las mucinas estan determinadas en gran medida por los carbohidratos.

Algunas proteínas plasmáticas tambien poseen carbohidratos en unión O-glicosídica. En la mayoría de los casos las moléculas tienen tambien cadenas hidrocarbonadas unidas por unión N-glicosídica. Como ejemplo citaremos:

-Factores de coagulación (Mizouchi et al., 1980);

- plasminógeno (Hayes y Castellino, 1979);
- algunas inmunoglobulinas, principalmente Ig A (Baenziger y Kornfeld, 1974);
- colinesterasa (Uhlenbruck et al., 1977);
- gonadotrofina coriónica (Kessler et al., 1979).

Un grupo de glicoproteínas plasmáticas que merece especial mención es el encontrado en ciertos peces polares. Su presencia en solución, baja considerablemente el punto de congelación del agua, protegiendo a los peces del congelamiento en el entorno helado en que habitan. Estas glicoproteínas consisten de entre diecisiete y cincuenta unidades repetitivas de tres aminoácidos: Ala-Ala-Thr, donde cada treonina está substituida por el disacárido Gal beta 1-3 GalNac alfa-1-O-Thr (Osuga y Feeney, 1978).

La remoción de estas unidades de disacáridos por digestión con glicosidasas, o la oxidación de las unidades de galactosa por galactosa oxidasa, destruye las propiedades anticongelantes de estas glicoproteínas. En este caso la glicosilación juega un rol vital en las propiedades físicas y biológicas de esta familia de proteínas (Geoghegan et al., 1980).

Entre las proteínas integrales de membrana con carbohidratos en unión O-glicosídica las mejor estudiadas son las glicoforinas de los eritrocitos. La glicoforina A humana tiene un peso molecular de 31.000 y consiste de un

60% de carbohidrato (Furthmayr,1978). Todas las cadenas hidrocarbonadas estan en el extremo amino terminal, expuesto extracelularmente. Son quince cadenas unidas O-glicosídicamente y una con unión N-glicosídica. Variaciones en los hidratos de carbono de la glicoforina A determinan los grupos sanguíneos humanos del sistema M-N (Prohaska et al., 1981).

1.4. BIOSINTESIS DE LOS ENLACES GLICOSIDICOS.

En la última década han habido importantes avances en la comprensión de la ruta biosintética de formación del enlace N-glicosídico. Está claramente establecido que este tipo de unión se construye a partir de los nucleótidos azúcar precursores en dos etapas sucesivas. Primero se arma el oligosacárido por adición ordenada de azúcares sobre un lípido transportador, el dolicol fosfato. El lípido-oligosacárido precursor fue descubierto en 1971 por Leloir y sus colaboradores (Behrens et al., 1971; Behrens et al., 1973) y luego caracterizado en varios laboratorios (literatura revisada por Kornfeld y Kornfeld, 1985). Consiste de un oligosacárido con la composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unido por un grupo pirofosfato al dolicol. Después el oligosacárido completo es transferido en bloque, del dolicol fosfato a un residuo asparagina en la secuencia asparagina-x-serina, en el polipéptido recientemente sintetizado. Este proceso ocurre en el retículo endoplásmico rugoso y tanto el lípido-oligosacárido como las enzimas que participan en su síntesis están fuertemente unidas a la membrana de esta organela (literatura revisada por Kornfeld y Kornfeld, 1985).

El armado del oligosacárido que será unido por enlace N-glicosídico a la asparagina, es un proceso común a casi todos los eucariotes. La síntesis y transferencia del oligosacárido unido a lípido se ha observado en células de aves y mamíferos (Hubbard e Ivatt, 1981; Elbein, 1979; Parodi y Leloir, 1979; Struck y Lennarz, 1980; Snider y Robbins, 1981) así como también en insectos (Quesada-Allue, 1980), levaduras (Lehle, 1980; Trimble et al., 1980) y plantas (Staneloni et al., 1980; Lehle, 1981).

En una segunda etapa, el oligosacárido ya unido a proteínas es extensamente modificado por remoción y adición de azúcares obteniéndose varios productos finales (fig. 1), (literatura revisada por Kornfeld y Kornfeld, 1985). Todos tienen en común la estructura central $\text{Man}_3\text{-GlcNAc}_2$ en el extremo reductor unido a la asparagina, indicada por las líneas punteadas.

Los oligosacáridos ricos en manosa (fig. 1a), conservan una estructura muy similar a la del precursor. Los oligosacáridos complejos (fig. 1b), tienen entre dos y cinco brazos terminales con ácido siálico-Gal-GlcNAc unidos a la estructura central y también una fucosa unida a la primera de las GlcNAc interiores. Los oligosacáridos híbridos (fig. 1c), tienen estructuras de ambos tipos, complejas y ricas en manosa. Además poseen un residuo de GlcNAc unido con enlace beta 1-4 a la manosa más interna.

El proceso de iniciación de la síntesis de oligosacáridos unidos a asparagina por enlace N-glicosídico

ocurre en el RER mediante un único camino, común a casi todos los eucariotes, y todas las cadenas oligosacarídicas de este tipo comparten la estructura central GlcNAC₂-Man₃ (Kornfeld y Kornfeld, 1985).

En el caso del enlace O-glicosídico la diversidad es mucho mayor y como previamente mencionáramos existen varios tipos, algunos recientemente descritos.

Aún para el tipo más abundante en proteínas O-GalNac unida a serina o treonina, no existe una única estructura central compartida, sino, por lo menos cuatro distintas (Bahl, 1969; Baenziger y Kornfel, 1974; Finne, 1975; Takasaki et al., 1978; Oates et al., 1974); (fig. 2). Se observa en esta figura, que la cantidad de monosacáridos por cadena es también muy variable. El único rasgo en común es la presencia de O-GalNac, unida a serina o treonina. Estas estructuras se denominan del tipo mucina, pues son muy abundantes en estas proteínas de las membranas mucosas.

Contrariamente a lo que ocurre con la síntesis de oligosacáridos con enlace N-glicosídico, en este caso los azúcares son agregados uno a uno, directamente al polipéptido, a partir de los nucleótidos azúcar precursores, sin intervención de lípidos fosfato (Hanover et al., 1980). Otra diferencia existente entre ambos tipos de glicosilación, es la falta de una secuencia polipeptídica específica alrededor de los residuos serina y/o treonina que sirva de sitio de reconocimiento para

iniciar la O-glicosilación (Hill et al., 1977 b; Young et al., 1979; Briand et al., 1981).

Existe cierta evidencia de que la estructura secundaria puede ser de importancia (Aubert et al., 1976; Loucheux-Lefebvre et al., 1978), pero hasta el presente no se conoce una estructura primaria ni secundaria indispensable para la iniciación de la O-glicosilación.

Aunque su ruta biosintética es mucho menos complicada que la de los oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídico a asparagina, sorprendentemente, existe mucho menos información disponible. Los datos referentes al sitio subcelular de iniciación de la O-glicosilación tipo mucina son ambiguos.

Se ha publicado evidencia sugiriendo que la adición de GalNAC a serina o treonina en las proteínas ocurre co-traduccionalmente en el RER de la mucosa gástrica y los islotes pancreáticos (Strous, 1979; Patzelt y Weber, 1986). El RER, también ha sido descrito como el sitio donde se agrega xilosa a serina/treonina en glicosaminoglicanos de condrocitos (Geetha-Habib et al., 1984; Hoffman et al., 1984).

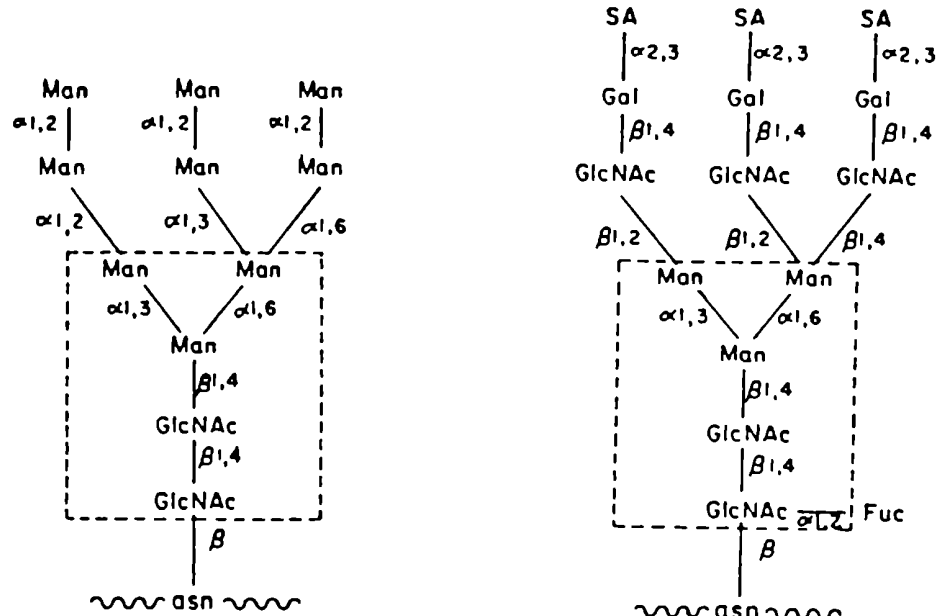
Otros estudios sugieren el REL o el aparato de Golgi como sitios de iniciación de la O-glicosilación del tipo mucina (Hanover et al., 1980; Kim et al., 1971; Soulier y Gaye, 1981; Cummings et al., 1983; Jokinen et al., 1985; Lohmander et al., 1986).

La UDP-GalNac : polipéptido (alfa 1-0) N-acetilgalactosaminiltransferasa (Mc Guire y Roseman, 1967), (enzima que inicia la O-glicosilación transfiriendo un residuo N-acetilgalactosamina a partir de UDP-GalNac a serina o treonina en el polipéptido), ha sido purificada y caracterizada con algún detalle (Sugiura et al., 1982; Elhamer y Kornfeld, 1986), pero su localización subcelular aún no ha sido determinada sin ambigüedad.

La primera parte de este trabajo trata sobre la determinación del sitio subcelular de iniciación de la O-glicosilación tipo mucina.

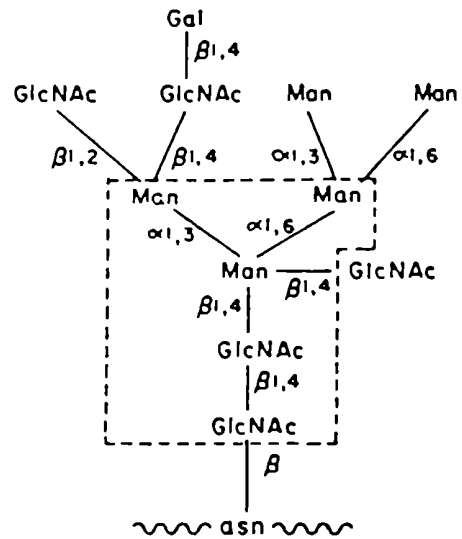
FIGURA I

ESTRUCTURAS TÍPICAS DE OLIGOSACARIDOS CON ENLACE N-GLICOSIDICO



a
RICO EN MANOSA

b
COMPLEJO



c
HIBRIDO

FIGURA I

ESTRUCTURAS TÍPICAS DE OLIGOSACARIDOS CON ENLACE N-GLICOSIDICO.

Todas las estructuras comparten la zona central, $\text{Man}_3 \text{GlcNAC}_2$, indicada por las líneas punteadas. (a) tipo rico en manosa, de tiroglobulina bovina (Ito et al., 1977); (b) tipo complejo, de la glicoproteína G del virus de stomatitis vesicular (Reading et al., 1978); (c) tipo híbrido, de ovoalbúmina (Yamashita et al., 1978). Tomado del libro "Biology of Carbohydrates", Vol 2- Editado por V. Ginsburg y P. W. Robbins.

FIGURA II

ESTRUCTURAS TÍPICAS DE OLIGOSACARIDOS CON ENLACE O-GLICOSIDICO DEL TIPO MUCINA

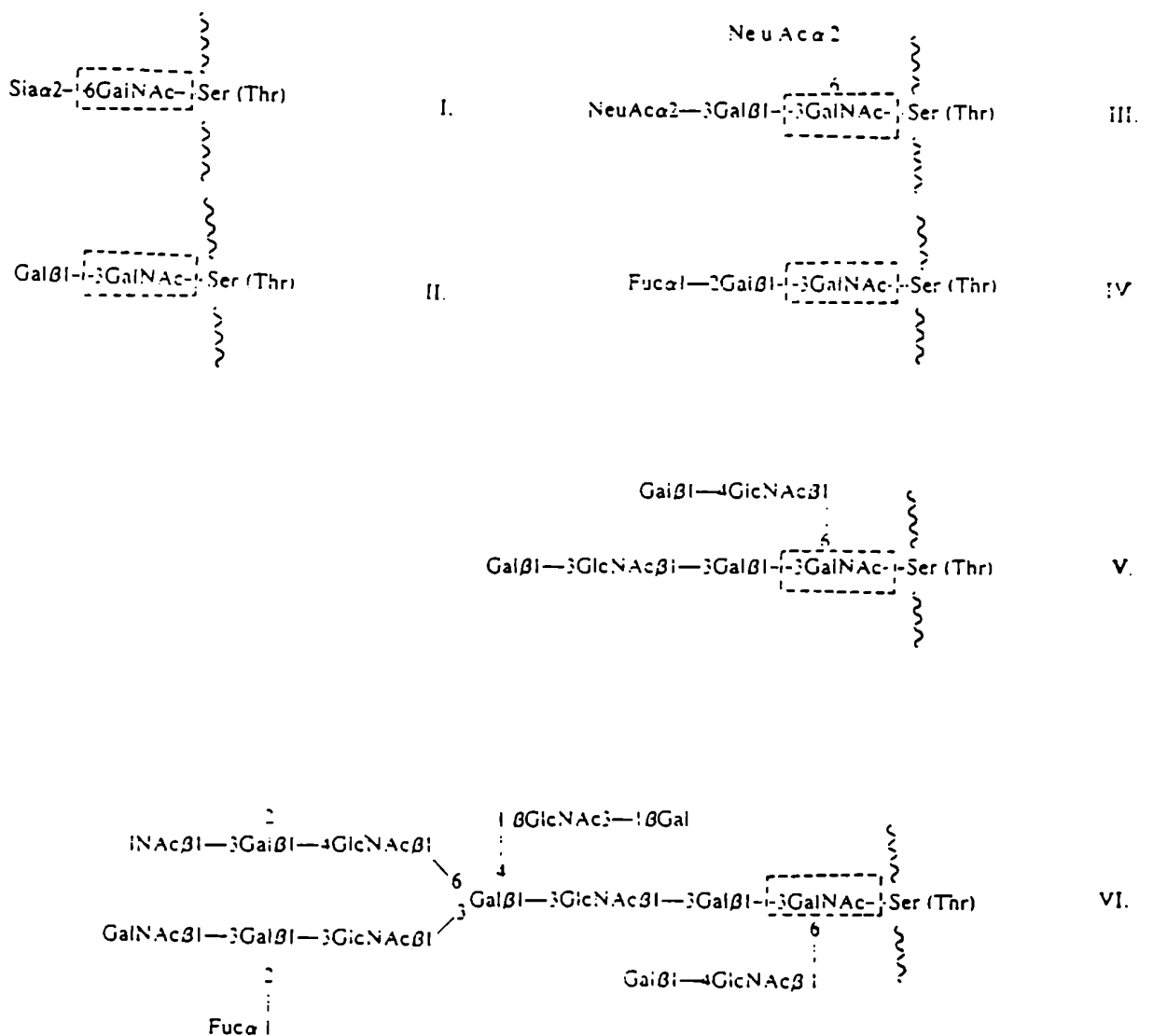


FIGURA II

ESTRUCTURAS TIPICAS DE OLIGOSACARIDOS CON ENLACE O-GLICOSIDICO TIPO MUCINA.

El único rasgo común a todas ellas es la GalNac unida a serina/treonina en el polipéptido. Estas estructuras han sido publicadas por:

I: Bahl, 1969.

II: Baenzinger y Kornfeld, 1974.

III: Finne, 1975.

IV: Takasaki et al., 1978.

V: Oates et al., 1974.

VI: Lloyd y Kabat, 1968.

Tomado del libro "Biology of Carbohydrates",
Vol 2- Editado por V. Ginsburg y P. W. Robbins.

1.5. TOPOGRAFIA DE LAS REACCIONES DE GLICOSILACION.

Estudios bioquímicos y de biología celular han localizado las reacciones de glicosilación en el lumen del RE y aparato de Golgi (Snider y Robbins, 1982; Carey y Hirschberg, 1981; Fleischer, 1981).

Los nucleótidos azúcar precursores de las reacciones de síntesis de oligosacáridos, se forman en un sitio distante al de su utilización. UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc y GDP-fucosa, son sintetizados en el citosol (Ishihara y Heath, 1968; Coates et al., 1980; Turnquist et al., 1974; Davidson, 1966). El CMP-AcNeu es, aparentemente, sintetizado en el núcleo celular (Kean, 1970; Coates et al., 1980).

Esto plantea un problema topológico en el interior de la célula, y la necesidad de un mecanismo por el cual los sustratos cargados de las reacciones de glicosilación, accedan al lumen de las organelas donde ellas ocurren.

Existe evidencia indicando que el ensamblaje del oligosacárido unido a dolicol, primera etapa de la N-glicosilación, ocurre asimétricamente con respecto a la membrana del RER (Hanover y Lenarz, 1978, 1982; Snider y Rogers, 1984). La transferencia del oligosacárido al

polipéptido nasiente, ocurre en el lumen del RER (Welply et al., 1983).

Las siguientes reacciones de remoción y adición de azúcares son también lumbinales, en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Hirschberg y Snider, 1987).

Kuhn y White, estudiando la síntesis de lactosa en el aparato de Golgi de glandula mamaria, fueron los primeros en proponer que las membranas del aparato de Golgi, podían permitir la entrada selectiva de moléculas específicas (Kuhn y White, 1976).

En los últimos años se ha demostrado que UDP-Gal, CMP-AcNeu, GDP-fucosa y PAPS, son transportados específicamente al interior de vesículas derivadas del aparato de Golgi (Sommers y Hirschberg, 1982; Perez y Hirschberg, 1985; Schwarz et al., 1984). En cambio UDP-GlcNAc, UDP-xilosa y UDP-ácido glucurónico, pueden acceder al lumen del aparato de Golgi y también del RE (Perez y Hirschberg, 1985; Nuwayhid et al., 1986).

Con respecto al UDP-GalNAc, nucleótido azúcar sustrato de la primera reacción implicada en la síntesis de enlaces O-glicosídicos tipo mucina, no existe información de este tipo.

Previamente mencionamos la reciente descripción de un nuevo tipo de unión O-glicosídica: O-GlcNAc, un solo residuo, directamente unido a serina y/o treonina en el polipéptido.

Proteínas con este enlace se han encontrado en varias organelas (Holt y Hart, 1986), pero son especialmente abundantes en la membrana nuclear, en la estructura del poro nuclear y en el citoplasma (Schindler et al., 1987). Existe evidencia preliminar sugiriendo que el azúcar en estas proteínas, está orientado hacia el lado citoplasmático de la membrana nuclear (Davis y Blobel, 1986; Holt et al., 1987).

Esto constituye una novedad, pues todos los carbohidratos de glicoconjugados bien estudiados hasta el presente, están localizados ya sea en la superficie celular o en el lumen de las organelas intracelulares, lisosomas, Golgi, retículo endoplásmico (Nicholson y Singer, 1974; Rothman y Lenard, 1977; Rodríguez Boulan et al., 1978).

Existen algunos estudios anteriores indicando la posible presencia de glicoconjugados en el citoplasma (Meyer y Burger, 1976; Nagakura et al., 1986), y en la cara citoplasmática de la membrana nuclear (Furokawa y Terayama, 1979), pero ninguno de estos estudios investiga si se trata de glicoproteínas o glicolípidos, ni el tipo de unión glicosídica. Además no puede descartarse que se trate de contaminación cruzada, proveniente de otros compartimientos subcelulares durante el fraccionamiento subcelular.

Los estudios recientes demuestran inequívocamente la presencia de N-acetilglucosamina usando dos aproximaciones técnicas diferentes: glicosiltransferasas altamente purificadas (Holt y Hart, 1986), y

anticuerpos monoclonales, parte de cuyo epítoto de reconocimiento es la O-GlcNAC (Holt et al., 1987; Snow et al., 1987).

Las glicosiltransferasas son extremadamente específicas con respecto a sus sustratos aceptores y al nucleótido azúcar que actúa como donante. Trabajos recientes muestran que se pueden utilizar estas enzimas (ahora disponibles purificadas y en gran cantidad), como sondas para detectar la presencia de sus sustratos en la superficie de células enteras o de organelas (Beyer et al., 1981).

La galactosiltransferasa transfiere unidades de galactosa, a partir de UDP-Gal a todos los residuos de GlcNAC expuestos, con elevada especificidad y eficiencia. Además, como la galactosiltransferasa es una proteína de elevado peso molecular, incapaz de atravesar membranas biológicas (Magee et al., 1974), puede utilizarse para determinar topografía. Mediante su empleo, se descubrió la existencia de O-GlcNAC (Torres y Hart, 1984). Luego, utilizando anticuerpos monoclonales contra un grupo de proteínas nucleares que comparten un epítoto, parte del cual es O-GlcNAC, (Snow et al., 1987), muestran por inmunoelectromicroscopía de membranas nucleares, que este epítoto está orientado hacia el citoplasma. Estas proteínas son extrínsecas y no integrales de membrana.

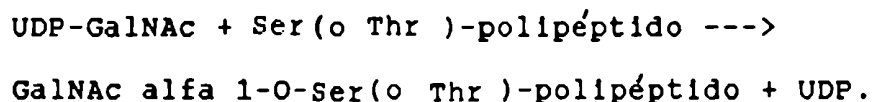
La demostración de la presencia de azúcares en el citoplasma y orientados citoplasmáticamente en proteínas extrínsecas de membrana, plantea interrogantes respecto a la biosíntesis de este enlace y su topografía en el resto de los organoides celulares.

Como parte de nuestro interés en entender la topografía de las moléculas glicosiladas en el retículo endoplásmico, nosotros examinamos la localización de proteínas conteniendo N-acetilglucosamina terminal en esta organela.

1.6. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Los interrogantes que se propone resolver el proyecto de investigación cuyos resultados se exponen en esta tesis, son los siguientes:

a) ¿Cuál es la distribución subcelular de la UDP-GalNac: polipéptido (alfa 1-O) N-acetilgalactosamil transferasa? Esta enzima es responsable de la iniciación de la síntesis de todas las cadenas hidrocarbonadas O-glicosídicas del tipo mucina, formando el enlace GalNac alfa 1-O-Ser/Thr en el esqueleto polipeptídico por la reacción:



b) ¿Puede el sustrato cargado de esta reacción, el nucleótido azúcar UDP-GalNac, atravesar la membrana de las organelas intracelulares (retículo endoplásmico y aparato de Golgi), y acceder al lumen de las mismas, donde se encuentran los polipéptidos que serán glicosilados?

c) De ser así: ¿Cuál es el mecanismo responsable de esta translocación? ¿Es la molécula intacta la que accede al lumen de las organelas, o solamente el residuo glicosídico?

d) ¿Cuál es la distribución subcelular de los aceptores endógenos para N-acetilgalactosamina?

Respondiendo satisfactoriamente a estos interrogantes se desea alcanzar el objetivo de dilucidar cual es el sitio subcelular donde se inicia la O-glicosilación tipo mucina, la mas frecuente en las glicoproteínas.

e) ¿Cuál es la distribución topográfica de los residuos de N-acetilglucosamina terminales en las proteínas del retículo endoplásmico?

f) ¿A qué clase de proteínas se encuentra unido este azúcar, a proteínas contenidas en el lumen de la organela, o a proteínas de membrana? De tratarse de proteínas de membrana: ¿Són éstas integrales o periféricas?

g) ¿Tienen estas glicoproteínas especificidad de organela, o se encuentran también presentes en otros compartimientos subcelulares?

h) ¿Qué tipo de unión glicosídica existe entre la N-acetilglucosamina terminal y las proteínas del retículo endoplásmico?

La respuesta a estos interrogantes permitirá saber si la O-GlcNAc, unión glicosídica recientemente descrita, se encuadra dentro del dogma previamente establecido para las glicoproteínas: "Los azúcares covalentemente unidos a proteínas se encuentran orientados

luminalmente en las organelas intracelulares y extracelularmente en la membrana plasmática"; o representan una excepción a la regla, abriendo así nuevos interrogantes sobre la biogénesis de membranas.

Parte de los resultados que se exponen a continuación, han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

"Annual Meeting of The American Society of Biological Chemists", (Washington DC, 1986),

"Gordon Research Conference on Glycoproteins and Glycolipids", (Santa Barbara, CA, 1987),

"Annual Meetings of The American Society for Cell Biology", (Saint Louis, MO, 1987),

y/o fueron publicados (Abeijón y Hirschberg, 1987 a, 1987 b).

CAPITULO 2

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA UDP-GalNac: POLIPEPTIDO (ALFA 1-0) N-ACETILGALACTOSAMINIL TRANSFERASA

2.1. MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron los siguientes compuestos radioactivos: UDP-[1-³H] GalNac (8,7 Ci/mmol), [1-¹⁴C] GalNac (50 mCi/mmol), [1-³H] GlcNac (9 Ci/mmol), de la compañía Du Pont-NEN.

2.1.a.-OBTENCION DE VESICULAS DERIVADAS DEL APARATO DE GOLGI, RER Y REL DE HIGADO DE RATA.

Todas las fracciones fueron obtenidas de ratas macho, Sprague-Dawley de 180-200 g. Los animales fueron privados de comida durante 18-20 h antes de ser decapitados con guillotina. Previamente a su extracción, los hígados fueron perfundidos con sacarosa 0,25 M. Se usaron enzimas marcadoras para determinar la pureza de todas las fracciones. El enriquecimiento en actividad específica de estas enzimas marcadoras, siempre se calculó sobre la actividad detectada en el homogenato total. La

recuperación para la actividad de cada enzima marcadora en las distintas fracciones, se calculó como porcentaje de la actividad total presente en el homogenato.

Cuando fue necesario obtener a partir de la misma muestra, fracciones de Golgi, RER y REL, se utilizó el método de Fleischer y Kervina (1974), tal como fue modificado por Carey y Hirschberg (1980).

Brevemente, en una preparación típica, dos hígados de rata adulta joven fueron homogenizados con cuatro volúmenes de sacarosa 0,25 M en agua y luego la suspensión fue filtrada a través de tres capas de gasa.

Seguidamente, se obtuvo un sobrenadante post-mitocondrial, centrifugando a 15.000 G X 10 min. Este sobrenadante fue combinado con un volumen y medio de sacarosa 2,25 M en agua y fue cargado (15 ml por tubo) en seis tubos del rotor S.W.-28 (Beckman). A continuación, la muestra fue cubierta por 15 ml por tubo de sacarosa 1,32 M y finalmente, 10 ml por tubo de sacarosa 0,25 M. Luego se centrifugó una hora a 27.000 rpm.

El material recuperado de la interfase entre sacarosa 1,32 y 0,25 M, son vesículas del aparato de Golgi. Estas fueron diluidas y precipitadas por centrifugación a 35.000 rpm, por 45 min, en un rotor Ti-35 (Beckman). El precipitado se resuspendió en STM (sacarosa 0,25 M; 1 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl pH 7,5) y la fracción fue usada fresca, sin congelar para las determinaciones enzimáticas y ensayos de translocación.

El material de la interfase entre la muestra y sacarosa 1,32 M, conjuntamente con lo que se encontró debajo de esta interfase y hasta el fondo del tubo, fue diluido con medio volumen de agua, llevado a 15 mM CsCl y cargado en tubos del rotor T135 (Beckman) sobre un colchón de sacarosa 1,3 M; 15 mM CsCl.

Después de centrifugar por 90 min a 35.000 rpm, se obtuvo un precipitado compuesto por vesículas del RER y una interfase correspondiente a vesículas del REL. La interfase fue diluida y precipitada del mismo modo que se describió para el Golgi. Luego ambos precipitados fueron resuspendidos en STM, a una concentración entre 5 y 10 mg de proteína por ml.

2.1.b. MARCADORES ENZIMATICOS.

Todas las fracciones fueron utilizadas inmediatamente después de aisladas para los ensayos enzimáticos.

La fracción del RER se encontró 4,8 veces enriquecida en actividad específica de glucosa-6-fosfatasa (Aaronson y Touster, 1974). Esta es la enzima marcadora de ambos tipos de retículo endoplasmico, y su recuperación fue del 12%. Respecto a los contaminantes de la fracción, se encontró un enriquecimiento de 0,4 veces en sialiltransferasa, enzima marcadora de Golgi, con una recuperación del 2% (Carey y Hirschberg, 1981).

El enriquecimiento en 5'-nucleotidasa, marcadora de la membrana plasmática fue de 1,8 veces con una recuperación del 4,2% (Aaronson y Touster, 1974). Respecto a la fosfatasa ácida, marcadora de lisosomas, el enriquecimiento fue de 0,3 veces, con una recuperación del 6% (Trouet, 1974).

Las vesículas derivadas del retículo endoplásmico liso, se encontraron enriquecidas 3,7 veces en actividad específica de glucosa-6-fosfatasa, con una recuperación del 11%; 2,1 veces en actividad específica de sialiltransferasa (recuperación 1,6%), 1,9 veces en actividad específica de 5'-nucleotidasa (recuperación 3%) y 0,6 veces en actividad específica de fosfatasa ácida con una recuperación del 10,6%.

La fracción de Golgi se encontró 38 veces enriquecida en actividad específica de sialiltransferasa con respecto al homogenato, con una recuperación del 14%, 4,9 veces enriquecida en actividad específica de 5'-nucleotidasa con 1,9% de recuperación y 1,3 veces enriquecida en actividad específica de glucosa-6-fosfatasa, con una recuperación del 1,5%.

La integridad de las vesículas determinada por la latencia hacia tratamiento con neuraminidasa que presentaron las vesículas premarcadas con CMP- [14C] Ac Neu fue del 96% (Carey y Hirschberg, 1981). Las proteínas fueron determinadas (en presencia de 1% SDS), por el método de Peterson (1977), que es una modificación del método de

Lowry, útil para medir muestras membranosas. Se utilizó albúmina bovina como estandar.

2.1.c. PREPARACION DEL ACEPTOR EXOGENO: APOMUCINA.

El aceptor exógeno apomucina (mucina deglicosilada) fue preparado químicamente, por degradación de Smith, a partir de mucina submaxilar bovina, obtenida de la compañía química Sigma, siguiendo el procedimiento publicado por Agopian y Eylar, (1968).

La modificación de los dioles vecinales por oxidación con periodato ha sido establecida con anterioridad como técnica para el estudio estructural de los carbohidratos. Si es seguida por reducción e hidrólisis ácida suave, (degradación de Smith), puede ser utilizada para eliminar secuencialmente unidades de monosacaridos unidos a proteínas, sin alterar la proteína. (fig. III).

En una preparación típica, 280 mg de mucina submaxilar bovina, en 12,5 ml de agua, fueron mezclados con 12,5 ml de acetato de sodio 0,1 M pH 4,6. Luego se adhirieron 100 ml de NaIO_4 0,1 M y la solución se dejó a 4 grados C, en la oscuridad durante 20 h. La reacción se detuvo por agregado de 10 ml de glicerol 1 M. Luego de 10 min el pH se ajustó a 9 y se agregaron 40 ml de NaBH_4 1 M. Transcurrida una hora la solución fue ajustada a pH 7 con ácido acético y dializada contra agua por 20 h.

El material liofilizado contuvo 125 mg de proteína, lo que representa una recuperación del 95%. Este material, oxidado con periodato y luego reducido con borohidruro de sodio, fue sometido a hidrólisis acida en 0,1N H_2SO_4 ; a 100 grados C, durante 2 h. Luego de la hidrólisis la solución fue neutralizada con NaOH 1N, delonizada en resina MB-3 Amberlite y liofilizada. La recuperación total fue del 86%.

2.1.d. ENSAYO PARA LA UDP-GalNac: POLIPEPTIDO N-ACETIL GALACTOSAMINILTRANSFERASA.

La enzima fue ensayada por el método de Sugiura et al. (1982), con pocas modificaciones. La mezcla de incubación contenía los siguientes componentes en un volumen final de 82 μ l: 41 μ moles de buffer imidazol-HCl pH 7,2; 0,82 μ moles de $MnCl_2$; 0,4 nmoles de UDP-GalNac tritiada (1 millon dpm/nmol); 0,16 mg de apomucina; 0,4 mg de tritón X-100 y cantidades variables de proteína enzimática. Siempre se realizaron incubaciones control sin aceptor exógeno, para corregir por la actividad aceptora endógena de cada fracción. En la mezcla de reacción también se agregó ATP 2mM para proteger el sustrato radioactivo de la acción de las fosfatasas y NADH 1 mM para inhibir la epimerización de UDP-GalNac a UDP-GlcNac (Maxwell, 1957).

La reacción fue llevada a cabo a 37 grados C,

durante 10 min y terminada por adición de 0,5 ml de ácido fosfotúngstico al 1% en ácido tricloroacético al 10%. Las muestras fueron mantenidas 20 min en hielo y luego la proteína fue colectada por centrifugación y lavada tres veces con la misma solución. Luego el precipitado fue disuelto en 1 ml de 1 N NaOH, cargado en viales y mezclado con 18 ml de cóctel de centelleo líquido (Aguasol-2, Du Pont-NEN). La radioactividad se cuantificó con un contador de centelleo líquido Tracor Analytic y la corrección del quenching se efectuó por el método del estandar interno.

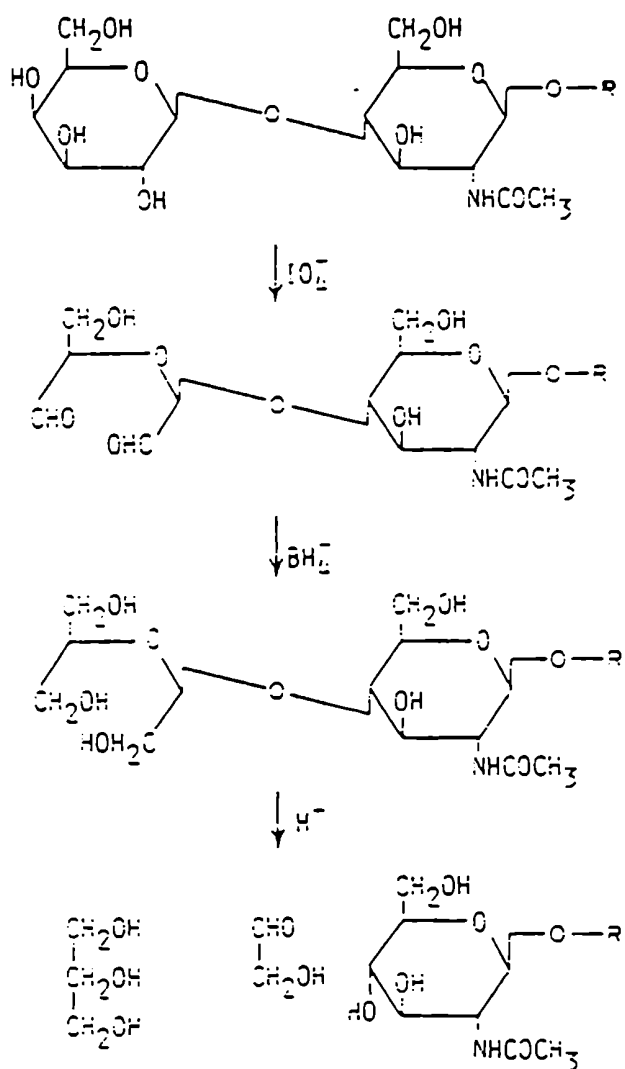
Bajo las condiciones empleadas, la reacción enzimática fue lineal con el tiempo hasta 20 minutos y con la cantidad de proteínas en un rango que se especificará para cada fracción.

2.1.e. SEPARACION DE ACETILHEXOSAMINAS.

GalNac y GlcNac se separaron por cromatografía descendente en papel Whatman 3 MM impregnado en borato. El sistema de solventes fue butanol: piridina: agua (6:4:3) (Cardini y Leloir, 1957).

FIGURA III

DEGRADACION DE SMITH DE UN OLIGOSACARIDO



SE MUESTRA EL PRIMER CICLO DE DEGRADACION DE UN OLIGOSACARIDO CONTENIENDO Gal (beta 1-4)-GlcNAc EN SU EXTREMO NO REDUCTOR

CAPITULO 2

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA UDP-GalNac, POLIPEPTIDO (ALFA 1-O) N-ACETILGALACTOSAMINIL TRANSFERASA.

2.2. RESULTADOS.

2.2.a. ESTABILIDAD DEL SUSTRATO UDP-GalNac DURANTE LA REACCION.

Existe una UDP-GlcNac-4-epimerasa que convierte UDP-GlcNac a UDP-GalNac y viceversa, esta fue aislada primeramente de *Bacillus subtilis* (Glaser, 1959). Esta actividad fue también observada en extractos de hígado bovino y de rata (Maley y Maley, 1959). La epimerasa aparenta ser una enzima soluble, no presente en la fracción particulada. Requiere NAD⁺ para su actividad catalítica, y es inhibida por NADH. Por esta razón incluimos NADH 1 mM, en la mezcla de reacción para medir la actividad de la polipeptido: GalNac transferasa. A esta concentración, se ha reportado inhibición total de la epimerasa (Maxwell, 1957).

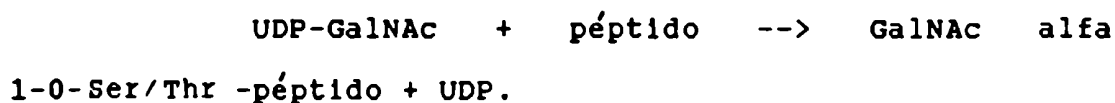
No obstante, para la correcta interpretación

de nuestros resultados, era fundamental determinar si durante las incubaciones ocurría epimerización de GalNac a GlcNac. Para ello, se incubó proteína de homogenato total con UDP-GalNac tritiada en las condiciones del ensayo enzimático y a distintos tiempos (hasta 20 min), se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción. Estas alícuotas fueron hidrolizadas en 0,1N HCl, durante una hora a 37 grados C, y luego analizadas para la presencia de acetilhexosaminas, tal como se describe en la sección 2.1.e.

El único azúcar radioactivo detectado fue GalNac, aún en los tiempos mas largos. Este análisis se repitió con las fracciones de RER, REL y Golgi, con igual resultado. Se concluyó que en las condiciones en que efectuabamos el ensayo enzimático, la epimerización de UDP-GalNac a UDP-GlcNac estaba completamente inhibida.

2.2.b. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA UDP-GAL NAC: POLIPEPTIDO (ALFA 1-0) N-ACETILGALACTOSA- MINILTRANSFERASA.

El enlace entre carbohidrato y proteína, Gal Nac alfa 1-0-Ser/Thr es catalizado por la polipeptido: N-acetilgalactosaminil transferasa de acuerdo a la siguiente reacción:



Nosotros estábamos interesados en determinar en que fracción del hígado de rata se podía encontrar actividad de esta enzima. Como existen estudios previos que sugerían que esta enzima estaba localizada en el RER, REL y/o Golgi, decidimos obtener a partir del mismo tejido, fracciones altamente enriquecidas en membranas de estas organelas, y con mínima contaminación cruzada. Las fracciones de RER, REL y aparato de Golgi fueron luego ensayadas para detectar la presencia de la transferasa, utilizando apomucina como aceptor exógeno. Elhammer y Kornfeld (1984), comprobaron que la apomucina es un aceptor exógeno muy específico para la GalNac transferasa que inicia la cadena O-glicosídica.

Como puede verse en la tabla I, la actividad específica de la apomucina: GalNac-transferasa se encontró en la fracción de Golgi, 37 veces enriquecida por sobre aquella en el homogenato. La fracción del REL estuvo menos de dos veces enriquecida sobre el homogenato mientras que la actividad específica del RER fue mas baja que la del homogenato.

La siguiente pregunta que quisimos responder fue si la baja actividad de la apomucina: GalNac transferasa detectada en las fracciones del retículo endoplásmico, podría ser el resultado de contaminación con pequeñas cantidades de membranas de Golgi presentes en estas fracciones. Para contestar esta pregunta, la actividad de sialiltransferasa, enzima marcadora típica y

exclusiva del aparato de Golgi, fue medida en todas las fracciones utilizando asialofetaina como aceptor exógeno. Como puede verse en la tabla I, en las fracciones derivadas del retículo endoplásmico, se encontró alguna actividad de sialiltransferasa. Conocido este valor, y la actividad específica de la sialiltransferasa en el Golgi, se pudo calcular la cantidad de proteína proveniente del Golgi, presente en las fracciones del retículo endoplásmico.

Se encontró así que toda la actividad de apomucina: GalNac transferasa detectada en las fracciones del retículo endoplásmico podía atribuirse a la pequeña contaminación de estas fracciones con membranas del aparato de Golgi.

En experimentos en los que se ensayaron mezclas de fracciones del aparato de Golgi y retículo endoplásmico, para actividad de la apomucina: GalNac transferasa, los valores obtenidos fueron aditivos (tabla II). Esta aditividad encontrada al mezclar fracciones descarta la posibilidad de que la baja actividad enzimática detectada en el retículo endoplásmico, se deba a la presencia de inhibidores solubles en estas fracciones. Cuando se realizó este tipo de experimentos de mezcla para la sialiltransferasa, se encontraron iguales resultados.

El porcentaje de la actividad total de apomucina: GalNac transferasa recuperada en la fracción de Golgi fue de 10,7%, muy similar a la recuperación de 11,1% encontrada para la sialiltransferasa. Este comportamiento

de la sialiltransferasa, unido a estudios de inmunoelectromicroscopía (Roth et al., 1985), mostrando que la sialiltransferasa se localiza exclusivamente en el aparato de Golgi, permitieron que esta actividad enzimática sea usada como marcadora del aparato de Golgi.

Por los resultados mostrados en las tablas I y II, y lo anteriormente expuesto, podemos tentativamente concluir que, en el hígado de rata, la polipéptido: GalNac transferasa esta localizada exclusivamente en el aparato de Golgi. Aunque solo cuando se disponga de un anticuerpo contra la enzima purificada y se la pueda localizar por inmunoelectromicroscopía, se podrá tener una respuesta definitiva.

2.2.c. TOPOGRAFIA DE LA UDP-GalNac:POLIPEPTIDO N-ACETILGALACTOSAMINILTRANSFERASA.

Existe abundante evidencia apoyando la localización luminal de las glicosiltransferasas en el Golgi. Es sabido que las proteínas secretorias y glicoproteínas de membrana que son sustrato para las reacciones de glicosilación estan orientadas hacia el lumen (Hanover y Lennarz, 1980; Rodriguez Boulan et al., 1978). Las glicosiltransferasas son resistentes a tratamiento con proteasa en vesículas cerradas, pero sensibles a degradación cuando se rompe la integridad de la membrana (Fleischer, 1981; Carey y Hirschberg, 1981).

Además, las glicosiltransferasas del Golgi se muestran inactivas cuando son ensayadas in-vitro, en vesículas cerradas, con aceptores macromoleculares exógenos, que no pueden penetrar la membrana. Luego de que las vesículas son permeabilizadas puede detectarse transferencia a estos aceptores.

En nuestro caso, la apomucina es un aceptor macromolecular que no atraviesa la membrana, pero todos los ensayos descritos hasta ahora (tablas I y II) fueron realizados con vesículas permeabilizadas, pues en la mezcla de reacción se incluyó tritón X-100, tal como se describe en la sección 2.1.d.

Consideramos importante determinar la topografía de la polipéptido: GalNAC transferasa con respecto a la membrana del aparato de Golgi. Para ello se investigó el efecto del tritón X-100, sobre la accesibilidad, para la transferasa, del sustrato macromolecular (apomucina). Los resultados se presentan en la tabla III. Allí se nota que en ausencia de tritón X-100, es decir, cuando las vesículas están cerradas, la incorporación que se detecta se debe exclusivamente a los aceptores endógenos, pues la adición de apomucina no altera en absoluto este valor.

Al permeabilizar las vesículas con tritón X-100, la transferencia a la apomucina aumenta 8,3 veces, indicando claramente la orientación luminal del centro catalítico de la polipéptido: GalNAC transferasa del aparato

de Golgi. Más adelante (Sección 4.2.d), se tratará el efecto de la permeabilización de las vesículas sobre la incorporación de GalNac a aceptores endógenos.

2.2.d. RESUMEN.

En conclusión, los resultados expuestos en las tablas I, II y III, sugieren fuertemente que en el hígado de rata la enzima responsable de la iniciación de la O-glicosilación (tipo mucina), la polipéptido: GalNac transferasa, se encuentra localizada exclusivamente en el aparato de Golgi, con su centro catalítico orientado hacia el lumen de la organela.

TABLA I

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE POLIPEPTIDO: N-ACETILGALACTOSAMINIL TRANSFERASA Y SIALILTRANSFERASA, EN DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DE HIGADO DE RATA.

Frac- ciones	GalNac- transferasa (a)			Sialil- transferasa (b)		
	n.c.	c.	Recup.	n.c.	Recup.	
	nmol/mg prot/h			%	nmol/mg prot/h	
HTO.	0,36	0,36	100		2,95	100
GOLGI	13,40	13,40	10,7		123,90	11,1
REL	0,53	0	0		5,01	1,2
RER	0,12	0	0		1,15	1,9

a: Aceptor, apomucina.

b: Aceptor, asialofetuina.

n.c.: No corregido por contaminacion con Golgi.

c.: Corregido por contaminacion con Golgi.

HTO.: Homogenato celular total.

TABLA I

Los ensayos enzimáticos fueron realizados como se describe en la sección 2.1.d. La cantidad de proteína por ensayo estuvo en el rango lineal: HTO, REL y RER; 0,05-0,60 mg; Golgi; 0,05-0,08 mg. La contaminación con Golgi en las fracciones de REL y RER se corrigió basándose en las unidades de actividad de la sialiltransferasa. La transferencia a aceptores endógenos, menos del 15% del total, se sustrajo en ambos ensayos a la transferencia a aceptores exógenos. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA II

ADITIVIDAD DE LA ACTIVIDAD DE LA POLIPEPTIDO: N-ACETIL GALACTOSAMINILTRANSFERASA EN FRACCIONES DE RETICULO ENDOPLASMICO Y APARATO DE GOLGI DE HIGADO DE RATA.

Fracción	Prot (mg)	pmol/h	
		hallados	esperados *
GOLGI	(0,05)	665	
REL	(0,50)	270	
RER	(0,50)	55	
GOLGI + REL	(0,05 + 0,50)	916	935
GOLGI + RER	(0,05 + 0,50)	755	720

* En caso que los valores hallados fueran aditivos.

El ensayo enzimático con apomucina como aceptor exógeno fue llevado a cabo tal como se describe en la sección 2.1.d. Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes.

TABLA III

EFECTO DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA EN LA ACCESIBILIDAD DEL SUSTRATO MACROMOLECULAR EXOGENO, APOMUCINA, PARA LA POLIPEPTIDO: GalNac TRANSFERASA EN VESICULAS DEL APARATO DE GOLGI DE HIGADO DE RATA.

Apomucina	Tritón X-100	pmol/mg prot/h
-	-	1,780
	+	1,850
+		1,800
+	+	14,900

El ensayo enzimático fue llevado a cabo tal como se describe en la sección 2.1.d., eliminando de la mezcla de reacción, el tritón X-100 y/o la apomucina de la manera indicada. Los resultados son promedio de tres determinaciones independientes.

CAPITULO 3

TRANSPORTE DE UDP-GalNac A TRAVES DE MEMBRANAS DEL APARATO DE GOLGI.

3.1. MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron los siguientes compuestos radioactivos: UDP-[1-³H] GalNac (8,7 Ci/mmol); UDP-[1-¹⁴C] GalNac (47,2 mCi/mmol); 2 deoxi D-[G-³H] glucosa (8,3 Ci/mmol); [metoxi-³H]; inulina (298,3 mCi/g); obtenidos de la compañía Du Pont-NEN y [5,6-³H] UTP (30 Ci/mmol) obtenido de la compañía ICN.

3.1.a. OBTENCION DE VESICULAS DERIVADAS DEL APARATO DE GOLGI DE HIGADO DE RATA.

Cuando, a partir de homogenato, se deseó fraccionar exclusivamente Golgi, se utilizó la técnica descrita por Leelavathi et al. (1970), que permite obtener mayor pureza en esta fracción que el metodo combinado descrito en la sección 2.1.a.

En una preparación típica, tres hígados de rata fueron homogenizados en sacarosa 0,25 M; fosfato de potasio 0,1 M pH 6,65; MgCl₂ 5 mM y se obtuvo un sobrenadante post-nuclear mediante centrifugación a 1000 G

por 10 min a 4 grados C. El resto de las operaciones se llevó a cabo a esa temperatura. Este sobrenadante fue cargado en 6 tubos del rotor SW-28 (Beckman), sobre un colchón de sacarosa 1,3 M en el mismo buffer (12 ml) y centrifugado durante una hora a 27.000 rpm. El material depositado en la interfase de sacarosa 1,3/0,25 M fue recuperado y su densidad ajustada a sacarosa 1,1 M con sacarosa 2,6 M, utilizando un refractómetro. Esta solución fue cargada en dos tubos del rotor SW-28 (Beckman), encima de sacarosa 1,3 M y cubierta por sacarosa 0,25 M, y centrifugada a 27.000 rpm, por 1 h. La capa formada en la interfase de sacarosa 1,1/0,25 M fue recuperada, diluida 20 veces con STM y las vesículas precipitadas por centrifugación a 35.000 rpm, por 45 min en un rotor T-35 (Beckman). El precipitado se resuspendió en 10 ml de STM y esta fracción de Golgi se utilizó inmediatamente para los ensayos de transporte. Las determinaciones de proteínas y de enzimas marcadoras fueron descriptas en el capítulo II.

Normalmente esta preparación estuvo enriquecida 65 veces en actividad específica de sialiltransferasa con una recuperación del 25%. La integridad de las vesículas fue del 98%.

3.1.b. SINTESIS DE [³H] UDP-GalNac.

La UDP-GalNac con la marca radioactiva en la

uridina fue sintetizada usando una modificación del procedimiento descrito por Rao y Mendicino (1978).

El material de partida fue 1 mCi de [5,6-³H] UTP (40,3 Ci/mMol), a partir del que se obtuvo [³H] UDP-glucosa (1,5 x 10⁹ dpm), según describieron Perez y Hirschberg (1986). Esta [³H] UDP-glucosa fue incubada durante 10 h a 37 grados C, con galactosamina 1-fosfato (Sigma) y galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (Boehringer), en un volumen total de 0,14 ml. En estas condiciones se produjo la transferencia del grupo uridilo radioactivo, sintetizándose [³H] UDP-galactosamina. Luego se agregaron 1,86 ml de agua y la mezcla fue deproteinizada por pasaje a través de un filtro centricon 10.000 (Amicon), centrifugando 1 h a 5.000 G. Seguidamente, la solución fue aplicada a una columna (1 x 5 cm) de dowex 1- formato que se eluyó tal como describió Maley (1972), para purificar la [³H] UDP-galactosamina. La N-acetilación de la [³H] UDP-galactosamina (9 x 10⁸ dpm; 0,49 Ci/mmol), se realizó de acuerdo a Rao y Mendicino (1978).

La [³H] UDP-GalNAC sintetizada como se ha descrito, dió un único pico simétrico que comigró con UDP-[¹⁴C]GalNAC estandar en los siguientes sistemas cromatográficos: a) papel Whatman 3 MM con etanol: acetato de amonio 1 M pH 7,5 (3:2); b) capa fina de intercambio iónico (Brinkman Poligram, CEL 300 PEI) con LiCl 0,7 M;

c) cromatografía líquida de alta presión con una columna de intercambio iónico, Sincropak AX-100 (Synchrom, Inc.) eluida con acetato de trietilamina 30 mM pH 7.

Luego de digerir el nucleótido azúcar marcado con pirofosfatasa nucleótido, de Crotalus adamanteus (Sigma), toda la radioactividad comigró con UMP estandar en una columna Dowex 2-formato.

3.1.c. PREPARACION DE [^{14}C] GalNAC 1-FOSFATO.

[^{14}C]GalNac 1-fosfato fue preparada por ruptura enzimática de UDP-[^{14}C]GalNac con pirofosfatasa nucleótido de Crotalus adamanteus (Sigma). El producto fue purificado por cromatografía líquida de alta presión, utilizando una columna de intercambio iónico Sincropak AX-100 (Synchrom, Inc.), eluida con acetato de trietilamina 20 mM pH 7, a un flujo de 2 ml/min y a 2000 psi. El tiempo de retención fueron 6 min.

3.1.d. ENSAYO DE TRANSLOCACION.

La translocación de UDP-GalNac fue medida como se ha descrito previamente para otros nucleótidos azúcar (Perez y Hirschberg, 1986) y se esquematiza en la fig. IV.

Brevemente, los solutos cuya translocación se

deseaba medir, fueron disueltos en buffer STKM (sacarosa 0,25 M; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; KCl 150 mM; MgCl₂ 1 mM; NADH 1 mM) conteniendo 2,3 dimercaptopropanol 0,5 mM, como inhibidor de las pirofosfatasas. La actividad específica fue ajustada para tener 200-500.000 cpm/0,8 ml. Se transfirieron alícuotas de 0,8 ml a tubos del rotor Ti-50 (Beckman), y se preincubó a 30 grados C, durante 10 min. La reacción se inició agregando alícuotas de 0,2 ml conteniendo 0,6-1,2 mg en proteínas de vesículas de Golgi. Se incubó a 30 grados C el tiempo indicado en cada caso (fig IV-1).

Luego de la incubación, se agregaron 2 ml de STKM helado e inmediatamente se centrifugó a 100.000 G durante 25 min, a 4 grados C. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de sobrenadante para determinar la concentración de solutos en el medio de reacción ([Sm](ver cálculos en sección 2.1.f)), y para el análisis de las especies radioactivas en el medio de incubación (fig IV-2).

La superficie de los precipitados obtenidos se lavó tres veces, cada una con 2 ml STKM helado. Luego se agregaron 0,5 ml de agua a cada precipitado, se mezcló enérgicamente en un vortex y se sonicó a 4 grados C, durante 25 min (fig IV-3). Seguidamente se agregaron 0,5 ml de ácido perclórico al 8% por tubo y se los dejó 15 min en hielo (fig IV-4). Después de centrifugar a 30.000 G por 15 min, a 4 grados C (fig IV-5), se sacó una muestra de 0,5 ml para determinar el total de solutos en el precipitado, o St (ver cálculos en sección 2.1.f.).

Cuando se analizaron las especies solubles en el precipitado, la sonicación se llevó a cabo en HCl 1 N para inhibir las UMPasas endógenas (Brandan y Fleischer, 1982).

Para determinar la radioactividad ácido insoluble en el precipitado: T (ver cálculos en sección 2.1.f.), este fue lavado superficialmente dos veces con 2ml de ácido perclórico al 8%, cada vez. Luego se resuspendió el precipitado en 5 ml de ácido perclórico al 8%, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 100.000 G por 25 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se disolvió en 1 ml de NaOH 1N. Luego de neutralizar las muestras se contó la radioactividad presente por centelleo líquido.

Para determinar el volumen exterior e interior de las vesículas en el precipitado (V_o y V_i , ver cálculos en sección 2.1.f.), se utilizó (metoxi- ^3H) inulina como estandar no penetrante, y 2-deoxi-D- ^3H glucosa como estandar penetrante.

3.1.e. SEPARACION DE LAS ESPECIES SOLUBLES RADIOACTIVAS LUEGO DE LA INCUBACION CON NUCLEOTIDOS AZUCAR.

^{14}C GalNac, ^{14}C GalNac-1-P, UDP- ^{14}C GalNac, ^3H uridina, ^3H UMP, y ^3H UDP-GalNac fueron separados por cromatografía líquida de alta presión.

El equipo utilizado fue el siguiente: una bomba Waters M-45, un detector espectrofotométrico Spectroflow 757 (Kratos Analytical Instruments), un

registrador modelo IR-18 M (Heath Kit Multispeed), un colector de fracciones Ultrorack (LKB) y una columna analítica Whatman Partisil 10-SAX (con partículas de 10 micrones).

El sistema de solventes usado fue descrito por Holstege et al. (1982). La solución A fue KH_2PO_4 20 mM ajustado a pH 4,1 con HCl. La solución B fue KH_2PO_4 0,5 M ajustado a pH 4,6 con KOH. La columna se equilibró en A, se inyectó la muestra, y la elución se realizó mediante dos gradientes lineales, llegando a 6% de B a los 6 min y a 100% de B a los 36 min. El eluyente de alta concentración se mantuvo hasta los 40 min. El flujo fue de 1,5 ml/min. Cuando se analizaron por este método, las especies ácido solubles, el ácido perclórico fue removido por extracción con trioctilamina (Merck) y 1,1,2-triclorotrifluorooctano (Merck), tal como describieron Wice et al. (1985). La fase acuosa, conteniendo los nucleótidos, fue filtrada (Millipore 0,22 micrones) e inyectada en el sistema de cromatografía líquida de alta presión.

Los tiempos de retención fueron:

-uridina: 3 min

-GalNac: 4 min

-UMP: 8 min

-GalNac 1 P: 9 min

-UDP-GalNac: 24 min

3.1.f. CALCULOS USADOS PARA DETERMINAR LA
TRANSLOCACION DE LOS NUCLEOTIDOS AZUCAR.

[Sm]: concentración de soluto en el medio de
incubación.

solutos total en el sobrenadante.
(expresado en cpm/ml)

[Sm]= $\frac{\text{radioactividad total soluble en el precipitado}}{\text{actividad específica del nucleótido
azúcar al comienzo de la incubación.
(expresado en cpm/nmol).}$

St: Solutos totales en el precipitado.

radioactividad total soluble en el
precipitado (expresado como cpm/mg prot).

St= $\frac{\text{radioactividad total soluble en el precipitado}}{\text{actividad específica del nucleótido
azúcar, al comienzo de la incubación
(expresado en cpm/pmol).}$

Para determinar el S_o , la concentración de
solutos que se encuentra fuera de las vesículas en el

precipitado, primero debe calcularse el V_0 , el volumen que existe fuera de las vesículas en el precipitado. Este parámetro se calcula usando un estándar no penetrante como inulina radioactiva.

Por ejemplo:

$$V_0 = \frac{\text{radioactividad total soluble en el precipitado para inulina (expresada como cpm/mg prot).}}{\text{cpm/\mu l de inulina en el sobrenadante inicial.}}$$

entonces puede calcularse S_0

$$S_0 = V_0(\mu\text{l/mg prot}) \times [S_m] (\text{pmol/\mu l}).$$

La cantidad de soluto dentro de las vesículas en el precipitado, S_i , es la diferencia entre el total de solutos en el precipitado y aquellos solutos que están fuera de las vesículas.

$$S_i = S_t (\text{pmol/mg prot}) - S_0 (\text{pmol/mg prot}).$$

La concentración de soluto dentro de las vesículas en el precipitado, $[S_i]$, se calcula dividiendo la

cantidad de soluto dentro de las vesículas, por el volumen interno de las vesículas, V_i . Este parámetro es la diferencia entre el volumen total del precipitado, (dentro + fuera de las vesículas) V_t , y el volumen fuera de las vesículas en el precipitado, V_o .

V_t se asume como el volumen ocupado por una sustancia que penetra libremente dentro de las vesículas, tal como la deoxiglucosa.

radioactividad total soluble
en el precipitado para deoxiglucosa
(expresada en cpm/mg prot).

$$V_t = \frac{\text{cpm/mg prot}}{\text{cpm/}\mu\text{l en el sobrenadante inicial para deoxiglucosa}}$$

cpm/ μ l en el sobrenadante
inicial para deoxiglucosa.

$$V_i = V_t(\mu\text{l/mg}) - V_o(\mu\text{l/mg})$$

S_i (pmol/mg prot)

$$[S_i] = \frac{S_i(\text{pmol/mg prot})}{V_i(\mu\text{l/mg prot})}$$

V_i (μ l/mg prot)

El total del transporte para un nucleótido azúcar determinado se define con el total de solutos en el lumen de las vesículas, más la cantidad de soluto transferido a macromoléculas T.

$$T = \frac{\text{total de radioactividad \u00e1cido insoluble en el precipitado (expresado en cpm/mg prot)}}{\text{actividad espec\u00edfica del nucle\u00f3tido az\u00facar al iniciar la incubaci\u00f3n (expresado en cpm/pmol)}}$$

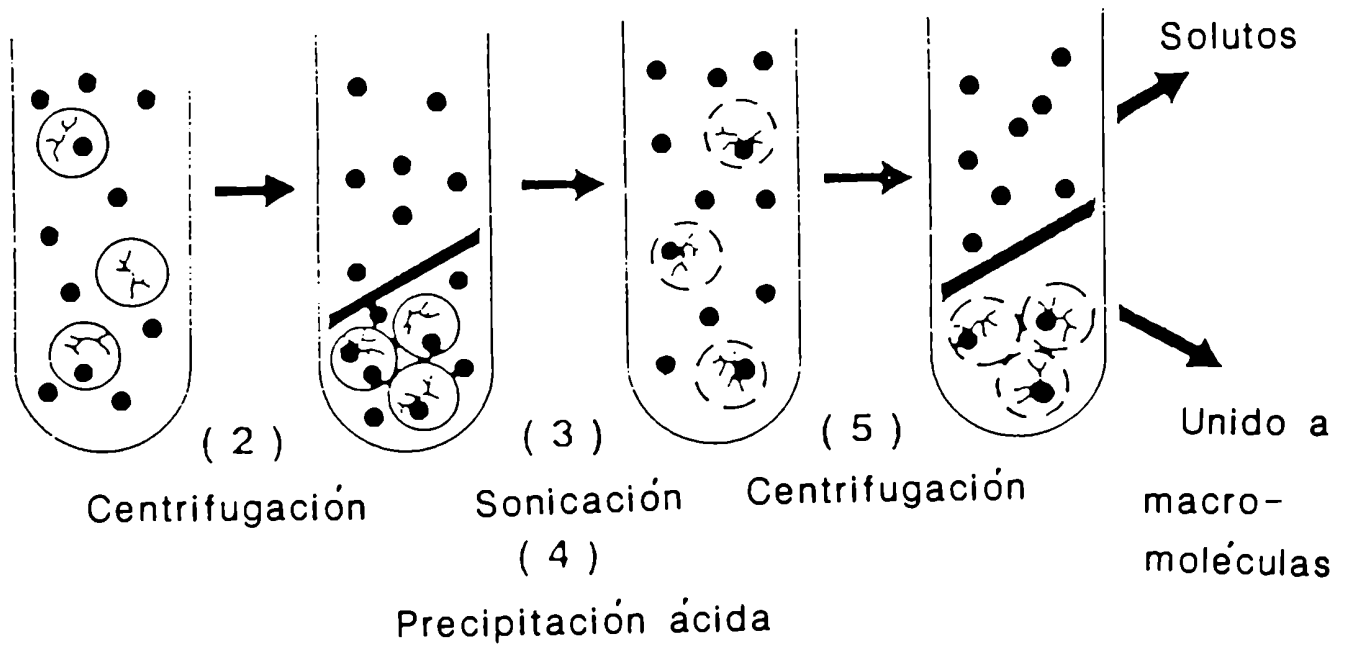
$$\text{Transporte total} = S_i (\text{transp.}) + T (\text{transf.})$$

FIGURA IV

ENSAYO DE TRANSPORTE

(1)

Incubación de vesículas
con UDP-[•]GalNAc



CAPITULO 3

TRANSPORTE DE UDP-GalNac A TRAVES DE MEMBRANAS DEL APARATO DE GOLGI.

3.2. RESULTADOS.

3.2.a. INCUBACION DE VESICULAS DE GOLGI CON UDP-GalNac.

Los resultados presentados en el capítulo 2, sugieren fuertemente que, en hígado de rata, la polipéptido: GalNac transferasa esta localizada exclusivamente en el aparato de Golgi, y analogamente a otras glicosiltransferasas, orientada al lumen de la organela.

El paso siguiente fue determinar si las membranas del aparato de Golgi eran capaces de transportar el sustrato cargado de la reacción, UDP-GalNac, desde el citosol donde es sintetizado (Turnquist et al. 1974), hacia el lumen de la organela.

Para esto se realizó un estudio in-vitro con vesículas altamente purificadas del aparato de Golgi, las que estaban cerradas y mantenian la misma orientación topográfica que in-vivo (Carey y Hirschberg, 1981). Esto es imprescindible para que el ensayo de transporte tenga significado fisiológico.

Estas vesículas cerradas fueron incubadas con el nucleótido azúcar marcado radioactivamente en el azúcar (UDP-[³H]GalNAC). Paralelamente se realizaron incubaciones control con una molécula estandar capaz de atravesar las membranas, tal como la [2-³H] deoxiglucosa y con una sustancia estandar no penetrante, tal como la [³H-metoxil] inulina. Luego de la incubación las vesículas se reaíslaron por centrifugación (ver sección 3.1.d.).

El precipitado vesicular obtenido contuvo 556 pmol/mg prot de solutos radioactivos totales, St (tabla IV). Esta fracción consiste de: a) los solutos radioactivos que han sido transportados a través de la membrana de la organela y permanecen solubles, b) el azúcar radioactivo que ha sido transferido a macromoléculas y c) las moléculas radioactivas que han quedado adsorbidas o están entre las vesículas, del lado de afuera. Mediante cálculos descritos en detalle en la leyenda de la tabla IV, y en la sección 3.1.f., se determinó que 553 pmol/mg prot estaban contenidos en el lumen de las vesículas, Si (tabla IV), y que estos solutos habían sido concentrados 500 veces por sobre los presentes en el medio de incubación. Además 156 pmol/mg prot de GalNAC fueron transferidos a aceptores endógenos durante la incubación. (tabla IV).

La actividad total de transporte de UDP-Gal NAC, 709 pmol/mg prot es la suma de lo que se ha

transferido covalentemente a proteínas más los solutos que se encuentran dentro de las vesículas.

La acumulación de solutos derivados de UDP-[³H]GalNAC en el lumen de las vesículas de Golgi se encontró sensible a la temperatura, siendo el valor a 0 grados C menor del 20% del encontrado a 30 grados C. Además el fenómeno fue lineal entre 0,25 y 1,8 mg prot por ensayo y hasta 3 min.

El transporte de UDP-GalNAC se halló saturable a altas concentraciones de sustrato, tanto cuando la marca radioactiva estaba presente en el azúcar, como cuando estaba en la uridina [fig. V]. La acumulación de solutos derivados de UDP-[¹⁴C]GalNAC tuvo un KM aparente de 10 uM con una velocidad máxima de 380 pmol/mg prot/min. Cuando las incubaciones se hicieron con [³H] UDP-GalNAC, el KM aparente fue de 8,3 uM y la velocidad máxima fue de 460 pmol/mg prot/min. Estos valores de KM aparente son una sobreestimación (de aproximadamente un 20%), pues existe una ruptura del 20% del nucleótido azúcar durante el período de incubación (tabla VI).

3.2.b. INCUBACION DE VESICULAS DE GOLGI
CON UNA MEZCLA DE [³H]UDP-GalNac Y UDP-
[¹⁴C]GalNac: EVIDENCIA DE LA TRANSLOCACION
DEL NUCLEOTIDO AZUCAR ENTERO.

Incubando vesículas de Golgi con una mezcla de nucleótido azúcar marcada con tritio en la uridina y con carbono 14 en el azúcar, se obtuvo evidencia directa de que el UDP-GalNac intacto era la especie transportada.

Se conjeturó que si la molécula entera estaba entrando a las vesículas, la relación entre ambos isótopos, ³H/¹⁴C, encontrada dentro de las vesículas, debiera ser muy similar a la encontrada en el medio de incubación.

Por el contrario, si los productos de ruptura del nucleótido azúcar, originado fuera de las vesículas, fueran las especies radioactivas transportadas, la relación entre los isotopos detectada en el precipitado, sería muy distinta de aquella en el medio de incubación, pues sería muy baja la probabilidad de que los distintos productos de ruptura entraran a las vesículas a la misma velocidad.

Cabe señalar que el [³H]UDP-GalNac, indispensable para el tipo de experimentos propuestos no se halla disponible comercialmente. Fue necesario sintetizarlo y purificarlo en el laboratorio. En la sección 3.1.b., se describe el proceso de síntesis y caracterización de esta molécula.

En el experimento 1 de la tabla V, puede verse que luego de 2, 4 y 6 min de incubación, la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ en las vesículas de Golgi precipitadas, se mantuvo muy similar a la existente para el nucleótido azúcar en el medio de incubación. Esto sugirió fuertemente que el nucleótido azúcar intacto estaba entrando al lumen del Golgi.

En los experimentos 2, 3 y 4 de la tabla V, se muestran incubaciones control, en las que [^3H]UDP-GalNac se incubó con los posibles productos provenientes de la ruptura de la molécula en el medio de incubación (azúcar libre, UMP, y azúcar 1-fosfato). Puede verse que en todos los casos, la relación entre los isótopos en el precipitado fue muy distinta de la presente en el medio de incubación.

Este resultado confirma la interpretación hecha para el experimento 1, el hecho de que la relación entre ^3H y ^{14}C se halla encontrado en el precipitado vesicular casi igual que en el medio de incubación significa que el nucleótido azúcar entero fue transportado, pues sus productos de degradación o no entran, (GalNac y GalNac-1P), o lo hacen a distinta velocidad (UMP).

También se efectuó análisis químico de los solutos radioactivos presentes en el precipitado vesicular (Golgi), y en el medio de incubación, luego de incubaciones como las anteriormente descritas. En la tabla VI, se muestran los resultados del análisis químico. Ambos compartimentos, medio de incubación y Golgi, contuvieron,

además del nucleótido azúcar intacto, cantidades significativas de uridina, UMP, GalNac y GalNac1-fosfato. Todas las especies se hallaron por lo menos 100 veces concentradas dentro del lumen de las vesículas. Además es importante destacar que en el medio de reacción, al final de la incubación, aproximadamente el 80% de la UDP-GalNac estaba entera. En el interior de las vesículas se encontro, además del nucleótido azúcar intacto, una mayor proporción de productos de ruptura. Parte de estos provienen de la transferencia del azúcar a aceptores endógenos y también de ruptura durante el aislamiento de las especies.

3.2.c. RESUMEN.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la UDP-GalNac accede a la GalNac transferasa orientada luminalmente y a los aceptores polipeptídicos del aparato de Golgi, por un sistema de transporte. Como las vesículas derivadas del aparato de Golgi utilizadas en este estudio tienen la misma orientación topográfica que in-vivo, estos experimentos sugieren que la UDP-GalNac es transportada del lado citoplasmático al luminal de las membranas de Golgi in vivo.

Estos estudios también mostraron que la especie transportada al interior del Golgi es la molécula entera de nucleótido azúcar, y no sus productos de ruptura.

TABLA IV

TRANSPORTE DE UDP-[³H]GalNac A TRAVES DE LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI: CONCENTRACION DE SOLUTOS RADIOACTIVOS DENTRO DE LAS VESICULAS, LUEGO DE UNA INCUBACION DE 2 MIN.

	A		B
	pmol/mg prot		uM
St	556	[Sm]	2,7
So	3		
Si	553	[S1]	1383
T	156		
Tte. total	709	[S1]/[Sm] *	524

A: Solutos radioactivos en el precipitado de Golgi.

B: Concentración de solutos.

Tte. total: Transporte total (Si + T).

*: Concentración de solutos radioactivos dentro de las vesículas / concentración de solutos radioactivos en el medio de incubación.

TABLA IV

Vesículas derivadas del aparato de Golgi (1,5 mg prot), fueron incubadas por 2 min a 30 grados C, con UDP-[³H]GalNAC (4 μM, 6 x 10⁵ dpm), en un volumen total de 1 ml. La translocación del nucleótido azúcar fue determinada tal como se describe en la sección 3.1.d. Los distintos parámetros, St, So, Si, T, Sm, [Sm] (definidos en la sección 3.1.f.), fueron medidos como se describe a continuación. Luego de incubaciones con UDP-GalNAC en cuadruplicado, se determinó que había 83.470 dpm/mg prot de solutos radioactivos en el precipitado y 3,96 x 10⁵ dpm/ml en el medio de incubación. La concentración de solutos radioactivos en el medio de incubación, [Sm], se calculó como 2,7 μM. Los solutos radioactivos totales en el precipitado, St, se calcularon en 556 pmol/mg prot.

El total de solutos radioactivos afuera de las vesículas en el precipitado, So, fue calculado en 3,3 pmol/mg prot (ver cálculo de Vo). El total de solutos radioactivos dentro de las vesículas, Si, se calculó como diferencia entre St y So, y resultó 553 pmol/mg prot. La concentración de solutos radioactivos dentro de las vesículas [Si] se calculó en 1.383 μM (ver cálculo de Vi). La misma preparación de Golgi, se incubó con [metoxi-³H] inulina (0,1 μM; 3,2 x 10⁵ dpm), resultando en 400 dpm/mg prot en el precipitado y 326 dpm/μl en el sobrenadante. Con estos valores, el volumen fuera de las vesículas en el precipitado, Vo, se calculó en 1,23 μl/mg prot. Otra serie de incubaciones hecha con [³H] deoxiglucosa (4 nM; 3,5 x 10⁵ dpm), resultó en 553 dpm/mg prot en el precipitado y 327 dpm/μl en el sobrenadante. De estos valores se calculó el volumen total del precipitado, Vt, como 1,63 μl/mg prot. El volumen dentro de las vesículas se calculó por diferencia entre Vt y Vo, y fue de 0,4 μl/mg prot.

FIGURA V

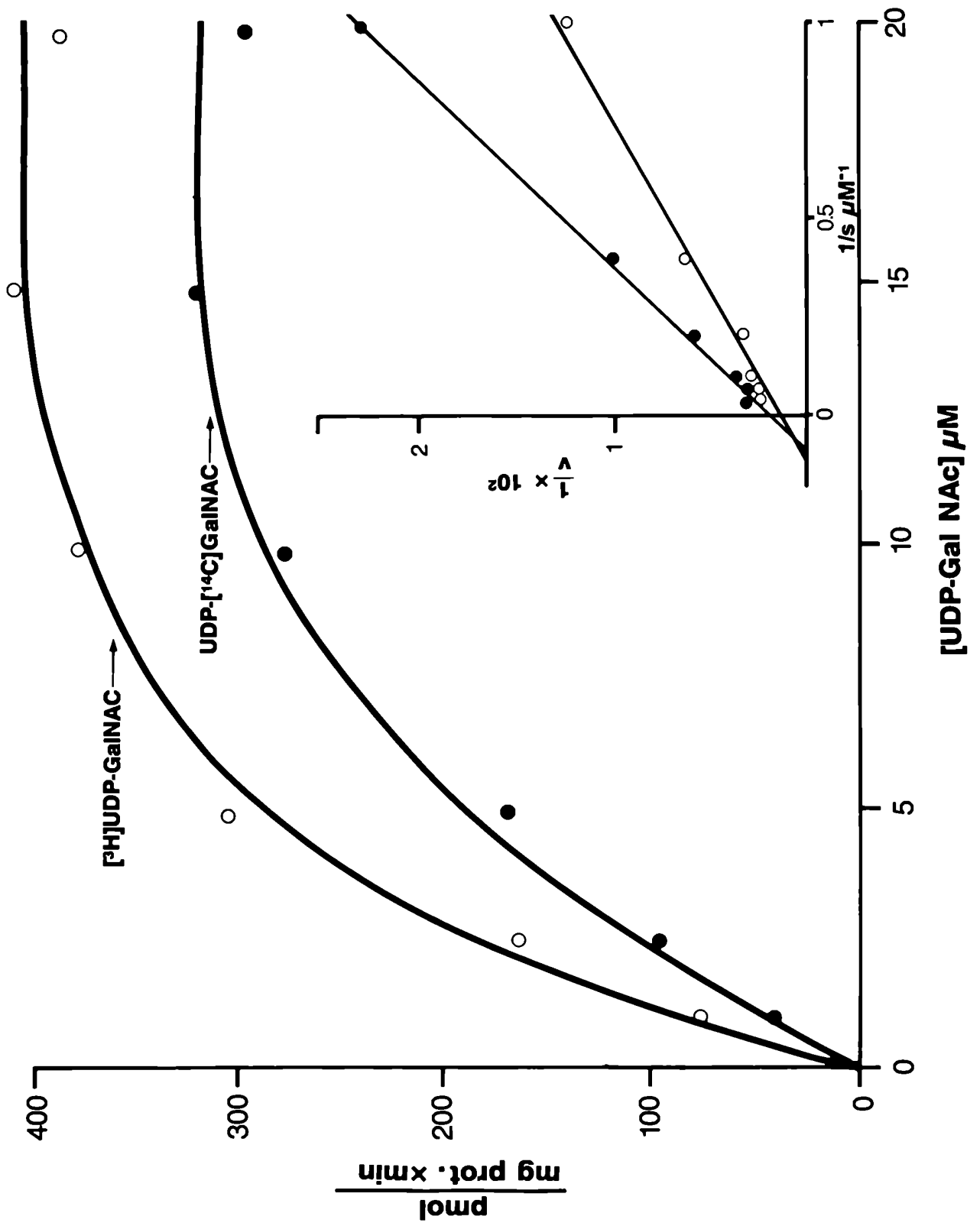


FIGURA V

VELOCIDAD DE ACUMULACION DE SOLUTOS DENTRO DE
VESICULAS DE GOLGI EN FUNCION DE LA
CONCENTRACION DE UDP-GalNac EN EL MEDIO DE
INCUBACION.

Vesículas derivadas del aparato de Golgi (1 mg prot) fueron incubadas a 30 grados C, por 2 min con diferentes concentraciones de [³H]UDP-GalNac y UDP-[¹⁴C]GalNac (200.000 cpm de nucleótido azúcar radioactivo, más UDP-GalNac no marcada para dar la concentración final deseada). La translocación de solutos se midió como se describe en la sección 3.1.d. Los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA V

TRANSPORTE DE UNA MEZCLA DE [³H]UDP-GalNac Y UDP-[¹⁴C]GalNac A TRAVES DE LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI:
RELACION ENTRE LOS ISOTOPOS EN EL MEDIO DE INCUBACION Y DENTRO DE LAS VESICULAS.

Medio de incubación		[³ H]/[¹⁴ C]			
		A	precipitado de Golgi		
			2 min	4 min	6 min
Exp	1	2,33	2,86	2,80	2,83
Exp	2	0,14	22,73	27,57	29,83
Exp	3	1,82	4,28	5,78	7,38
Exp	4	1,08	129,74	156,02	160,00

A: Medio de reacción al comienzo de la incubación.

Experimento 1: 2,0 μM [³H]UDP-GalNac + UDP-[¹⁴C]GalNac
 Experimento 2: 0,5 μM [³H]UDP-GalNac + 0,5 μM [¹⁴C]GalNac
 Experimento 3: 0,5 μM [³H]UDP-GalNac + 0,5 μM [¹⁴C]UMP
 Experimento 4: 0,5 μM [³H]UDP-GalNac + 0,5 μM [¹⁴C]GalNac-1-P

TABLA V

En el experimento 1, vesículas derivadas del aparato de Golgi (0,6 mg prot), fueron incubadas por 2, 4 o 6 min con UDP-GalNac ($3,5 \times 10^5$ dpm de [^3H] y $1,5 \times 10^5$ dpm de [^{14}C]), tal como se describe en la sección 3.1.d., para el ensayo de translocación. Las vesículas fueron aisladas nuevamente por centrifugación y el precipitado fue lavado cuatro veces, cada una con 1,5 ml de sacarosa 0,25 M. Luego el precipitado fue disuelto en 1 ml de NaOH 1 N, neutralizado y contado en 18 ml de Aquasol-2 (Du Pont-NEN). La eficiencia de las mediciones se determinó usando tolueno radioactivo (ICN) como estandar interno. Cada resultado es el promedio de dos determinaciones independientes. Los numeros obtenidos en una incubación típica, como la del experimento 1, luego de 6 min de incubación fueron: medio, luego de la incubación $3,45 \times 10^5$ dpm de [^3H] y $1,48 \times 10^5$ dpm de [^{14}C]; precipitado conteniendo Golgi, 6.557 dpm [^3H] y 2.316 dpm [^{14}C]. En el experimento 2, las incubaciones fueron llevadas a cabo como en el experimento 1, excepto que el medio contenía $1,69 \times 10^5$ dpm de [^3H] y $1,2 \times 10^6$ dpm de [^{14}C]. El medio, luego de 6 min de incubación, contuvo $1,63 \times 10^5$ dpm de [^3H] y $1,2 \times 10^6$ dpm de [^{14}C]. En el precipitado conteniendo el Golgi, se encontraron 14.950 dpm de [^3H] y 510 dpm de [^{14}C]. En el experimento 3, el medio de incubación contuvo 2×10^5 dpm de [^3H] y $1,1 \times 10^5$ dpm de [^{14}C]. Luego de los 6 min de incubación, el precipitado (Golgi), contuvo 12.170 dpm de [^3H] y 1.650 dpm de [^{14}C]. En el experimento 4, el medio de incubación contenía 2×10^5 dpm de [^3H] y $1,85 \times 10^5$ dpm de [^{14}C]. Luego de los 6 min de incubación se encontraron en el precipitado (Golgi) 12.540 dpm de [^3H] y 80 dpm de [^{14}C].

TABLA VI

TRANSPORTE DE UNA MEZCLA DE [³H]UDP-GalNac Y UDP-[¹⁴C]GalNac A TRAVES DE LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI: CONCENTRACION DE ESPECIES RADIOACTIVAS DENTRO DE LAS VESICULAS, LUEGO DE UNA INCUBACION DE 2 MIN.

Especies moleculares radioactivas	Solutos en el medio	Solutos en el precipitado de Golgi			[S1]/ [S2] *
		St	So	Si	
	μM	pmol/mg prot			
[³ H]uridina	0,06	19,67	0,07	19,60	816
[³ H]UMP	0,04	55,86	0,05	55,81	3487
[³ H]UDP-GalNac	0,79	45,60	0,97	44,63	141
[¹⁴ C]GalNac	0,03	20,95	0,04	20,91	1742
[¹⁴ C]GalNac-1-P	0,09	44,22	0,11	44,11	1225
UDP-[¹⁴ C]GalNac	0,81	41,01	0,99	40,02	123

*: Concentración de solutos radioactivos dentro de las vesículas / concentración de solutos radioactivos en el medio de incubación.

TABLA VI

Vesículas derivadas del aparato de Golgi, (1 mg prot), fueron incubadas con una mezcla de [³H]UDP-GalNac y UDP-[¹⁴C]GalNac (1 μM) a 30 grados C, como se describe en la sección 3.1.d., para el ensayo de translocación. La relación [³H]/[¹⁴C] en el precipitado fue 1,93; mientras que aquella en el medio de incubación fue 1,67. Las especies radioactivas que permanecieron en el medio de reacción y las especies solubles en el precipitado, fueron separadas por cromatografía líquida de alta presión, tal como se describe en la sección 3.1.c. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes. Los parámetros: St, So, Si, Sm, [Sm], han sido definidos en la sección 3.1.f.

CAPITULO 4

MECANISMO DE TRANSPORTE Y DISTRIBUCION DE LOS ACEPTORES ENDOGENOS PARA GalNac.

4.1. MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron los siguientes compuestos radioactivos: UDP-[1-³H]GalNac (8,7 Ci/mmol); UDP [4,5-³H] galactosa (40,3 Ci/mmol); UDP-[³H]GlcNac (6,6 Ci/mmol); GDP-[1-¹⁴C]fucosa (192 mCi/mmol); CMP-[9-³H]AcNeu (18,9 Ci/mmol); 2 deoxi-D-[³H] glucosa (8,3 Ci/mmol); Metoxi-[³H] inulina (298,3 mCi/g); todos obtenidos de la compañía Du Pont-NEN.

4.1.a. AISLAMIENTO DE RER, REL Y GOLGI DE HIGADO DE RATA.

Cuando se compararon las tres fracciones obtenidas del mismo tejido, se utilizó el método descrito en la sección 2.1.a.

Además de caracterizar enzimáticamente las fracciones (secc. 2.1.b.), fue necesario determinar la integridad y topografía de las mismas, pues estas serían empleadas en ensayos de transporte.

4.1.b. INTEGRIDAD Y TOPOGRAFIA DE LAS VESICULAS AISLADAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO (RER Y REL).

La latencia se define como la relación entre la actividad de una enzima en una determinada población de vesículas, sobre la máxima actividad para esa enzima, luego de permeabilizar completamente las vesículas, ya sea con detergente o con medios físicos. En el caso de una enzima de conocida localización luminal, un alto grado de latencia está directamente relacionado con la integridad de las membranas, indicando vesículas cerradas.

La glucosa-6-fosfatasa, es una enzima luminal muy abundante en el retículo endoplásmico de hígado (Arion et al., 1976), su sustrato normal, la glucosa 6-fosfato, es transportada específicamente al lumen de esta organela. La manosa 6-fosfato, es un sustrato alternativo para esta enzima, pero es incapaz de atravesar la membrana del retículo endoplásmico. Por lo tanto es el sustrato ideal para determinar latencia, pues cuando las vesículas están cerradas, no es hidrolizado, y cuando se ha roto la barrera

de permeabilidad, se produce degradación del mismo a manosa y fosforo libre. El ensayo de latencia de glucosa -6-fosfatasa con manosa 6-fosfato como sustrato se realizó de acuerdo a Arion et al. (1976), y el fosfato inorgánico liberado se midió por el método de Ames (1966). Según este criterio, las vesículas usadas en los ensayos de transporte estuvieron 98% intactas.

4.1.c. ENSAYO DE TRANSLOCACION.

El ensayo de translocación y los cálculos utilizados, fueron descritos en detalle en las secciones 3.1.d. y 3.1.f. La única diferencia es que la reacción se inició agregando alícuotas de 0,2 ml, conteniendo entre 0,7 y 1,4 mg prot del RER o REL, según el caso.

Cuando las vesículas del retículo endoplásmico fueron incubadas con una sustancia penetrante estandar, tal como la 2-deoxi-D-[³H]-glucosa, se calculó (ver sección 3.1.f.), que el volumen total (Vt), ocupado por el precipitado vesicular era de 3,8 μ l/mg prot. Mediante incubaciones con [metoxi-³H]inulina, una sustancia no penetrante estandar, que solo ocupa el lugar entre las vesículas en el precipitado, se calculó (ver sección 3.1.f.), que este espacio (Vo), era de 2,9 μ l/mg prot. El volumen dentro de las vesículas en el precipitado (Vi), se calculó como la diferencia entre Vt y Vo, y fue de 0,9 μ l/mg prot.

CAPITULO 4

MECANISMO DE TRANSPORTE Y DISTRIBUCION DE LOS ACEPTORES ENDOGENOS PARA GalNac.

4.2. RESULTADOS.

4.2.a. MECANISMO DE TRANSPORTE DE UDP-GalNac A VESICULAS DERIVADAS DEL APARATO DE GOLGI.

Luego examinamos el mecanismo por el cual se transportaba la UDP-GalNac al lumen de las vesículas del aparato de Golgi. Estudios previos sugerían fuertemente que los nucleótidos conteniendo uridina entraban al Golgi por medio de un intercambio acoplado con la salida de UMP luminal (Capasso y Hirschberg, 1984). Además, que los distintos nucleótidos azúcar derivados de uridina, entraban mediante transportadores específicos (Deutscher y Hirschberg, 1986).

Obtuvimos evidencia de un intercambio entre UDP-GalNac y UMP preincubando las vesículas de Golgi con [³H]UDP-GalNac (tabla VII). Previamente habíamos mostrado que esta incubación resultaba en acumulación de [³H]UMP y

[³H]UDP-GalNac, dentro de las vesículas (tabla VI). Como se ve en la tabla VII, cuando a estas vesículas precargadas se las incubó con UDP-[¹⁴C]GalNac o con [¹⁴C]UMP, esto resultó en la entrada de nucleótidos marcados con ¹⁴C y la salida de ³H de las vesículas. Las relaciones molares aparentes de entrada y salida fueron 1,8 y 2,8 respectivamente. No obstante, estos cálculos asumen completo equilibrio del nucleótido azúcar con los nucleótidos azúcar endógenos no radioactivos. (Carey y Hirschberg, 1981).

En la tabla VII, también puede verse que el intercambio fue específico para el nucleósido monofosfato que contiene uridina, pues ni CMP, GMP o AMP causaron salida significativa de solutos tritiados del lumen del Golgi.

El transporte de UDP-GalNac al interior de vesículas derivadas del aparato de Golgi, no fue afectado por la adición de una fuente de energía tal como el ATP (20 μ M). Además, se observó que el transporte no era dependiente del intercambio de potasio o protones, pues la preincubación de las vesículas con ionóforos tales como valinomicina (10 μ M) o nigericina (10 μ M), o una mezcla 10 μ M de cada uno, no tuvo efecto significativo sobre el transporte de UDP-GalNac. Esto sugiere como primera aproximación, que el transporte de UDP-GalNac, no tiene un requerimiento absoluto directo de energía, ni está acoplado a gradientes iónicos.

4.2.b. COMPARACION DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE UDP-GalNac CON OTROS NUCLEOTIDOS AZUCAR.

Se midió la acumulación de solutos radioactivos y la transferencia de azúcares radioactivos a aceptores endógenos dentro de vesículas derivadas del aparato de Golgi, para varios nucleótidos azúcar. Las vesículas fueron incubadas con GDP-fucosa, CMP-AcNeu, UDP-GlcNac, UDP-GalNac y UDP-Gal, utilizando concentraciones cercanas a sus valores de KM (tabla VIII). La actividad total de transporte, es decir, la cantidad de solutos dentro del lumen de las vesículas, mas los que estaban covalentemente unidos a macromoléculas, se encontró máxima en UDP-GlcNac y UDP-GalNac y mínima para GDP-fucosa.

Comprobamos, así, que la actividad de transporte que estamos describiendo es perfectamente comparable a otras previamente descritas para la misma organela.

4.2.c. CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE DE
UDP-GalNAC A VESICULAS DEL RETICULO
ENDOPLASMICO Y APARATO DE GOLGI.

En nuestros estudios previos (capítulo 2), mostramos que la polipéptido: N-acetilgalactosaminil-transferasa estaba localizada solamente en membranas del aparato de Golgi, y que vesículas provenientes de esta organela podían transportar UDP-GalNac del medio de reacción, hacia su lumen (capítulo 3).

Estuvimos interesados en determinar si esta actividad de transporte, estaba aumentada en vesículas derivadas del aparato de Golgi, cuando se las comparaba con vesículas derivadas del RER o REL. Estos estudios también permitirían determinar los sitios subcelulares para los aceptores endógenos de GalNac. Con este objetivo, se obtuvieron vesículas derivadas del aparato de Golgi, RER y REL, cerradas y con la misma orientación topográfica que in-vivo. Se midió la velocidad inicial de transporte de UDP-GalNac en cada una de estas fracciones. Puede verse en la tabla IX, columna 1, que las vesículas derivadas del Golgi, tienen una velocidad específica de transporte de UDP-GalNac entre 4 y 6 veces más alta que las provenientes del RER y REL.

Luego quisimos determinar si la actividad transportadora evidenciada por las fracciones del retículo

endoplásmico era el resultado de vesículas de Golgi contaminando estas fracciones. Para ello se halló el total de actividad de sialiltransferasa (una enzima marcadora del Golgi), presente en las fracciones del retículo endoplásmico. Así pudo descontarse la actividad transportadora atribuible a las vesículas de Golgi presentes. Como puede verse en la tabla IX, columna 2, solo entre el 5 y 11% del transporte de UDP-GalNac al retículo endoplásmico pudo ser descontado como proveniente de contaminación con vesículas de Golgi.

Como control adicional (para la pureza de la fracción), también se investigó la capacidad de las vesículas del retículo endoplásmico de transportar UDP-Gal. Estudios previos de este y otros laboratorios habían mostrado que este nucleótido azúcar solo se transporta al interior de vesículas del Golgi y no al de aquellas derivadas del retículo endoplásmico (Brandan y Fleischer, 1982; Perez y Hirschberg, 1985).

Como se muestra en la tabla IX, columnas 1 y 2, prácticamente toda la actividad transportadora de UDP-Gal se encontró en la fracción de Golgi y solo una pequeña fracción, en el retículo endoplásmico. Estos resultados indican que las vesículas derivadas del retículo endoplásmico transportan UDP-GalNac a su interior, pero a velocidad significativamente más baja que las derivadas del aparato de Golgi.

Esta actividad se encontró como dependiente de la temperatura y saturable a altas concentraciones de sustrato, con un KM aparente similar al encontrado en el aparato de Golgi.

4.2.d. UBICACION DE LOS ACEPTORES ENDOGENOS PARA GalNac EN EL HIGADO DE RATA.

También estuvimos interesados en determinar si podíamos detectar los aceptores macromoleculares endógenos para GalNac en las preparaciones de vesículas de las distintas organelas. Esto fue hecho midiendo la radioactividad ácido insoluble luego de incubar vesículas intactas con UDP-[³H] GalNac. Como se muestra en la tabla IX, columna 3, las membranas del aparato de Golgi, contuvieron cantidad significativa de GalNac radioactiva ácido insoluble, mientras que solo pequeñas cantidades fueron detectadas en membranas del retículo endoplásmico.

Cuando estos valores fueron corregidos por la contaminación con membranas de Golgi presentes en esas fracciones, se encontró que toda la radioactividad ácido insoluble podía atribuirse a esta pequeña contaminación. Por lo tanto, en el hígado de rata, solamente en membranas del aparato de Golgi, se encontró transferencia de GalNac a aceptores endógenos.

Como control adicional, también se analizó la radioactividad ácido insoluble, luego de incubar vesículas con UDP-[³H]Gal. La transferencia de [³H]Gal a aceptores

endógenos, fue detectada casi exclusivamente en membranas del aparato de Golgi. Este resultado no es sorprendente en vista de estudios previos que sugerían fuertemente que el aparato de Golgi es el mayor (y quizá el único) sitio de adición de galactosa a macromoléculas en el hígado de rata (Hirschberg y Snider, 1987).

La transferencia de GalNac a aceptores endógenos en vesículas del aparato de Golgi, se encontró dependiente de la temperatura y de la integridad de las vesículas, tabla X. Puede verse en esta tabla que cuando las vesículas se incubaron a 30 grados C, en presencia de tritón, estas fueron permeabilizadas y perdieron la capacidad de concentrar solutos en su interior, entonces la transferencia a aceptores endógenos se vio disminuida en un 85%.

Este efecto no se nota en los datos mostrados en la tabla III, sección 2.2, pues allí la concentración de UDP-GalNac en el medio de incubación fue de 4,8 mM, mil veces mayor que la utilizada en estos ensayos. A esa concentración, la transferencia a aceptores endógenos es independiente de la capacidad concentradora de las vesículas intactas. Los experimentos mostrados en la tabla III, fueron proyectados para determinar la topografía de la GalNac transferasa y la influencia de la integridad de las vesículas en la transferencia de sustrato a un aceptor macromolecular exógeno, tal como la apomucina.

Los experimentos mostrados en la tabla X, estuvieron proyectados para estudiar la transferencia de

GalNac a aceptores macromoleculares endógenos, de allí la diferencia de concentración de UDP-GalNac en el medio de incubación.

La transferencia de GalNac a aceptores endógenos depende de dos procesos, primero, el transporte de la UDP-GalNac al lumen del aparato de Golgi, y segundo, la transferencia del azúcar a los polipéptidos endógenos.

La marcada disminución en la transferencia a aceptores endógenos observada al incubar a 0 grados C, (tabla X), se debe a la disminución en la velocidad de ambos procesos.

4.2.e. RESUMEN.

En este capítulo hemos mostrado que el mecanismo por el cual la UDP-GalNac accede al lumen del aparato de Golgi, parece ser por intercambio equimolecular con el nucleósido monofosfato UMP. Además, el transporte de UDP-GalNac al interior del Golgi, ocurre a velocidades y concentraciones comparables con las de otros nucleótidos azúcar previamente estudiados. Si bien la UDP-GalNac, también es transportada al interior de vesículas derivadas del retículo endoplásmico, la velocidad de este proceso es entre 4 y 5 veces menor que la observada para el aparato de Golgi. Los aceptores macromoleculares endógenos para GalNac en el hígado de rata, han sido localizados exclusivamente en el aparato de Golgi.

TABLA VII

INTERCAMBIO ESPECIFICO ENTRE NUCLEOTIDOS EN EL LUMEN DE LAS VESICULAS DE GOLGI CON NUCLEOTIDOS AZUCAR DEL MEDIO DE INCUBACION.

Preincubación (20 min), sustrato [³H]UDP-GalNac (0,5 μM) en todos los casos.

Incubación sustrato (1 min)	Salida		Entrada	Entrada/ salida
	% A	pmol	pmol	
UDP-[¹⁴ C]GalNac (1μM)	40,0	66	115	1,8
[¹⁴ C]UMP (1μM)	28,9	52	145	2,8
UMP (70μM)	42,4			
CMP (70μM)	10,2			
GMP (70μM)	4,7			
AMP (70μM)	3,5			
ninguno	0,0			

A: Solutos radioactivos saliendo de las vesículas.

TABLA VII

Vesículas derivadas del aparato de Golgi (1 mg prot), fueron primero incubadas a 30 grados C, con [³H]UDP-GalNAc por 20 min. A ese tiempo se agregaron a la suspensión de vesículas distintos sustratos radioactivos y no radioactivos durante 1 min. La reacción fue detenida colocando los tubos en hielo con NaCl. Luego las muestras fueron centrifugadas y las especies solubles dentro del Golgi fueron determinadas tal como se describe en la sección 3.1.d. Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes.

TABLA VIII

TRANSPORTE DE DISTINTOS NUCLEOTIDOS AZUCAR AL INTERIOR DE VESICULAS DERIVADAS DEL APARATO DE GOLGI DE HIGADO DE RATA.

Nucleótido azúcar	Concen- tración	Si	T	Tte. total
	μM		pmol/mg prot	
GDP-fucosa	7,5	35	55	90
CMP-AcNeu	2,5	48	60	108
UDP-GlcNAc	6	500	238	738
UDP-GalNAc	6	580	150	730
UDP-Gal	4	40	170	210

Si: Solutos dentro de las vesículas.

T: Transferencia (ácido insoluble).

Tte. total: Transporte total (Si + T).

Vesículas derivadas del aparato de Golgi (1,5 mg prot) fueron incubadas durante 2 min, con el nucleótido azúcar indicado tal como se describe en la sección 3.1.d. Todos los valores son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA IX

TRANSPORTE DE UDP-[³H]GalNac Y UDP-[³H]GAL AL INTERIOR DE VESICULAS DERIVADAS DEL REL, RER Y APARATO DE GOLGI.

	Si		T		Tte. total
	n.c.	c.	n.c.	c.	c.
	pmol/mg prot		pmol/mg prot		pmol/ mg prot
UDP-GalNac					
GOLGI	192,0	192,0	99,0	99,0	291,0
REL	83,0	75,2	2,1	0	75,2
RER	55,0	53,2	1,5	0	53,2
UDP-Gal					
GOLGI	28,0	28,0	56,0	56,0	84,0
REL	2,0	0,9	3,0	0,7	1,6
RER	3,4	3,1	2,3	1,8	4,9

Si: Solutos dentro de las vesículas.

T: transferencia (ácido insoluble).

Tte. total: Transporte total (Si + T).

n.c.: No corregido por contaminación con Golgi.

c.: Corregido por contaminación con Golgi.

TABLA IX

En el experimento 1, vesículas de Golgi (1,2 mg prot), REL (1,0 mg prot) y RER (1,2 mg prot), fueron incubadas con UDP-[³H]GalNac (4 μM) por 2 min a 30 grados C, y la concentración de especies solubles y ácido insolubles dentro de las vesículas, se determinó tal como se describe en la sección 3.1.d. La contaminación con Golgi de las vesículas de REL y RER, se corrigió basándose en las unidades de actividad de sialiltransferasa detectada en las fracciones. En el experimento 2, las vesículas derivadas de las distintas organelas, fueron incubadas con UDP-[³H]Gal (4 μM) por 2 min a 30 grados C. Los valores mostrados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA X

TRANSFERENCIA DE GalNac A ACEPTORES ENDOGENOS EN EL APARATO DE GOLGI: DEPENDENCIA DE LA TEMPERATURA Y DE LA INTEGRIDAD DE LAS VESICULAS.

Temperatura	Tritón X-100	Si	T
° C.	0,1%		
pmol/mg prot			
30		220	105
30	+	0	15
0		39	18
0	+	0	5

Si: Solutos dentro de las vesículas.

T: Transferencia (ácido insoluble).

Vesículas derivadas del aparato de Golgi (1,5 mg prot) fueron incubadas con UDP-[³H]GalNac (4 µM) por 2 min a la temperatura indicada en presencia o ausencia de tritón X-100. La concentración de solutos dentro de las vesículas y de las especies ácido insolubles fueron determinadas como se describe en la sección 3.1.d. Los valores mostrados son el promedio de dos determinaciones independientes.

CAPITULO 5

DISTRIBUCION TOPOGRAFICA DE LA N-ACETIL GLUCOSAMINA TERMINAL EN PROTEINAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO.

5.1. MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron los siguientes compuestos radioactivos: UDP-[¹⁴C]Galactosa (330 mCi/mmol) y CPM-[³H]acido N-acetilneuramínico (13,6 Ci/mmol).

5.1.a. OBTENCION DE LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES DE HIGADO DE RATA.

Fracciones enriquecidas en RER y REL fueron obtenidas como describieron Carey y Hirschberg (1980), utilizando una modificación de la técnica publicada por Fleischer y Kervina (1974), tal como se describe en la sección 2.1.a. Este método de fraccionamiento subcelular toma ventaja del hecho que los microsomas rugosos tienen alta afinidad por el ión cesio en comparación con los microsomas lisos (Dallner et al., 1971). En presencia de una reducida cantidad de cesio, la carga neta superficial negativa de los microsomas rugosos disminuye, conduciendo a

agregación extensiva de los mismos. La velocidad de sedimentación de las partículas resultantes está incrementada entre 4 y 9 veces (Dallner y Nilson, 1966). Para descartar la posibilidad de que el método utilizado para aislar el retículo endoplásmico, influyera en los resultados observados, también se usó la técnica descrita por Alderman et al. (1974), para obtener vesículas del RER y REL.

En este método la separación se basa en el comportamiento diferencial de ambas poblaciones de vesículas en gradientes de sacarosa exclusivamente. Se requieren tiempos de centrifugación mas largos, de 24 h. Las vesículas microsomales son completamente permeables a la sacarosa y gracias a esta propiedad, ellas no experimentan ninguna respuesta osmótica.

Las vesículas del RER y REL obtenidas por este método, estuvieron enriquecidas 4,9 y 4,1 veces en actividad específica de glucosa -6-fosfatasa, con recuperaciones del 15 y 12%, respectivamente. Los marcadores enzimáticos de otras organelas subcelulares contaminantes fueron muy bajos, tal como se describe en la sección 2.1.b. para RER y REL obtenido de acuerdo a Fleischer y Kervina (1974).

La relación entre ARN y proteínas mg/mg fue de 0,260 para el RER y de 0,078 para el REL. Luego de eliminar los ribosomas de la membrana del RER por el procedimiento de KCl y puromicina, descrito por Adelman (1974), la relación ARN/prot para el RER bajo a 0,089.

Las vesículas estuvieron por lo menos 94% intactas, basandose en la latencia de la glucosa-6-fosfatasa con respecto a la manosa 6-fosfato usada como sustrato (Arion et al., 1976; sección 4.1.b.). Las vesículas fueron utilizadas para los experimentos de marcado radioactivo inmediatamente después de ser aisladas.

La permeabilización de las vesículas derivadas del RER y REL fue efectuada sonicando muestras conteniendo 1-4 mg de prot en 0,5 ml de buffer A (sacarosa 0,25 M; Hepes 25 mM pH 7,2; Aprotinina al 1% (Sigma Chemical Co.)). La sonicación fue hecha durante 2 min con microtip a 28-30% de la potencia de un sonicador W-225 (Heat Systems). La latencia hacia la manosa 6-fosfato luego de la sonicación fue menor del 5%.

Los lisosomas se obtuvieron de la "fracción -L", de acuerdo al procedimiento descrito por de Duve et al. (1955). Esta fracción de lisosomas se encontro 6 veces enriquecida en actividad específica de fosfatasa ácida usando beta glicerofosfato como sustrato (Trouet, 1974). La recuperación fue del 32%. Esta fracción también estuvo enriquecida 1,5 veces en actividad específica de glucosa-6-fosfatasa.

Vesículas derivadas del aparato de Golgi fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento de Leelavathi et al. (1970), descrito en detalle en la sección 3.1.a. Las vesículas del Golgi fueron permeabilizadas con 0,1% tritón x-100 en buffer A, a una concentración de proteína de 2 a 5 mg/ml.

Una fracción enriquecida en membrana plasmática se obtuvo de acuerdo al procedimiento de Hubbard et al. (1983). Estuvo enriquecida 26 veces en actividad específica de 5'-nucleotidasa, con una recuperación del 37% y una vez en actividad específica de glucosa-6-fosfatasa.

Los núcleos puros fueron obtenidos con el procedimiento descrito por Blobel y Potter (1966).

La fracción citosólica se obtuvo luego de perfundir y homogenizar los hígados de rata en sacarosa 0,25 M; Hepes 25 mM pH 7,2; aprotinina al 1% (3 ml/g de tejido), con un homogenizador de teflón-vidrio. El homogenato fue luego filtrado a través de dos capas de gasa y centrifugado a 15.000 G por 20 min a 4 grados C. El precipitado se descartó y el sobrenadante post-mitocondrial se centrifugó a 160.000 G durante dos horas a 4 grados C. El precipitado se descartó y el sobrenadante se utilizó como fracción citosólica.

Las proteínas intrínsecas de membrana de las distintas organelas subcelulares fueron obtenidas por tratamiento con carbonato de sodio (Fujiki et al., 1982). Brevemente, fracciones conteniendo vesículas de las distintas organelas (0,3-0,6 mg prot/ml), fueron incubadas en carbonato de sodio 0,1 M pH 11,5 por 30 min a 0 grados C. Estas condiciones convierten vesículas cerradas en hojas membranosas y solubilizan las proteínas periféricas y del contenido (Fujiki et al., 1982). Este procedimiento también

desprende los ribosomas de las membranas del RER. La relación ARN/prot para las vesículas del RER lavadas con carbonato fue de 0,092; similar a la del REL.

Para los experimentos de marcado todas las fracciones se resuspendieron en buffer A, entre 8-15 mg de prot/ml. Después de ser aisladas, las fracciones fueron utilizadas inmediatamente.

5.1.b. DETERMINACION DE PROTEINAS Y ARN.

Las proteínas fueron determinadas de acuerdo al procedimiento descrito por Peterson (1977), y el ARN de acuerdo a Fleck y Begg (1954).

5.1.c. AUTOGALACTOSILACION DE LA GALACTOSIL TRANSFERASA DE LA LECHE BOVINA.

Galactosiltransferasa de leche bovina (Sigma Chemical Co.), fue autogalactosilada con UDP-galactosa no radioactiva (0,4 mM), por 30 minutos a 37 grados C, tal como describieron Torres y Hart (1984). El exceso de UDP-Gal fue eliminado luego de dos pasajes a través de filtros Centricón 30 (Amicon Corp.). La enzima fue guardada a 10 unidades/ml a -20 grados C en buffer A y glicerol al 50%.

5.1.d. MARCADO DE LAS DIFERENTES FRACCIONES
SUBCELULARES CON UDP-GAL RADIOACTIVA Y
GALACTOSIL TRANSFERASA.

Las distintas fracciones subcelulares (0,1 mg prot de vesículas intactas o permeabilizadas, o proteínas intrínsecas de membrana, o proteínas periféricas y del contenido vesicular, o proteínas citosólicas), fueron incubadas por 10 min a 30 grados C, en 50 µl de buffer conteniendo las siguientes concentraciones finales de solutos: sacarosa 0,25 M; KCl 25 mM; NaF 25 mM; Mn Cl₂ 5 mM; aprotinina al 1%; 5' AMP 5 mM; Hepes 25 mM pH 7,2; 0,15 unidades de galactosiltransferasa autogalactosilada y UDP-[¹⁴C] galactosa (0,2 µCi, 333 mCi/mmol). La reacción fue detenida por dilución con 0,4 ml de sacarosa 0,25 M; EDTA 5 mM y centrifugada inmediatamente en una Airfuge (Beckman) a 30 psi por 20 min. Los precipitados se resuspendieron en 40 µl de sacarosa 0,25 M y 15 µl de buffer PSM (sacarosa 1 M; SDS al 6%; Tris-HCl 60 mM pH 7,4; EDTA 6 mM; 2-mercaptoetanol al 6%). Las muestras fueron luego sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en la presencia de SDS (PAGE-SDS).

Cuando se analizaron en geles fracciones correspondientes a los sobrenadantes, ellas fueron primero

concentradas en filtros Centricon-10. (Amicon Corp.). Luego se agregaron 15 μ l de buffer PSM. La fracción citosólica fue marcada como se describe para las fracciones membranosas, y la reacción se terminó agregando 15 μ l de buffer PSM. La latencia de las vesículas derivadas del retículo endoplásmico, al final de la incubación con galactosiltransferasa fue del 96%.

Luego de las incubaciones, entre 30-50% de la UDP-[¹⁴C]Gal inicial permanecía intacta, esto se determinó por su movilidad en cromatografía de capa fina. El sistema de solventes fue etanol: acetato de amonio 1 M pH 7,5 (60:40). En este sistema el nucleótido azúcar tiene un Rf de 0,40 y la galactosa libre 0,85.

5.1.e. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS (PAGE-SDS).

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS fue realizada usando geles planos de 1,5 mm de espesor, con el sistema de buffers descrito por Laemmli (1970). La concentración de acrilamida en el gel superior fue de 3% y en el inferior se estableció un gradiente de acrilamida del 6 al 12%.

Las muestras fueron corridas por 16 h a 110 V. Luego las proteínas se visualizaron por tinción con nitrato de plata (BioRad). Antes de autoradiografiar los geles,

estos fueron tratados con EN-³HANCE (Du Pont-NEN), para acelerar la detección de la radioactividad. Luego los geles fueron secados y autoradiografiados con placas Kodak X-Omat.

CAPITULO 5

DISTRIBUCION TOPOGRAFICA DE LA N-ACETIL GLUCOSAMINA TERMINAL EN PROTEINAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO.

5.2. RESULTADOS.

Nosotros estabamos interesados en determinar si podíamos detectar glicoproteínas con GlcNAc terminal expuesto al lado citoplasmático de las membranas del retículo endoplásmico liso o rugoso in-vivo. Decidimos usar hígado de rata como fuente de membranas porque a partir de este tejido es posible obtener vesículas derivadas del retículo endoplásmico cerradas y con la misma orientación topográfica que in-vivo (Fleischer y Kervina, 1974; Arion et al., 1976).

La existencia de glicoproteínas del retículo endoplásmico terminadas en GlcNAc, puede ser examinada usando UDP-Gal marcada radioactivamente con carbono 14 en la galactosa, y cantidades saturantes de galactosil transferasa soluble, enzima que adiciona galactosa específicamente en enlace beta 1-4, a los residuos de Glc NAc terminales. El diseño experimental está esquematizado en la fig. VI. La galactosiltransferasa soluble es una

enzima de elevado peso molecular que no puede atravesar libremente membranas celulares (Magee et al., 1974). Se razonó entonces que si se evidenciaba transferencia de galactosa a glicoproteínas presentes en vesículas cerradas, los azúcares aceptores deberían estar orientados al lado exterior de las vesículas, y por inferencia, al lado citoplasmático de la membrana del retículo endoplásmico.

Para que esta hipótesis sea válida, se requiere también que la UDP-Gal no sea capaz de entrar al retículo endoplásmico y que no existan galactosiltransferasas endógenas en la organela (fig. VII). Ambas condiciones se cumplen para el retículo endoplásmico (Hirschberg y Snider, 1987).

Si las vesículas fueran permeabilizadas antes de agregar la UDP-Gal radioactiva y la galactosiltransferasa soluble, se podrían marcar también los azúcares aceptores expuestos al lado luminal de las mismas. Para determinar si las proteínasceptoras son integrales de membrana, periféricas o del contenido vesicular puede observarse su comportamiento frente al lavado alcalino (Fujiki et al., 1982). En la fig. VIII, se han esquematizado los resultados posibles para el tipo de experimento propuesto. Finalizado el marcado, las muestras serían luego sometidas a PAGE-SDS y radioautografía.

Analizemos los posibles resultados: el caso mostrado en la fig. VIII, línea A, sugiere que existen aceptores para galactosa orientados al lado citosólico de

las vesículas intactas; estos aceptores son galactosilados de igual modo en vesículas permeabilizadas (P) o en membranas lavadas (L). Esto sugiere que los aceptores están hacia el lado exterior y son proteínas intrínsecas de membrana. El resultado mostrado en la línea B, sugiere que el aceptor es accesible solamente en vesículas permeabilizadas (P) y por lo tanto, está orientado hacia el lumen, correspondiendo a una proteína integral de membrana, pues permanece luego del lavado alcalino (L). Los resultados mostrados en la línea C son consistentes con aceptores orientados al lado citoplasmático (I), pero son proteínas periféricas pues se eliminan con el lavado (L). Los resultados mostrados en la línea D, representan aceptores que probablemente estén en el interior de las vesículas orientados hacia el lumen (END), pues no hace falta agregar galactosiltransferasa exógena para que se marquen. Son aparentemente integrales de membrana, pues no se eliminan con el lavado alcalino. Los resultados mostrados en la línea E, sugieren aceptores orientados hacia el lumen de las vesículas (P) y presentes en proteínas periféricas o del contenido pues pueden ser eliminadas lavando las membranas.

5.2.a. EL RETICULO ENDOPLASMICO CONTIENE EN SU MEMBRANA GLICOPROTEINAS INTRINSECAS CON ACEPTORES PARA GALACTOSA ORIENTADOS AL LADO CITOSOLICO.

Vesículas derivadas del retículo endoplásmico liso y rugoso, cerradas con igual orientación topográfica que in-vivo, fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal y cantidades saturantes de galactosil transferasa de leche bovina (sección 5.1.d.). Luego de centrifugar, las proteínas presentes en el precipitado fueron sometidas a PAGE-SDS, tal como se describe en la sección 5.1.e. En la fig. IX, líneas 2 y 6 se ve que varias glicoproteínas sirvieron de aceptores para galactosa radioactiva en vesículas cerradas del RER y REL. En las membranas de REL, las principales proteínasceptoras migraron, luego de ser galactosiladas, con un peso molecular aparente de 56 y 110 KD (línea 6). Proteínas con menor intensidad de marcación se detectaron en ambas fracciones con pesos moleculares aparentes de 46 y 72 KD. Mostraremos luego que estas glicoproteínas representan especies con N-acetilglucosamina terminal orientada hacia el lado citoplasmático de la membrana del retículo endoplásmico.

Cuando se repitió la incubación recientemente descrita, en ausencia de galactosiltransferasa exógena, no

se detectó transferencia de galactosa radioactiva a proteínas del RER (fig. IX, línea 1), ni del REL (fig. IX, línea 5). Este es el resultado esperado, pues aparentemente no existe transporte de UDP-Gal al lumen de vesículas derivadas del retículo endoplásmico, ni se han detectado galactosil transferasas endógenas en estas fracciones (Deutscher et al., 1984; Perez y Hirschberg, 1985).

Estas observaciones nos llevaron a concluir que las glicoproteínas mencionadas previamente contenían N-acetilglucosamina terminal orientada al lado citoplásmico. Esta conclusión se vió fortalecida por los siguientes hechos: a) luego de 10 min de incubación, la integridad de las vesículas permaneció mayor del 95% (medida por la latencia de la glucosa-6-fosfatasa hacia la manosa 6-fosfato); b) la galactosil transferasa exógena no puede acceder al lumen de las vesículas; c) por los experimentos descritos a continuación.

Fue importante descartar la posibilidad de que las glicoproteínas que estábamos describiendo representasen pequeñas cantidades de trozos de membranas de vesículas abiertas del retículo endoplásmico contaminando la preparación de vesículas intactas de la misma organela. Luego, vesículas del RER y REL fueron completamente permeabilizadas por sonicación. La latencia residual de glucosa-6-fosfatasa hacia la manosa 6-fosfato fue menos del 5%. Cuando estas membranas fueron marcadas con UDP-[¹⁴C]Gal

y galactosiltransferasa y luego sometidas a electroforesis como se describe en las secciones 5.1.d. y 5.1.e, se obtuvo el patrón de marcado observado en la fig. IX, líneas 3 y 7.

Las proteínas marcadas en vesículas intactas del RER y REL, también se marcaron con igual intensidad en esta preparación permeabilizada. Esto sugirió fuertemente que no existían proteínas en ese rango de peso molecular con N-acetilglucosamina terminal orientada al lado luminal de las vesículas. Una mejor cuantificación puede verse en la fig. IX A, donde se muestran distintas exposiciones de la placa radiográfica para las fracciones del REL.

También se observó que en otros pesos moleculares existen glicoproteínas con N-acetilglucosamina terminal que no se habían marcado con las vesículas cerradas, y luego de permeabilizarlas fueron accesibles al marcado con galactosa radioactiva. (fig. IX, líneas 3 y 7). Estas proteínas, casi seguramente tienen su N-acetilglucosamina terminal orientada al lado luminal de las vesículas y son similares en el RER y REL.

Los experimentos recientemente descritos permiten concluir que las proteínas marcadas en las vesículas intactas no representan contaminación de la preparación con vesículas rotas, pues el patrón de marcado de las vesículas abiertas es diferente y característico.

Creemos importante determinar si las glicoproteínas marcadas en vesículas intactas y

permeabilizadas eran integrales de la membrana. Para ello, luego de marcar preparaciones de membranas del RER y REL, estas fueron tratadas con carbonato de sodio a pH 11,5. Estas condiciones solubilizan el contenido vesicular y las proteínas periféricas de la membrana, mientras que las integrales permanecen en el precipitado (Fujiki et al., 1982). Estas proteínas del precipitado fueron sometidas a PAGE-SDS y autoradiografía. En la fig. IX, líneas 4 y 8, puede verse que el patrón de marcado de las glicoproteínas integrales de membrana es igual al observado con las vesículas intactas o permeabilizadas. Esto sugirió que todas las glicoproteínas marcadas radioactivamente en las fracciones del retículo endoplásmico eran integrales de membrana. En otro experimento se observó que prácticamente no existían aceptores para galactosa radioactiva en la fracción de proteínas periféricas y del contenido derivadas del RE.

Las fracciones de retículo endoplásmico utilizadas en los experimentos mostrados en la fig. IX, fueron obtenidas por el procedimiento descrito por Fleischer y Kervina (1974). Este método utiliza la propiedad de las vesículas del retículo endoplásmico rugoso de unirse al cesio, lo que resulta en su agregado y sedimentación más rápida. Para determinar si el método de obtención de las vesículas tuvo alguna influencia en los resultados obtenidos, preparamos vesículas de RER y REL por el método de Adelman et al. (1974). En este procedimiento las vesículas se separan según su comportamiento en

gradientes de sacarosa exclusivamente. Cuando vesículas intactas o permeabilizadas, obtenidas por este método, fueron sometidas al protocolo de marcación descrito para la fig. IX, se obtuvo un patrón de marcado prácticamente igual al observado en la fig. IX, líneas 2 y 6. (fig. X). Este resultado indicó que el patrón de marcado descrito no estuvo influenciado por el método utilizado para obtener las vesículas.

También nos interesó determinar si las diferencias de marcación evidenciadas en vesículas intactas del RER y REL se debían a que los ribosomas presentes en el retículo endoplásmico rugoso actuaban como impedimento estérico para el marcado de las glicoproteínas allí presentes. Para contestar esta pregunta eliminamos los ribosomas presentes en el RER mediante dos procedimientos: a) tratamiento con puromicina y KCl (Adelman et al., 1974), que permitió obtener una preparación donde la relación RNA/prot fue 0,089; y b) mediante tratamiento con carbonato pH 11,5 (Fujiki et al., 1982), donde la relación RNA/prot pasó a ser 0,092. Antes de los tratamientos la relación RNA/prot del RER era de 0,26; la obtenida después de ellos es cercana a la existente en el REL. Cuando las membranas libres de ribosomas fueron sometidas al protocolo de marcación, no se registró aumento de la incorporación de radioactividad a glicoproteínas del RER. Esto nos llevó a concluir que el bajo nivel de incorporación de galactosa radioactiva en las vesículas cerradas del RER se debía a un

bajo nivel de glicoproteínas con N-acetil glucosamina terminal, accesible del lado citoplasmático, y no a impedimento estérico por los ribosomas normalmente presentes en esa membrana.

5.2.b. LOS ACEPTORES PARA GALACTOSA ORIENTADOS HACIA EL LADO CITOSOLICO DE LAS VESICULAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO, NO ESTAN PRESENTES EN EL APARATO DE GOLGI.

Cuando se incuban vesículas cerradas derivadas del aparato de Golgi, con UDP-[¹⁴C]Gal y sin galactosil transferasa exógena, seguido por PAGE-SDS y autoradiografía, contrariamente a lo que ocurre en el retículo endoplásmico, varias glicoproteínas resultaron marcadas (fig. XI, línea 2). La glicoproteína más intensamente marcada en estas condiciones mostró una movilidad aparente similar a la glicoproteína de 56 KD que se marcó en vesículas intactas del REL, después del agregado de galactosil transferasa exógena. Debe tenerse en consideración que las glicoproteínas del aparato de Golgi se marcaron sin enzima exógena y por lo tanto es altamente probable que sean lumbinales. Este resultado evidencia el transporte de UDP-galactosa radioactiva al interior de las vesículas de Golgi y la posterior transferencia del azúcar a glicoproteínas endógenas contenidas en el lumen de la organela (Deutscher et al., 1984). Esta reacción es

catalizada por galactosiltransferasas endógenas, estas enzimas han sido utilizadas como marcadoras del Golgi.

El agregado de galactosiltransferasa exógena a la incubación de vesículas intactas de Golgi con UDP-Gal radioactivo no produjo cambio significativo en el patrón de marcación (fig. XI, línea 3 contra 2).

Luego quisimos observar el patrón de marcación de proteínas intrínsecas de membrana y periféricas (más contenido de Golgi), independientemente. Para ello las vesículas de Golgi fueron primero permeabilizadas con tritón X-100 al 0,1%, y luego marcadas con UDP- ^{14}C Gal y galactosiltransferasa (secciones 5.1.d). Luego la mezcla de reacción se diluyó 10 veces con EDTA 5 mM y carbonato de sodio 0,1 M pH 11,5. Después de dejar la suspensión en hielo durante 30 min, se centrifugó. El precipitado, conteniendo proteínas intrínsecas de membranas y el sobrenadante con las proteínas periféricas y del contenido, fueron sometidos separadamente a PAGE-SDS y autoradiografía. Como se muestra en la fig. XI, línea 6. la mayoría de las glicoproteínas con GlcNAc terminal estuvieron en la fracción de contenido y proteínas periféricas, mientras que solo una pequeña cantidad permaneció en la fracción de proteínas intrínsecas de membrana (línea 5).

También puede notarse que estas proteínas intrínsecas de la membrana del Golgi con GlcNAc terminal, muestran un patrón de marcado muy distinto que el de las

proteínas intrínsecas de la membrana del RER y REL (fig. IX, líneas 4 y 8). Estos resultados muestran que las glicoproteínas detectadas en el retículo endoplásmico liso y rugoso con N-acetilglucosamina orientada al citoplasma, no son el resultado de contaminación de la fracción con vesículas o membranas del aparato de Golgi.

5.2.c. LOS ACEPTORES PARA GALACTOSA ORIENTADOS HACIA EL LADO CITOSOLICO EN LAS VESICULAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO, NO ESTAN PRESENTES EN EL CITOPLASMA, LOS LISOSOMAS, LA MEMBRANA PLASMATICA O EL NUCLEO CELULAR.

Estuvimos interesados en determinar si las glicoproteínas con GlcNAc terminal observadas en vesículas cerradas del REL estaban presentes en el citosol, o en otras organelas. Para ello se realizó un estudio comparativo de distintas fracciones subcelulares. Los resultados se muestran en la fig. XII. Puede verse que una fracción enriquecida en lisosomas no contiene glicoproteínas con la misma movilidad y marcación radioactiva observada en las vesículas cerradas del REL (línea 2 contra 1).

Cuando se incubó una fracción de núcleos puros con UDP-Gal radioactiva y galactosil transferasa, seguida por PAGE-SDS y autorradiografía, se observó el perfil mostrado en la fig. XII, línea 3. La proteína más intensamente marcada migró con un peso molecular aparente

de 67 KD. Esta proteína con GlcNAc terminal, y también otras de distintos pesos moleculares habían sido observadas previamente por otros investigadores que examinaron núcleos y membranas nucleares por el mismo procedimiento (Davis y Blobel, 1986; Holt y Hart, 1986; Schindler et al., 1987; Holt et al., 1987; Snow et al., 1987; Finaly et al., 1987; y Hanover et al., 1987). Estas glicoproteínas son extrínsecas, pues pueden removerse con lavado salino.

Una fracción de membrana plasmática se separó primero en proteínas intrínsecas y extrínsecas de la membrana y luego se sometió al protocolo de marcado. En la fig. XII, líneas 4a y 4b, puede verse que ninguna de ambas fracciones contuvo proteínas con aceptores para galactosa en la región de los 56 KD, donde se observaron en las vesículas cerradas del REL. Se llegó a la misma conclusión luego de examinar la fracción citosólica (fig XII, línea 5).

Por lo tanto se concluyó que el patron de marcado del retículo endoplásmico, es propio de la organela y no proviene de contaminación con otras fracciones subcelulares.

5.2.d. RESUMEN

En este capítulo hemos visto que el retículo endoplásmico contiene glicoproteínas intrínsecas de membrana con N-acetilglucosamina terminal orientada al lado citoplasmático. La glicoproteína mas intensamente marcada en vesículas cerradas se encontró en el REL con un peso molecular aparente de 56 KD.

Estas glicoproteínas son propias del retículo endoplásmico y no representan contaminación de la fracción de vesículas intactas, con vesículas rotas de la misma organela, ni con membranas o vesículas de otras organelas, ni con proteínas citosólicas.

FIGURA VI

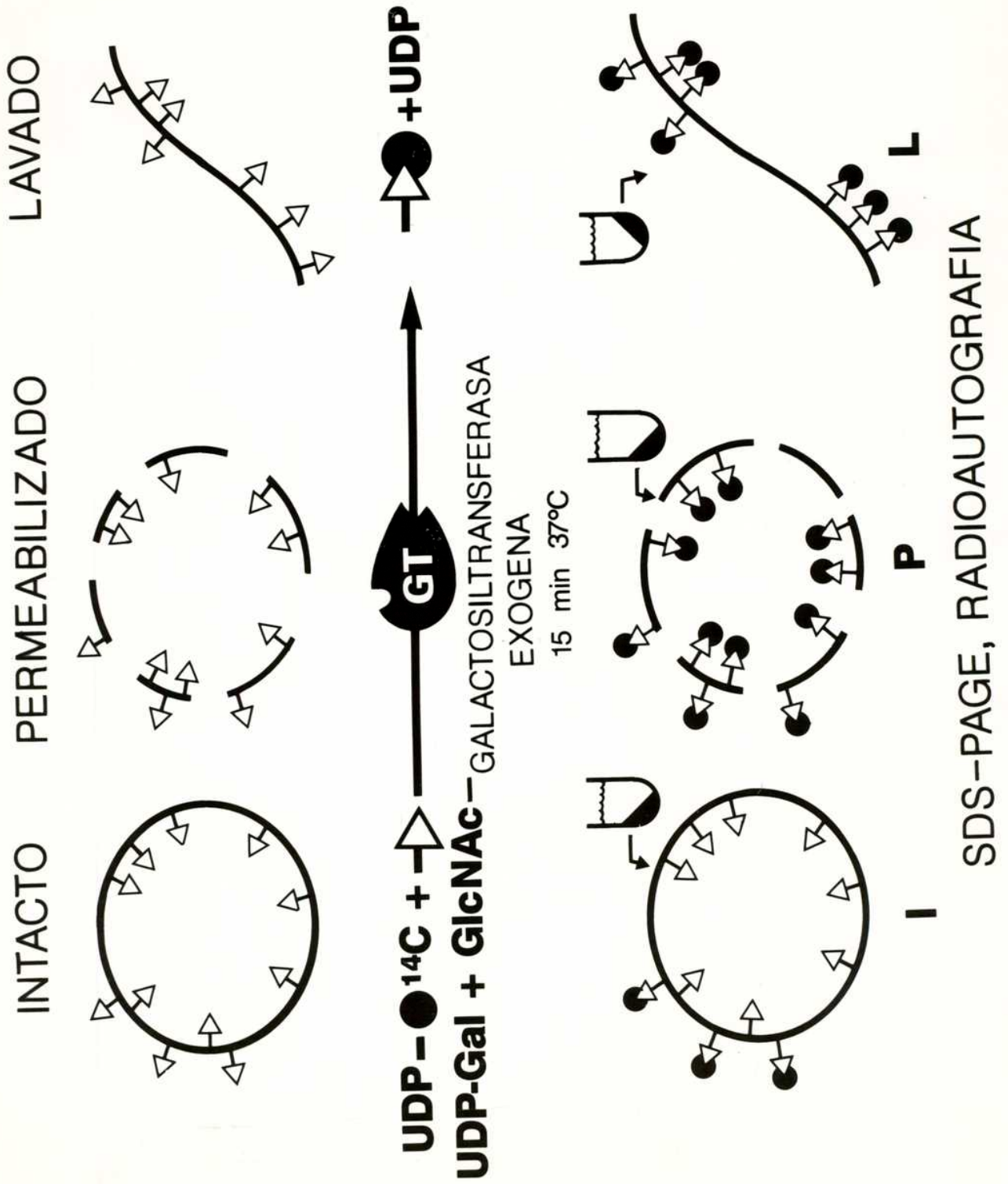


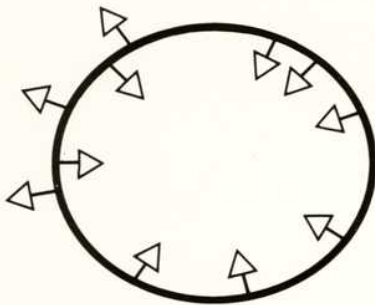
FIGURA VI

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Esquema mostrando el diseño experimental propuesto para detectar y establecer la topografía de los residuos N-acetilglucosamina terminal, aceptores de galactosa radioactiva.

FIGURA VII

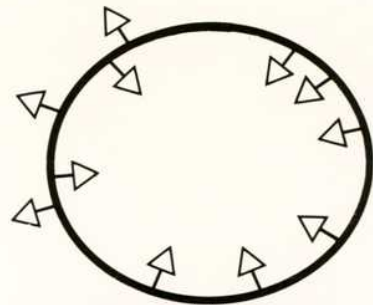
GAL-T
ENDOGENA



UDP-●¹⁴C

15 min -37°C

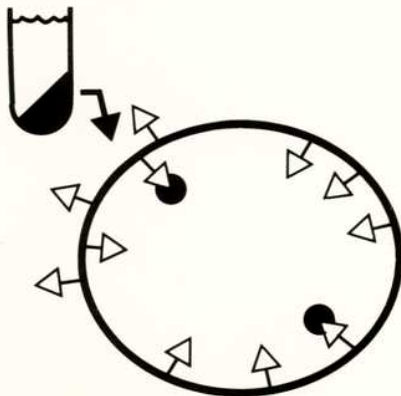
GAL-T
ENDOGENA
+
EXOGENA



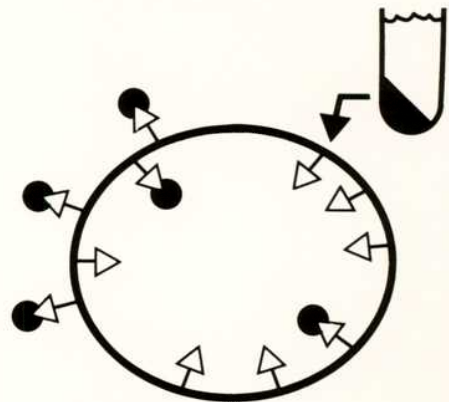
UDP-●¹⁴C

GT

15 min -37°C



End.



I

SDS-PAGE
AUTORADIOGRAFIA

FIGURA VII

CONTROL INDISPENSABLE PARA EL DISEÑO
EXPERIMENTAL PRESENTADO EN LA FIGURA VI.

Vesículas cerradas y topográficamente
equivalentes a la situación in-vivo, son incubadas con
UDP-[¹⁴C]Gal, con (I) o sin (END) galactosiltransferasa
exógena.

FIGURA VIII

SDS-PAGE RADIOAUTOGRAFIA

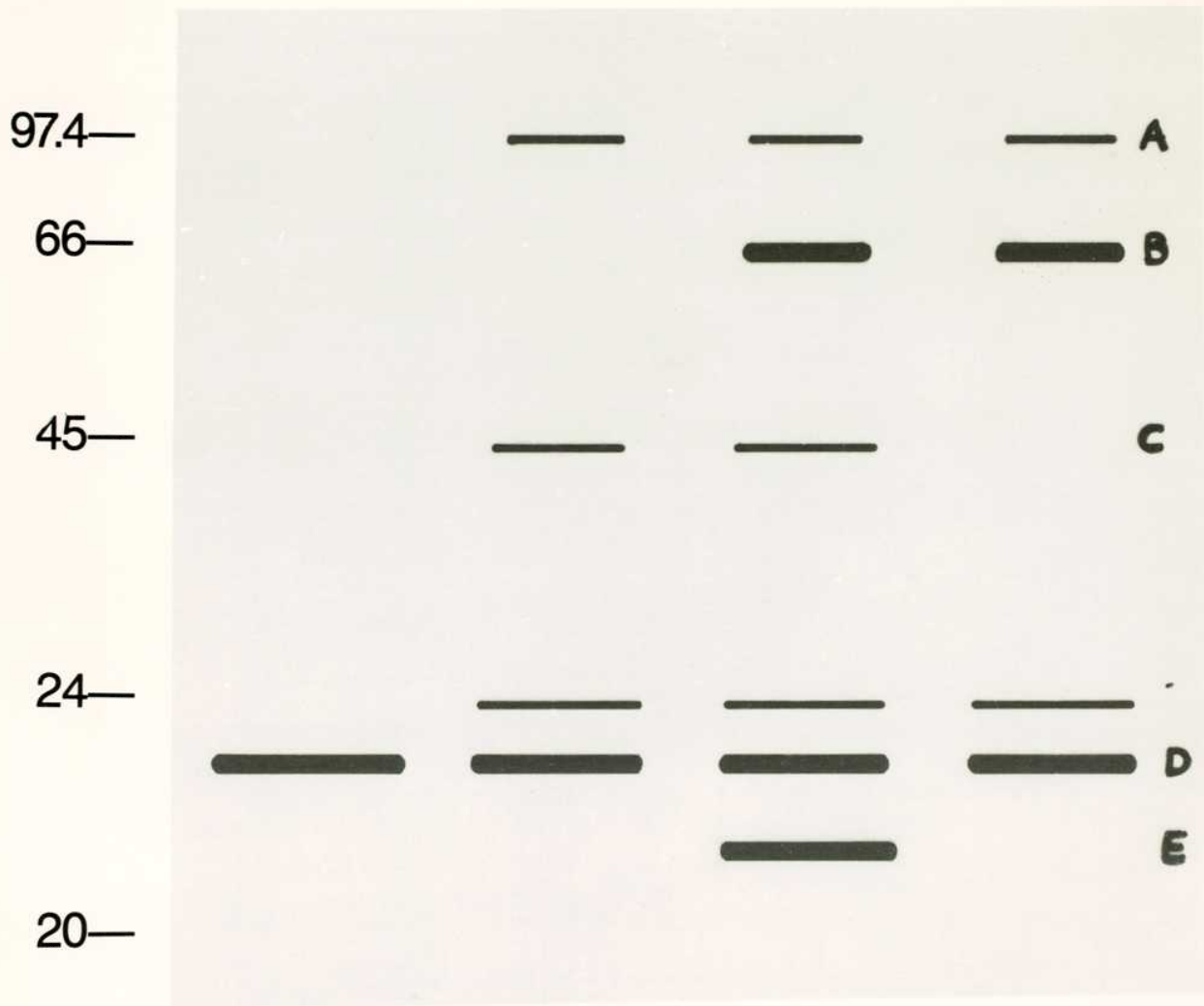
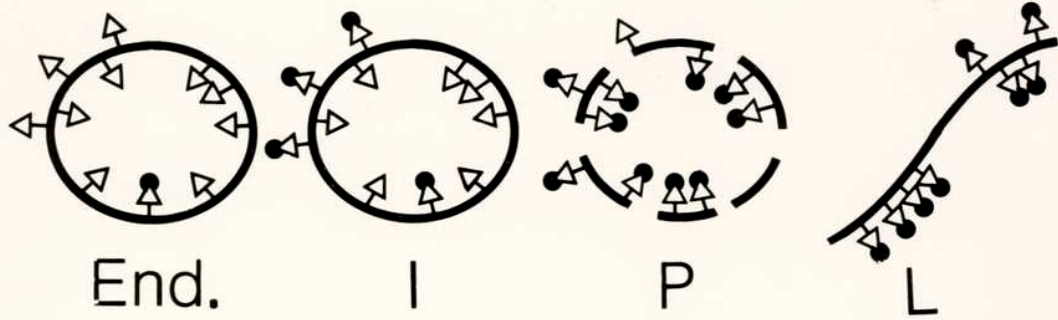


FIGURA VIII

HIPOTETICO PAGE-SDS-AUTORADIOGRAFIA.

Resultados posibles luego de los cuatro tipos de incubaciones presentados en las fig. VI y VII. END: endógeno, I: intacto, P: permeabilizado, L: lavado.

FIGURA IX

R E R

○ ○ ○ ↗

En. I P L

R E L

○ ○ ○ ↗

En. I P L

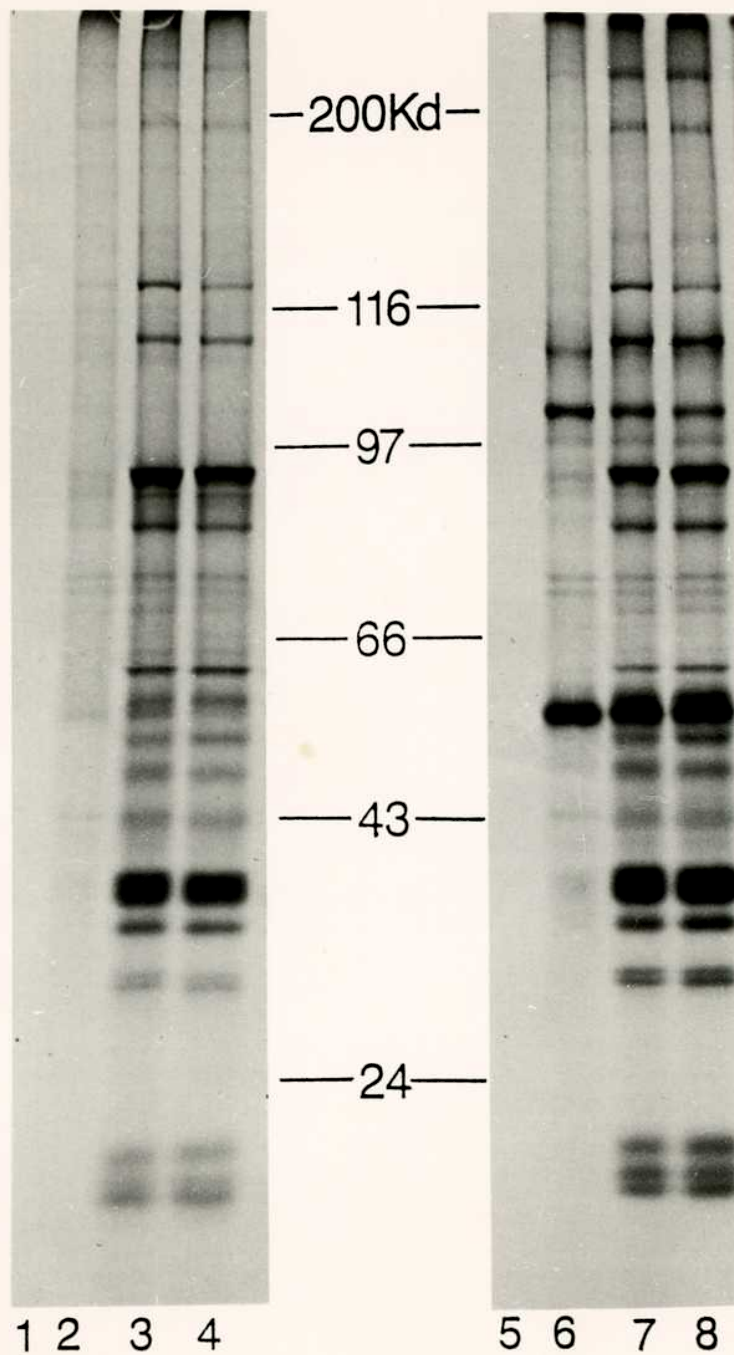
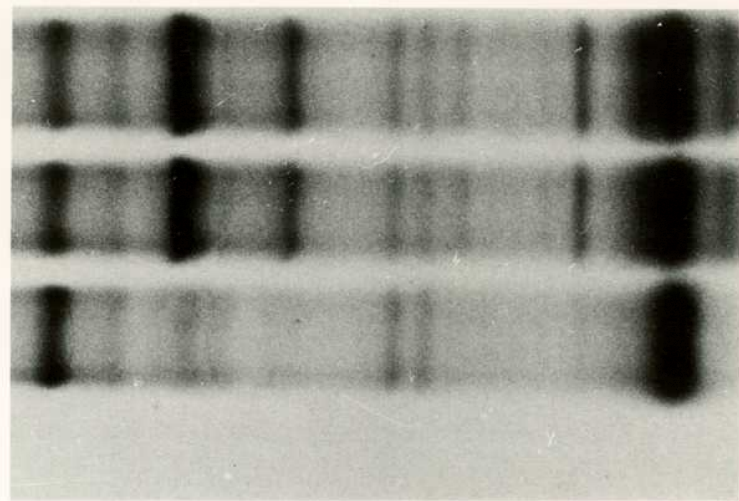


FIGURA IX

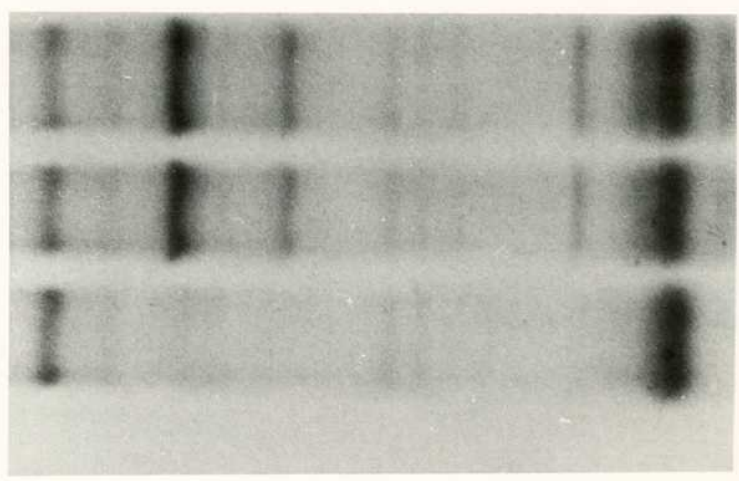
PAGE-SDS Y AUTORADIOGRAFIA DE PROTEINAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO INCUBADAS CON UDP-[¹⁴C]Gal.

Las membranas y vesículas fueron obtenidas de acuerdo a Fleischer y Kervina (1974). RER (líneas 1-4) y REL (líneas 5-8). Fracciones conteniendo vesículas cerradas, con correcta orientación topográfica, fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal en presencia (I= intactas, líneas 2 y 6), o ausencia (En= endógena, líneas 1 y 5), de galactosil transferasa de leche bovina, tal como se describe en la sección 5.1.d. Vesículas permeabilizadas fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal y galactosiltransferasa y centrifugadas (P= permeabilizado, líneas 3 y 7), o tratadas con carbonato, pH 11,5 y centrifugadas (L= membranas lavadas, líneas 4 y 8). Todas las líneas tienen 0,1 mg prot. Tiempo de exposición: 30 días.

En. I P L En. I P L



30d.



15d.

R E L

FIGURA IX-A

PAGE-SDS Y AUTORADIOGRAFIA DE FRACCIONES
DEL REL.

Mayor ampliación y distintos tiempos de exposición de la película autoradiográfica para la región entre 50 y 100 KD de la fig. IX, líneas 4-8. En= endógeno; I= intacto; P= permeabilizado; L= membranas lavadas. Tiempo de exposición: panel izquierdo, 15 días; panel derecho, 30 días.

FIGURA X

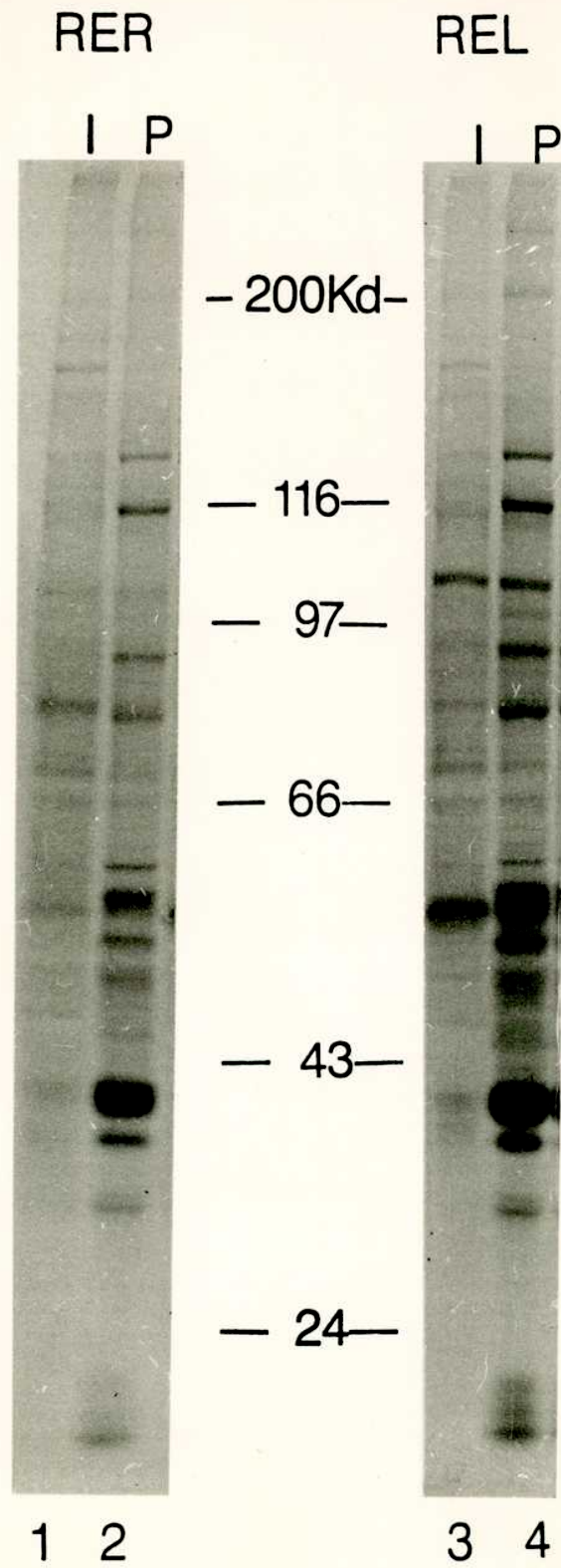


FIGURA X

PAGE-SDS Y AUTORADIOGRAFIA DE PROTEINAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO INCUBADAS CON UDP-[¹⁴C]Gal.

Las fracciones fueron obtenidas de acuerdo a Adelman et al. (1974). Vesículas cerradas con correcta orientación topográfica del RER (línea 1) y REL (línea 3), o vesículas permeabilizadas del RER (línea 2) y REL (línea 4), fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal y galactosil-transferasa, como se describe en la sección 5.1.d. Cada línea contiene 0,1 mg prot. Tiempo de exposición: 10 días.

FIGURA XI

GOLGI

G.T. En. I P Lp. Ls.

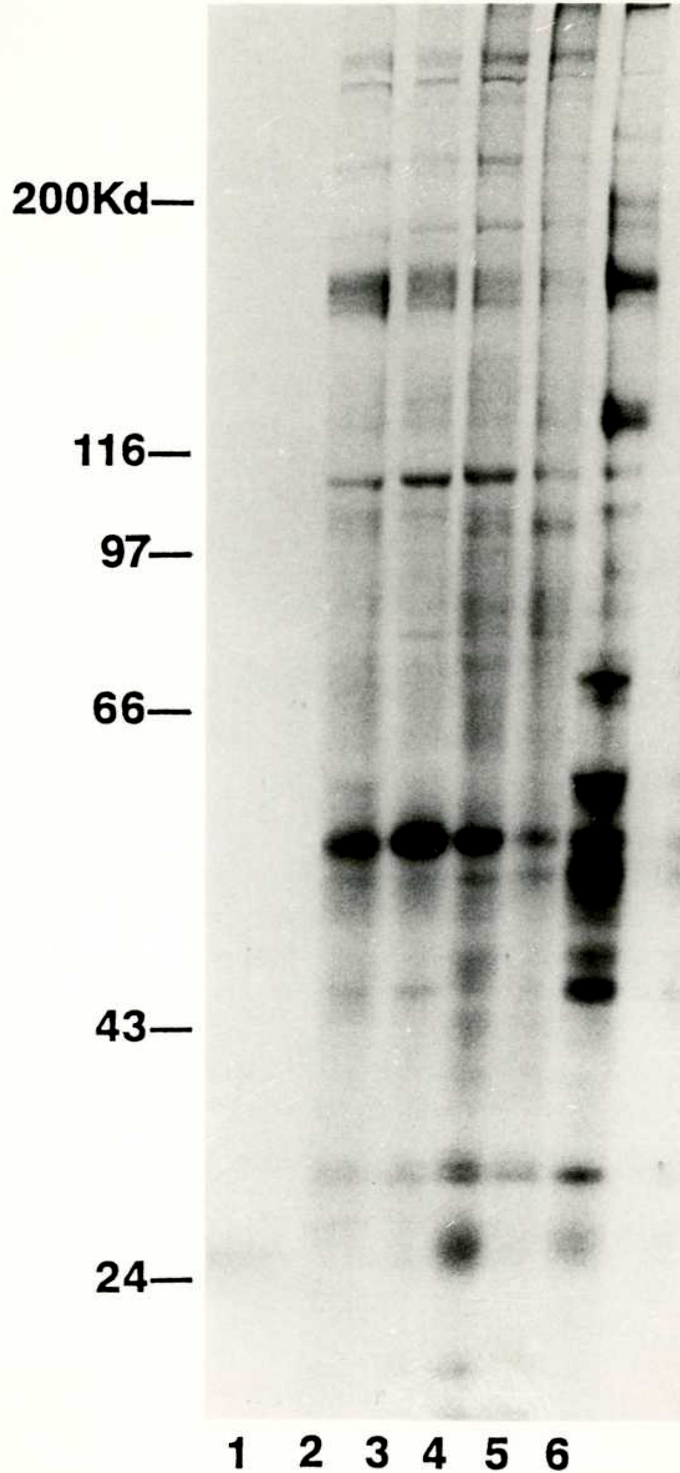


FIGURA XI

PAGE-SDS Y AUTORADIOGRAFIA DE PROTEINAS DEL APARATO DE GOLGI INCUBADAS CON UDP-[¹⁴C]Gal.

Vesículas intactas fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal sin (línea 2) o con (línea 3) galactosil transferasa de leche bovina como se describe en la sección 5.1.d. Vesículas permeabilizadas fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal y galactosiltransferasa y centrifugadas. El precipitado sin tratamiento (línea 4) o el precipitado (línea 5) y correspondiente sobrenadante (línea 6) luego de lavado con carbonato de sodio pH 11,5 fueron sometidos a electroforesis y autoradiografía. Línea 1: muestra de 0,15 unidades de galactosiltransferasa de la leche bovina (la misma cantidad usada en cada incubación con fracciones subcelulares) incubada con UDP-[¹⁴C]Gal. Las líneas 2-6 contienen 0,1 mg prot. Tiempo de exposición: 12 días.

FIGURA XII

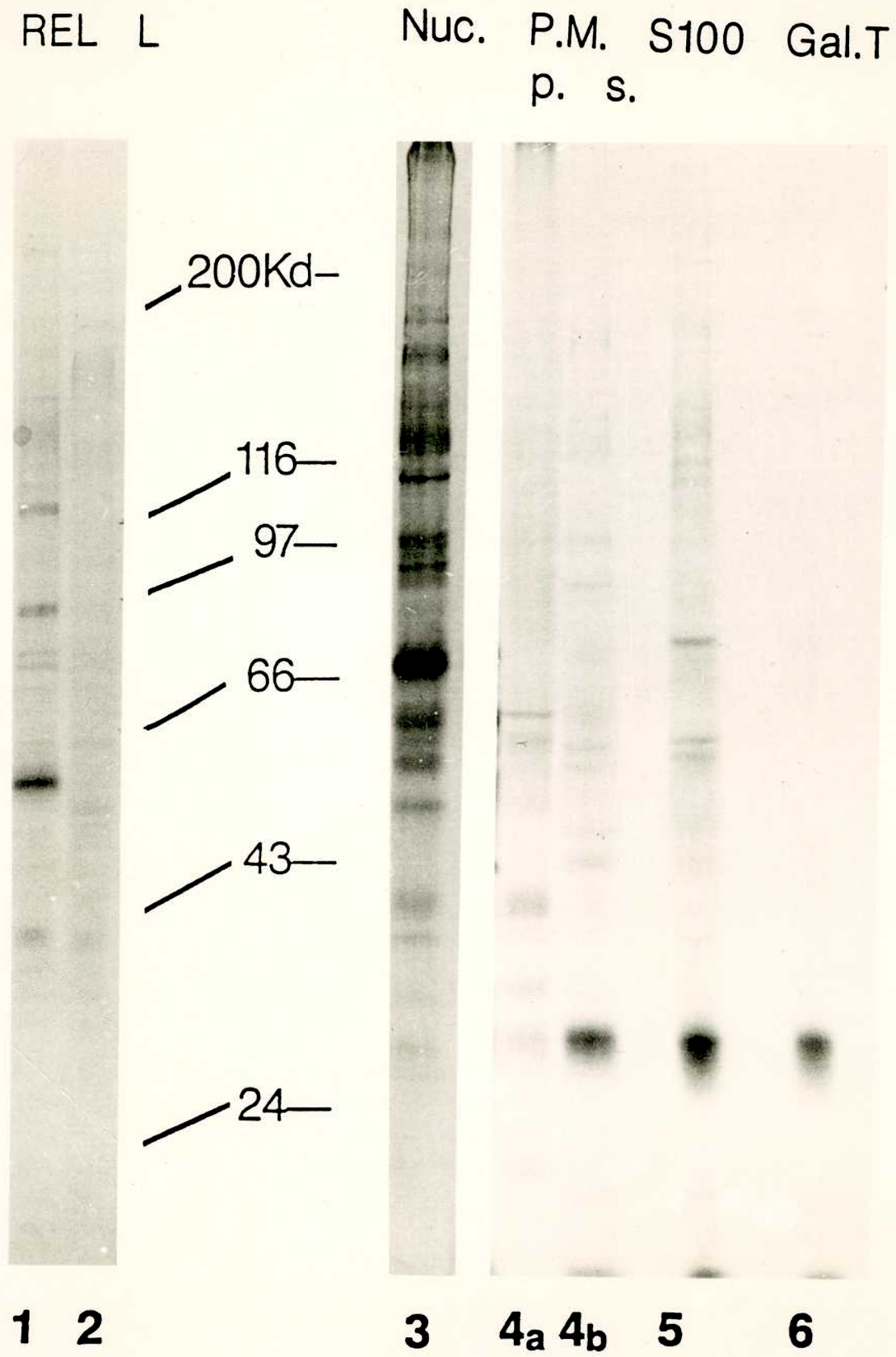


FIGURA XII

COMPUESTO DE PAGE-SDS Y RADIOAUTOGRAFIA DE
DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES DE HIGADO DE
RATA, INCUBADAS CON UDP-[¹⁴C]Gal Y GALACTOSIL
TRANSFERASA DE LECHE BOVINA.

Fracciones subcelulares (0,1 mg prot) fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal y galactosiltransferasa de leche bovina como se describe en la sección 5.1.d. Línea 1: vesículas cerradas del REL; Línea 2: membranas lisosomales; línea 3: núcleos; línea 4a: proteínas intrínsecas de la membrana plasmática; línea 4b: proteínas periféricas de la membrana plasmática; línea 5: fracción citoplasmática; línea 6: 0,15 unidades de galactosiltransferasa (la misma cantidad usada en cada incubación con fracciones subcelulares). Tiempo de exposición: líneas 1-2: 7 días; línea 3: 11 días; líneas 4-6: 9 días.

CAPITULO 6

DETERMINACION DEL TIPO DE UNION GLICOSIDICA ENTRE LA N-ACETILGLUCOSAMINA TERMINAL Y LAS PROTEINAS INTEGRALES DE LA MEMBRANA DEL RETICULO ENDOPLASMICO.

6.1. MATERIALES Y METODOS.

6.1.a. TRATAMIENTO CON LA ENZIMA PEPTIDO: N-GLICOSIDASA F.

Muestras conteniendo 0,1 mg prot fueron marcadas con UDP-[¹⁴C]Gal y galactosiltransferasa soluble, tal como se describe en la sección 5.1.d. Al final de la incubación se agregó SDS y 2-mercaptoetanol para dar una concentración final de 0,5% y 0,1 M respectivamente. Las muestras fueron hervidas por 3 min y diluidas a una concentración final de SDS al 0,15%, fosfato de sodio 0,2 M pH 8,6; 1,10 hidrato de fenantrolina 10 mM (un inhibidor de proteasas); y NP-40 al 1,25% (un detergente no iónico). Luego de agregaron 10 unidades por mililitro de péptido: N-glicosidasa F (N-glicanasa, Genzyme), y las muestras

fueron incubadas a 37 grados C. durante 15 h. Los controles recibieron igual tratamiento pero sin agregar enzima.

Al final de la incubación, las proteínas fueron precipitadas por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto, helado. Luego, las muestras se mantuvieron a -20 grados C. por 30 min y se centrifugaron en una microcentrifuga Eppendorf por 15 min. Los precipitados se disolvieron en 0,015 ml de buffer PSM y 0,04 ml de sacarosa 0,25 M y se los sometió a PAGE-SDS, tal como se describe en la sección 5.1.e.

6.1.b. ANALISIS DE LA UNION ENTRE LA PROTEINA Y EL OLIGOSACARIDO: REACCION DE BETA-ELIMINACION.

Vesículas intactas derivadas del REL (10 muestras, cada una conteniendo 0,1 mg prot), fueron marcadas con UDP-[¹⁴C]Gal y galactosiltransferasa, como se describe en la sección 5.1.d. y luego sometidas a PAGE-SDS (sección 5.1.e.) en 10 líneas. Luego de la electroforesis, el gel fue secado y expuesto a la placa radioautográfica para permitir la identificación de las proteínas radioactivamente marcadas. La proteína migrando a 56 KD fue cortada del gel y los trozos de gel se sometieron a tratamiento con borohidruro alcalino del modo descrito por Schindler et al. (1987). Brevemente, cada trozo de gel, con aproximadamente 6.000 cpm fue incubado

con 3 ml de NaOH 0,05 M; borohidruro de sodio 1M a 50 grados C. por 17 h. Las muestras fueron luego centrifugadas a 100.000 G y los sobrenadantes removidos, colocados sobre hielo y titulados a pH 4 con ácido acético para destruir el exceso de borohidruro. El 86% de la radioactividad fue recuperada en la fracción sobrenadante. La mezcla fue luego procesada como describió Spiro (1972), para eliminar el borato de sodio.

6.1.c. PROCEDIMIENTOS CROMATOGRÁFICOS.

El material recuperado luego del tratamiento con borohidruro alcalino, se resuspendió en bicarbonato de amonio 0,1 M y se cromatografió en una columna de Bio Gel P 4 (Bio Rad, 200-400 mesh). La columna (1,5 x 90 cm), fue calibrada usando citocromo C como marcador del volumen de elución y galactosa tritiada como marcadora del volumen incluido. Se juntaron fracciones de 1 ml y un décimo de cada una se utilizó para contar la radioactividad por centelleo líquido. Las fracciones del pico radioactivo, que eluyó en la posición de un disacárido, fueron juntadas y liofilizadas.

Luego se completo la caracterización de este material en cromatografía descendente en papel Whatman 1MM, durante 60 h. El solvente fue 1-butanol: piridina: agua (6:4:3). Tiras de un centímetro fueron cortadas para cuantificar la radioactividad por centelleo líquido.

Los estándares no radioactivos se visualizaron por tinción con nitrato de plata alcalino.

La migración del disacárido radioactivo se comparó con la de los disacáridos sintéticos, Gal-beta 1-4 N-acetilglucosaminitol, Gal-beta 1-3 N-acetilglucosaminitol, Gal-beta 1-4 N-acetilgalactosaminitol, y Gal-beta 1-3 N-acetilgalactosaminitol (generosamente provistos por el Dr. K. Matta, Rosewell Park Memorial Institute, Buffalo, NY).

6.1.d. CUANTIFICACION DE RADIOACTIVIDAD.

La radioactividad presente en las muestras se determinó por centelleo líquido usando un contador Tracor Analytic 92. Muestras acuosas de 1 ml se mezclaron con 9 ml de Aquasol-II (Du Pont-NEN). El quenching fue corregido por el método del estándar interno.

CAPITULO 6

DETERMINACION DEL TIPO DE UNION GLICOSIDICA
ENTRE LA N-ACETILGLUCOSAMINA TERMINAL Y LAS
PROTEINAS INTEGRALES DE LA MEMBRANA DEL
RETICULO ENDOPLASMICO.

6.2. RESULTADOS.

Los estudios previos presentados en el capítulo 5, sugirieron fuertemente que en vesículas intactas del retículo endoplásmico liso, galactosa había sido unida en enlace beta 1-4 a una glicoproteína intrínseca de membrana con peso molecular aparente de 56 KD, con N-acetilglucosamina orientada hacia el lado citoplasmático. Consideramos importante obtener evidencia directa de este enlace entre la galactosa y la N-acetilglucosamina. También quisimos determinar si este último azúcar estaba unido directamente al polipéptido y si el enlace era N u O glicosídico.

Para responder estas preguntas utilizamos dos estrategias complementarias: a) determinar la susceptibilidad de la proteína galactosilada a tratamiento con péptido: N-glicosidasa F; y b) someter la glicoproteína marcada a beta eliminación y analizar el producto liberado, si lo hubiera.

6.2.a. LA PROTEINA GALACTOSILADA DE 56 KD DEL
REL, ES RESISTENTE A TRATAMIENTO CON
PEPTIDO: N-GLICOSIDASA F.

La péptido: N-glicosidasa F es una endoglicosidasa que hidroliza oligosácaridos unidos a asparagina del tipo complejo, híbrido o rico en manosa, entre la asparagina y la N-acetilglucosamina (Tarentino et al., 1985).

Vesículas cerradas, con correcta orientación topográfica provenientes del retículo endoplásmico liso, fueron incubadas con UDP-[¹⁴C]Gal y galactosiltransferasa. Las proteínas fueron desnaturalizadas, tratadas con péptido: N-glicosidasa F y sometidas a PAGE-SDS y autoradiografía. La glicoproteína de 56 KD no fue alterada por el tratamiento con la enzima (línea 1 contra 2, fig. XIII), sugiriendo que esta glicoproteína no contiene azúcares con enlace N-glicosídico. Se obtuvo evidencia de que la N-glicosidasa F permaneció activa durante la incubación, examinando las impurezas proteicas galactosiladas presentes en la preparación de galactosiltransferasa y que migraron en la región de 30 KD. Aunque la enzima fue extensivamente autogalactosilada usando UDP-Gal no radioactiva (sección 5.1.c.), unas pocas impurezas proteicas, capaces de aceptar galactosa radioactiva

permanecieron en la zona de 30 KD. La galactosiltransferasa de la leche bovina tiene dos formas moleculares, con pesos moleculares aparentes de 43 y 58 KD (Magee et al., 1974).

La muestra de REL tratada con N-glicosidasa F (línea 2, fig. XIII), contuvo menos radioactividad en la zona de 30 KD que el control (línea 1, fig. XIII) y que aquella donde se muestra la preparación de galactosiltransferasa sola (línea 3, fig. XIII), en igual cantidad que la usada para marcar las proteínas del REL.

Este resultado sugiere fuertemente que los carbohidratos de las impurezas proteicas en la preparación de galactosiltransferasa estaban unidos por enlace N-glicosídico y que la N-glicosidasa F se mantuvo activa en la incubación donde la glicoproteína de 56 KD permaneció inalterada.

Cuando vesículas permeabilizadas del REL se marcaron del mismo modo descrito en esta sección para las vesículas intactas, y luego se trataron con péptido: N-glicosidasa F, se encontró que la mayoría de las glicoproteínas aceptoras de galactosa fueron resistentes al tratamiento. Esto sugirió la presencia de O-GlcNAc de ambos lados de la membrana del retículo endoplásmico.

6.2.b. LA PROTEINA GALACTOSILADA DE 56 KD
DEL REL, CONTIENE O-GlcNAC ORIENTADA AL
LADO CITOPLASMATICO.

El hecho de que la glicoproteína galactosilada de 56 KD del REL se mostrara resistente al tratamiento con N-glicosidasa F, sugirió fuertemente que la unión entre carbohidrato y proteína era de tipo O-glicosídico. Nosotros deseamos obtener evidencia directa para el tipo de enlace. La zona de un gel preparativo correspondiente a la proteína de 56 KD marcada con galactosa radioactiva, fue cortada y sometida a beta eliminación tal como se describe en la sección 6.1.b. Este procedimiento solubilizó el 86% de la radioactividad indicando que el azúcar estaba unido por enlace O-glicosídico al esqueleto polipeptídico.

Luego se procedió a caracterizar el producto radioactivo solubilizado. Se eliminaron las sales, tal como describió Spiro (1972), y se aplicó el producto a una columna de Biogel P4 (tal como se describe en la sección 6.1.c.). El material radioactivo eluyó de la columna como un solo pico simétrico, en la posición en que aparecen los disacáridos. Este pico radioactivo fue juntado, liofilizado y caracterizado más precisamente por cromatografía descendente en papel, tal como se describe en la sección 6.1.c.

Como puede verse en la fig. XIV, la radioactividad comigró como un único pico con auténtico Gal beta 1-4 N-acetilglucosaminitol y no con auténtico Gal beta 1-3 N-acetilglucosaminitol, Gal beta 1-4 N-acetilgalactosaminitol o Gal beta 1-3 N-acetilgalactosaminitol.

Se concluyó que la galactosiltransferasa había unido galactosa radioactiva en enlace beta 1-4 a la N-acetilglucosamina terminal presente en la proteína de 56 KD del REL. Este resultado está de acuerdo con la conocida especificidad de la galactosiltransferasa de la leche bovina.

6.2.c. RESUMEN.

En su conjunto, los resultados presentados en este capítulo muestran que la glicoproteína integral de membrana de 56 KD del retículo endoplásmico liso, contiene N-acetilglucosamina terminal, unida al polipéptido por enlace O-glicosídico, expuesta en la cara citoplasmática de las vesículas. La mayoría de las proteínas con GlcNAc terminal (expuestas al lado luminal o citoplasmático), se encontraron resistentes al tratamiento con péptido N-glicosidasa F.

FIGURA XIII

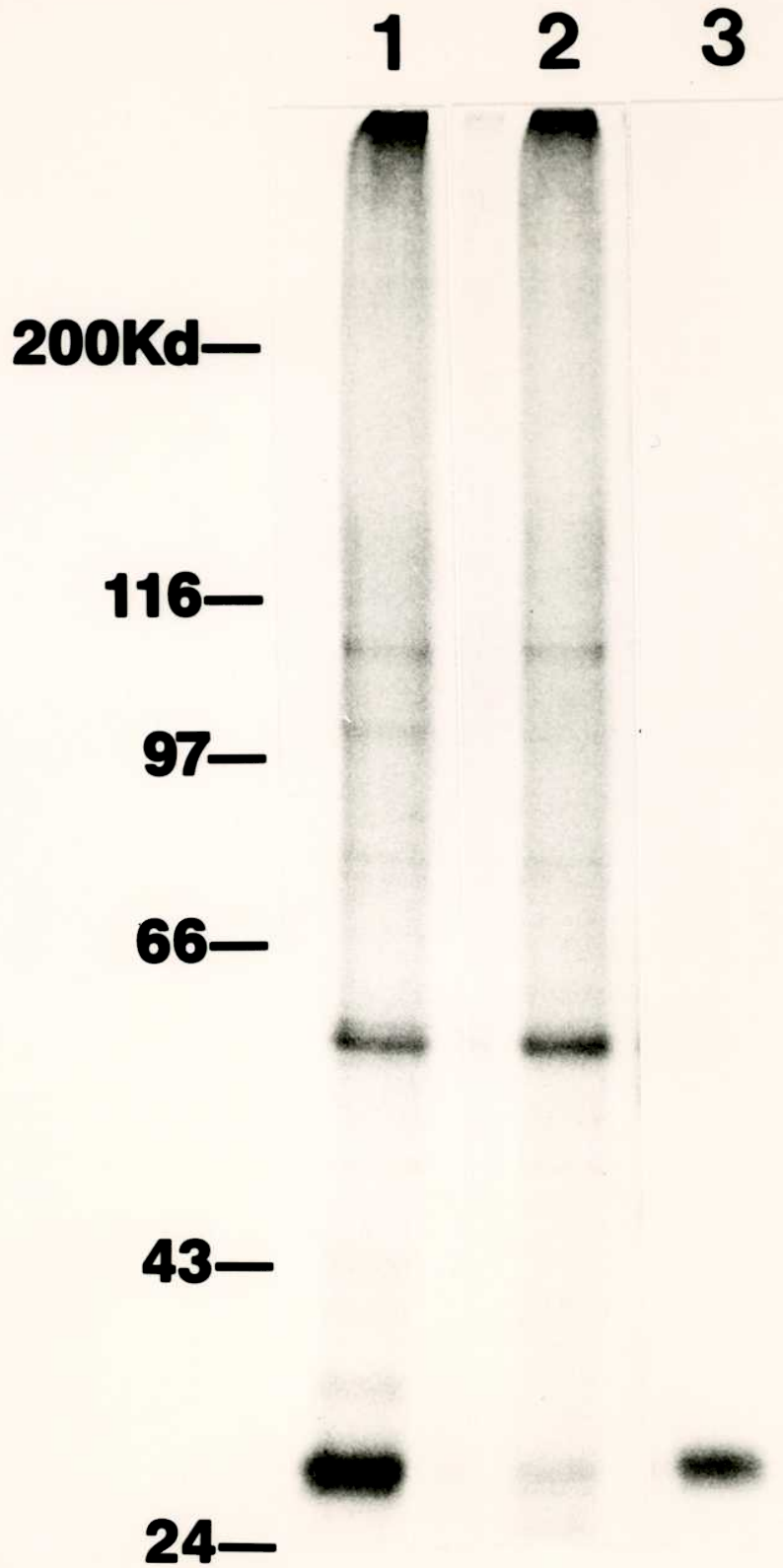


FIGURA XIII

TRATAMIENTO CON PEPTIDO: N-GLICOSIDASA F DE
VESICULAS CERRADAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO
LISO INCUBADAS CON UDP-[¹⁴C]Gal Y GALACTOSIL
TRANSFERASA DE LECHE BOVINA.

Proteínas marcadas (0,1 mg) fueron incubadas sin (línea 1) o con (línea 2) péptido: N-glicosidasa F como se describe en la sección 6.1.a. Las muestras fueron luego sometidas a PAGE-SDS y autoradiografiadas. La línea 3 contiene 0,15 unidades de galactosil transferasa incubada con UDP-[¹⁴C]gal. Tiempo de exposición: 10 días.

FIGURA XIV

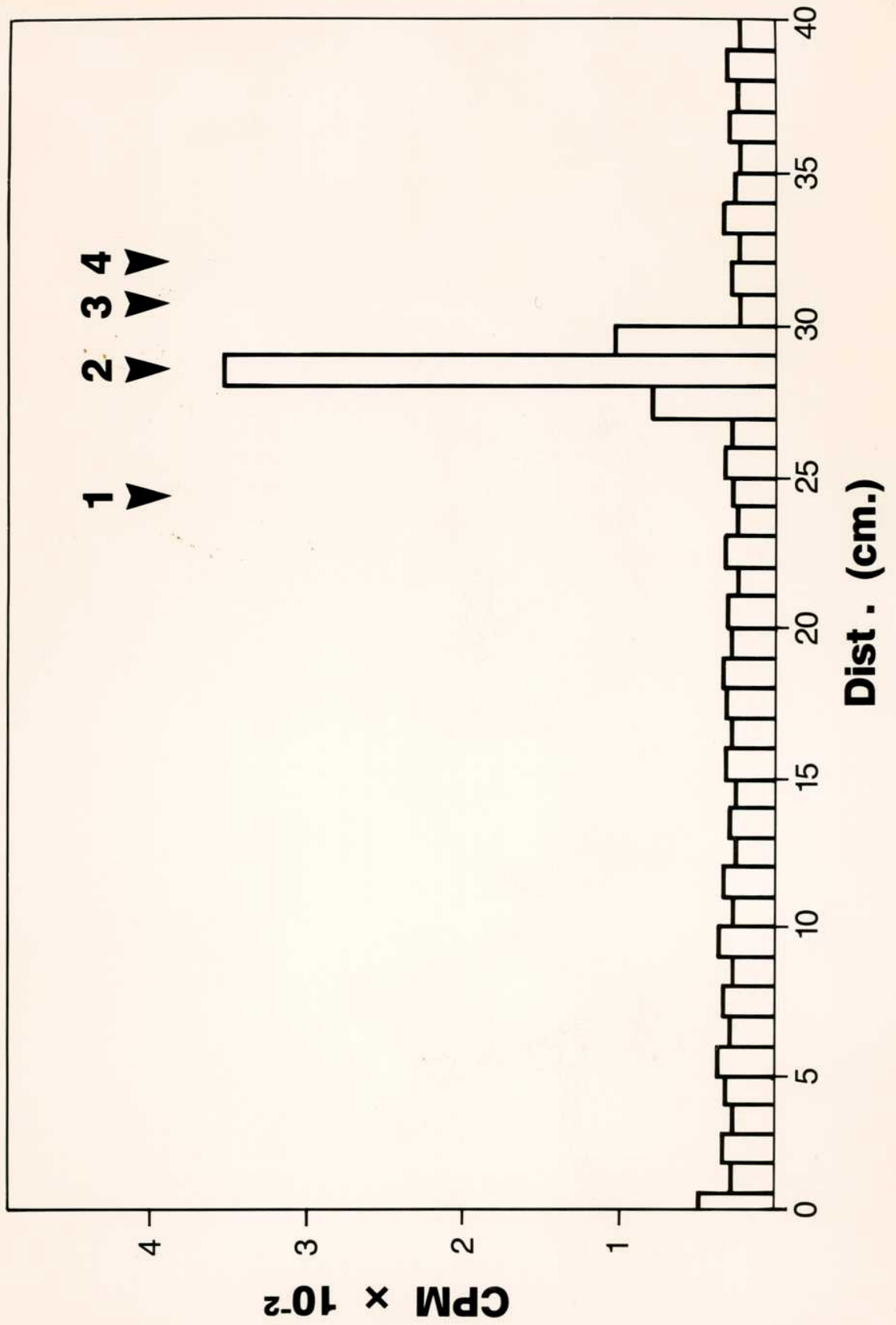


FIGURA XIV

CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL, DEL
DISACARIDO CONTENIENDO [^{14}C]Gal OBTENIDO
A PARTIR DE LA PROTEINA DE 56 KD DE
LA FIG. IX, LINEA 6.

La zona del gel con la proteína marcada radioactivamente fue cortada y sometida a beta-eliminación y cromatografía en Bio Gel P4 como se describe en las secciones 6.1.b y 6.1.c. La cromatografía descendente fue realizada con papel Whatman 1 MM con un sistema de solventes conteniendo n-butanol:piridina:agua (60:40:30) durante 60 h a temperatura ambiente. Se cortaron tiras de un cm para determinar la radioactividad por centelleo líquido. Los estándares fueron los siguientes: 1: Gal beta 1-3 N-acetilgalactosaminitol; 2: Gal beta 1-4 N-acetilglucosaminitol; 3: Gal beta 1-3 N-acetilglucosaminitol; 4: Gal beta 1-4 N-acetilgalactosaminitol.

CAPITULO 7

DISCUSION, CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS

7.1. INICIACION DE LA O-GLICOSILACION (TIPO MUCINA)

Este trabajo ha mostrado que en el hígado de rata, la actividad específica de la enzima responsable de la iniciación de las cadenas O-glicosídicas tipo mucina, la polipéptido: GalNAC transferasa, es por lo menos 36 veces más alta en membranas derivadas del aparato de Golgi que en el homogenato celular total. La recuperación de la actividad de la GalNAC transferasa en la fracción de Golgi, fue muy similar a la de la sialiltransferasa. Como la sialiltransferasa es una enzima marcadora característica del aparato de Golgi, podemos concluir tentativamente que en el hígado de rata, la polipéptido: GalNAC transferasa es una enzima exclusiva del aparato de Golgi. Esta conclusión no implica que ambas enzimas estén localizadas en la misma región del aparato de Golgi.

Nuestros resultados estan de acuerdo con un reciente estudio citoquímico que localiza los residuos de N-acetilgalactosamina en compartimentos celulares por

microscopía electrónica (Roth, 1984). En este estudio la lectina de Helix pomatia, marcada con oro coloidal, fue utilizada para detectar N-acetilgalactosamina terminal, no reductora, en células de la mucosa intestinal. Esta lectina tiene un sitio de unión que puede detectar una única molécula de N-acetilgalactosamina presente unida al polipéptido en el extremo no reductor de una cadena hidrocarbonada. Con ella no se detectó marcación en el retículo endoplásmico rugoso, ni liso, ni en la membrana nuclear. Si, se detectó fuerte tinción en las cisternas cis y trans del aparato de Golgi. Estos datos se interpretaron como indicando que la O-glicosilación con GalNAc, se inicia en la zona cis del Golgi, y no en el retículo endoplásmico. La sialiltransferasa y los residuos de ácido siálico fueron ubicados en otro sitio, dentro del Golgi (Roth et al., 1986).

Elhammer y Kornfeld (1984) estudiaron la distribución subcelular de la polipéptido: GalNAc transferasa y de la transferasa implicada en el segundo paso de la síntesis de la cadena O-glicosídica, la GalNAc-beta 1-3 galactosiltransferasa, fraccionando membranas microsomales totales de células de linfoma de ratón en gradientes lineales de sacarosa. Ellos encontraron que estas dos glicosiltransferasas estaban presentes en membranas de diferentes densidades. La galactosiltransferasa responsable de elongar las cadenas O-glicosídicas se distribuyó conjuntamente con otra galactosiltransferasa actuante en la

N-glicosilación y por lo tanto se asumió que residía en la región trans del Golgi.

La polipéptido: GalNAC transferasa fue hallada en una fracción de densidad intermedia entre las galactosil transferasas del trans Golgi y las glucosidasas I y II, marcadoras del retículo endoplásmico. El sistema empleado no les permitió discriminar si se encontraba en el cis Golgi o en el retículo endoplasmico liso.

Nosotros no detectamos, en hígado de rata, actividad de la polipéptido: GalNAC transferasa en el retículo endoplásmico liso, ni en el rugoso. Consistentemente con este hecho tampoco detectamos transferencia de GalNAC a aceptores macromoleculares endógenos luego de incubar vesículas del RER y REL con UDP-GalNAC marcada radioactivamente en el azúcar, aunque estas vesículas fueron capaces de transportar el nucleótido azúcar a su interior (tabla IX).

Encontramos que la polipéptido: GalNAC transferasa localizada en el aparato de Golgi tiene su sitio activo orientado al lumen de las vesículas (tabla III). Este estudio ha mostrado también que las vesículas derivadas del aparato de Golgi son capaces de transportar UDP-GalNAC desde el medio de incubación, hacia su lumen, en un ensayo in-vitro, a una velocidad 4 a 6 veces mayor que las vesículas derivadas del RER o REL.

La caracterización de células CHO mutantes ha revelado que el transporte de nucleótidos azúcar al

interior de vesículas de Golgi in-vitro, tiene importancia fisiológica. Deutscher et al. (1984) mostraron que el defecto primario de la línea celular mutante Lec 2, aislada por P. Stanley (1980), era su inhabilidad de transportar CMP-AcNeu al interior del aparato de Golgi. Las células Lec 2 tienen 10 veces menos ácido siálico en sus glicoproteínas y glicolípidos que el fenotipo silvestre, aunque sus niveles de CMP-AcNeu, actividad de sialiltransferasas y composición de aceptores endógenos es muy similar al fenotipo silvestre. Se demostró que las vesículas de Golgi aisladas de Lec 2, transportaban CMP-ácido siálico a solo el 2% de la velocidad observada en las vesículas derivadas de las células no mutadas. No obstante la velocidad de transporte de PAPS, UDP-GalNac y UDP-Gal, fue comparable en ambas líneas celulares sugiriendo un defecto específico.

En este estudio mostramos que el transporte UDP-GalNac al interior de vesículas del Golgi, es dependiente de la temperatura y saturable a altas concentraciones de sustrato con un KM aparente de 8-10 micromolar. Utilizando UDP-GalNac marcada con diferentes radioisótopos en la uridina y en el azúcar pudimos concluir que es el nucleótido azúcar entero la especie transportada hacia el lumen del Golgi, y no sus productos de ruptura (tabla V). El nucleótido azúcar entero fue detectado en el lumen del Golgi, donde estaba concentrado aproximadamente 100 veces con respecto al medio de reacción (tabla VI).

También obtuvimos evidencia de transferencia de GalNAC a aceptores macromoleculares endógenos luego del transporte de UDP-GalNAC al lumen del Golgi. Cuando las vesículas de Golgi se pretrataron con Tritón X-100 al 0,1%, ellas perdieron la capacidad de concentrar solutos en su interior y la transferencia de GalNAC a aceptores endógenos disminuyó en un 85% (tabla X).

También obtuvimos evidencia preliminar sugiriendo que el mecanismo de entrada de UDP-GalNAC al lumen del aparato de Golgi es a través de un intercambio acoplado con la salida de UMP luminal (tabla VII) de manera análoga a otros nucleótidos azúcar (Capasso y Hirschberg, 1984).

La demostración de la existencia de un mecanismo de transporte de UDP-GalNAC del lado citosólico al luminal de las vesículas derivadas del aparato de Golgi, resuelve un importante problema topológico. Este problema se planteaba porque la UDP-GalNAC es sintetizada en el citosol (Turnquist et al., 1974; Coates et al., 1980) y las glicosiltansferasas de las que es sustrato son luminales.

La caracterización previa de una línea celular mutante CHO, cuyas vesículas de Golgi fueron incapaces de transportar UDP-Gal pero fueron activas en el transporte de UDP-GlcNAC y UDP-GalNAC (Deutscher y Hirschberg, 1986), sugiere que los distintos nucleótidos azúcar que contienen uridina son translocados por proteínas transportadoras individuales.

Estos estudios en hígado de rata, junto con

otros previos en el mismo tejido relativos a la adición de xilosa al esqueleto proteico de los glicosaminoglicanos (Nuwayhid et al., 1986), favorecen fuertemente la hipótesis de que la mayoría de las reacciones de O-glicosilación en el hígado de rata, ocurren en el aparato de Golgi y no en el RER o REL. Esta conclusión esta de acuerdo con otros estudios en oviducto de gallina y células de linfoma de ratón en los que la polipéptido: GalNac transferasa se encontró en fracciones diferentes de las que contenían enzimas marcadoras del RER (Niemann et al., 1982; Johnson y Spear, 1983). Además, estudios cinéticos han sugerido que la O-glicosilación ocurre en el aparato de Golgi y no en el RER, pero el rol posible del REL era equívoco (White y Speake, 1980; Hanover et al., 1980; Niemann et al., 1982; Cummings et al., 1983; Shida y Matsumoto, 1983; Kimura et al., 1984; Lohmander et al., 1986; Jokinen et al., 1985).

La ausencia de una estricta correlación entre la actividad translocadora de UDP-GalNac y la actividad de la polipéptido: GalNac transferasa en los distintos compartimientos subcelulares merece atención. Se halló una cantidad pequeña pero significativa de transporte UDP-GalNac en membranas del RER y REL donde no se halló actividad de la transferasa con aceptores endógenos ni exógenos. La posibilidad de que la UDP-GalNac estuviera entrando al lumen de las vesículas del retículo endoplásmico por un transportador de otro nucleótido azúcar derivado de uridina

parece remota en vista de la especificidad hallada en la línea CHO mutante incapaz de transportar UDP-Gal (Deutscher y Hirschberg, 1986). Como previamente mencionáramos, este mutante transportó normalmente otros nucleótidos azúcar derivados de la uridina.

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de enlace O-glicosídico, O-N-acetilglucosamina (Torres y Hart, 1984; Holt y Hart, 1986; Schindler et al., 1987). Las glicoproteínas con este enlace aparentan estar presentes en varias organelas. Existe evidencia preliminar que el azúcar podría estar orientado hacia el citoplasma en proteínas extrínsecas de la membrana nuclear, en la región del poro nuclear (Davis y Blobel, 1986; Holt et al., 1987). En la sección siguiente discutiremos nuestros resultados relativos a la topografía de la O-GlcNAc en proteínas integrales de la membrana del retículo endoplásmico.

7.2. OCURRENCIA DE PROTEINAS INTRINSECAS DE MEMBRANA EN EL RETICULO ENDOPLASMICO CON LOS AZUCARES ORIENTADOS AL LADO CITOPLASMATICO.

Obtuvimos evidencia para una nueva clase de glicoproteínas, ellas son glicoproteínas integrales de la membrana del retículo endoplasmático, con sus azúcares orientados al lado citoplasmático de la membrana. Estas glicoproteínas son distintas de las glicoproteínas periféricas de la membrana nuclear, muy recientemente descritas, que aparentemente tienen los azúcares orientados al citoplasma. (Davis y Blobel, 1986; Holt et al., 1987; Snow et al., 1987; Hanover et al., 1987). Las proteínas que describimos tienen O-GlcNAC y son aparentemente específicas de la membrana del retículo endoplásmico.

Será importante comprender cómo y dónde se ensamblan este tipo particular de glicoproteínas integrales de membrana con O-GlcNAC orientada al citoplasma por su implicación en la comprensión de la biogénesis de membrana en general.

También hemos detectado proteínas con O-GlcNAC orientada al lumen del retículo endoplásmico, y esto sugiere que cierta O-glicosilación puede ocurrir en esta organela, además del aparato de Golgi. El aparato de Golgi ha sido recientemente descrito como el sitio donde ocurren

los enlaces O-GalNac a proteínas (Abeijon y Hirschberg, 1987a) y O-xilosa a glicosaminoglicanos (Nuwayhid et al., 1986).

El enlace para O-GlcNac citosólica podría formarse directamente del lado citosólico de la membrana del retículo endoplásmico. Esto requeriría una GlcNac transferasa citoplasmática u orientada hacia el exterior del retículo endoplásmico. Ninguna de ambas actividades ha sido descrita hasta ahora.

Otro posible mecanismo para la formación del enlace O-GlcNac citosólico sería la glicosilación co- o post-traducciona l de la proteína en el lumen del retículo endoplásmico, seguida de translocación de la glicoproteína a la cara citosólica. Una translocación semejante ha sido postulada en la membrana del retículo endoplásmico para azúcares unidos a dolicol (Snider y Rogers, 1984). Finalmente, también existe la posibilidad que la proteína madura sea glicosilada en el citosol y luego insertada post-traduccionalmente a la membrana del retículo endoplásmico. Este último mecanismo se ha demostrado recientemente en proteínas no glicosiladas del retículo endoplásmico de páncreas canino (Mueckler y Lodish, 1986) y en levaduras (Hansen et al., 1986; Waters y Blobel, 1986; Ainger y Meyer, 1986). No obstante, como dijéramos antes, no han sido descritas glicosiltransferasas citosólicas.

Si estas proteínas con O-GlcNac fueran

sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y luego migraran al liso como destino final, entonces debieran contener una señal específica que determinara su retención en esta membrana. Esto implicaría la existencia de señales específicas de retención para las distintas porciones del retículo endoplásmico, liso y rugoso. También esta abierta la posibilidad de que las proteínas con O-GlcNAc del retículo endoplásmico sean glicosiladas en el aparato de Golgi y luego recicladas al retículo endoplásmico.

Las proteínas que describimos, con un enlace O-glicosídico entre N-acetilglucosamina y serina/treonina en el esqueleto polipeptídico han sido detectadas en membranas de varias organelas y en el citosol (Holt y Hart, 1986).

Muy recientemente, varios grupos de investigadores describieron su existencia en la membrana nuclear, particularmente en la estructura del poro, donde la especie predominante es una glicoproteína de 67 KD (Davis y Blobel, 1986; Schindler et al., 1987; Holt et al., 1987; Snow et al., 1987; Finlay et al., 1987; Hanover et al., 1987). Esta glicoproteína de 67 KD es una proteína periférica de membrana pues puede ser removida con lavados a elevada fuerza iónica. Las que nosotros describimos son integrales de membrana.

El hecho que las glicoproteínas con O-Glc NAC orientado al citoplasma predominen en el retículo endoplásmico liso por sobre el rugoso merece atención. En el hepatocito, aproximadamente el 40% del retículo endoplásmico es liso, y junto con el rugoso, estas membranas constituyen el 50% de las membranas celulares totales (De Pierre y Dallner, 1975; Weibel et al., 1969). Por lo tanto es posible que las proteínas que describimos constituyan una porción significativa de las proteínas celulares del hepatocito.

Si bien la mayoría de las proteínas integrales de membrana son las mismas en ambas porciones del retículo endoplásmico (Kreibich et al., 1978), el retículo endoplásmico liso es aparentemente el principal sitio de producción de partículas lipoproteicas destinadas a ser exportadas (Havel, 1980). Además las membranas del retículo endoplásmico liso juegan un papel importante en las reacciones de detoxificación, incluyendo hidroxilación, demetilación, esterificación y conjugación. Luego de la administración de fenobarbital, se produce un incremento selectivo de las membranas del retículo endoplásmico liso, paralelo a un aumento de la actividad metabolizadora de drogas, en el hígado de las ratas tratadas. Este incremento en el retículo endoplásmico liso representa génesis de nueva membrana y no pérdida de ribosomas por parte del retículo endoplásmico rugoso (Jones y Fawcett, 1966).

Nosotros aún no hemos determinado si estas glicoproteínas del retículo endoplásmico liso con O-GlcNAC orientado hacia el citoplasma, juegan un rol en el metabolismo de drogas, pero esa posibilidad debe ser considerada.

7.3. CONCLUSIONES

Con respecto al tipo de O-glicosilación más abundante en proteínas de animales superiores, iniciada por O-GalNac unida a serina o treonina en este trabajo se ha mostrado que:

a) En el hígado de rata, la enzima responsable del primer paso de esta ruta biosintética, la UDP-GalNac, polipéptido: N-acetilgalactosamil transferasa, está situada exclusivamente en membranas derivadas del aparato de Golgi y no en aquellas provenientes del retículo endoplásmico rugoso o liso.

b) El nucleótido azúcar sustrato de esta primera reacción, UDP-GalNac, es transportado como unidad hacia el lumen de vesículas derivadas del aparato de Golgi. La translocación es saturable y dependiente de la temperatura. La velocidad inicial de transporte es cinco veces más alta que en vesículas derivadas del retículo endoplásmico.

c) Los aceptores macromoleculares endógenos para GalNac fueron detectados solamente en membranas del aparato de Golgi y no en las del retículo endoplásmico liso, ni rugoso.

Estos resultados indican que, en el hígado de rata, el sitio subcelular de iniciación de la

O-glicosilación, i.e. adición de GalNAc a serina/treonina en las proteínas, es el aparato de Golgi.

También estudiamos la topografía del nuevo tipo de O-glicosilación recientemente descrito y que consta de un único azúcar por cadena, O-GlcNAc, unida a serina/treonina en las proteínas.

Encontramos que en las membranas del retículo endoplásmico existen glicoproteínas integrales en las que la O-GlcNAc está orientada hacia el citoplasma y, en otras, hacia el lumen, y no exclusivamente hacia el lumen como hasta el presente se había descrito para los residuos glicosídicos. Estas glicoproteínas son especialmente abundantes en el retículo endoplásmico liso.

Este hallazgo abre interrogantes fundamentales sobre la forma en que estas glicoproteínas alcanzan su destino final en la membrana, y tratar de solucionarlos ayudará a comprender mejor la biogénesis de membranas en general.

7.4. DIRECCIONES FUTURAS

Actualmente disponemos de abundante evidencia bioquímica y genética sobre la existencia de transportadores de nucleótidos azúcar en la membrana del Golgi. No obstante, un número importante de problemas deben ser objeto de futuras investigaciones. El mecanismo de intercambio entre el nucleótido azúcar y el nucleósido monofosfato no ha sido estudiado en detalle. Además en este trabajo, hemos mostrado que la UDP-GalNac es transportada tanto en el retículo endoplásmico como en el aparato de Golgi, aunque a distinta velocidad. El mismo fenómeno se observó recientemente para la UDP-GlcNac (Perez y Hirschberg, 1986). No sabemos si las proteínas transportadoras para un determinado nucleótido azúcar son las mismas en las dos organelas.

Para responder estas preguntas hará falta contar con proteínas transportadoras purificadas y anticuerpos específicos contra ellas.

Una forma posible de identificación de las proteínas transportadoras será el uso de análogos fotoreactivos de los nucleótidos azúcar. Por ejemplo, los derivados del ácido benzoil-benzoico, recientemente usados con éxito para marcar la CMP-AcNeu sintetasa bacteriana (Abeijon et al., 1985).

Además con las proteínas purificadas se podrá reconstruir el sistema de transporte en vesículas fosfolípidicas artificiales (liposomas). Un sistema reconstituido en liposomas sera muy valioso para determinar la estequiometria del intercambio entre el nucleótido azúcar y el nucleósido monofosfato y para investigar la implicancia de gradientes iónicos o de pH en el proceso de transporte. Aunque los estudios in-vitro descartan la necesidad de estos gradientes, solo el sistema reconstituido podrá contestar sin lugar a dudas estas preguntas, pues en las vesículas de Golgi aisladas el contenido iónico esta sujeto a cambios basados en el proceso de fraccionamiento empleado.

Disponiendo de anticuerpos podrá estudiarse por inmunoelectromicroscopía la subcompartimentalización de los transportadores de nucleótido azúcar dentro del Golgi, y su relación con las respectivas glicosiltransferasas. Todas las glicosiltransferasas estudiadas hasta ahora, estan restringidas a una o varias cisternas del Golgi. Recientemente la galactosil y sialiltransferasa han sido localizadas en distintas regiones del trans Golgi (Roth et al., 1985), indicando una subcompartimentalización funcional.

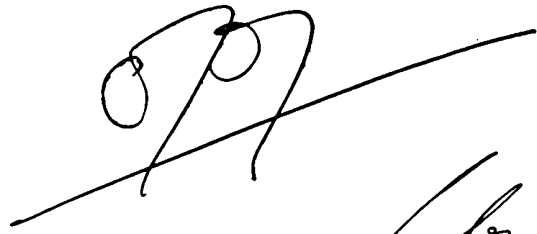
Respecto al recientemente descrito enlace O-glicosídico, que consta de un único azúcar por cadena O-GlcNAc unido a serina/treonina, la mayoría de estas

estructuras parecen estar en la cara citosólica de la membrana nuclear. Aunque ellas también han sido reportadas en la superficie celular (Torres y Hart, 1984) y nosotros las hemos hallado en ambos lados de la membrana del retículo endoplásmico (Abeijon y Hirschberg, 1987b).

La topografía de este enlace no ha sido estudiada en otras organelas. Tampoco ha sido identificada la glicosiltransferasa responsable de sintetizarlo. Para estudiar la localización de una glicosiltransferasa es imprescindible disponer de un aceptor exógeno para ella. Nosotros hemos identificado proteínas aceptoras en membranas del retículo endoplásmico, lo que representa una fuente abundante de éstas, ya que el retículo endoplásmico constituye el 50% de las membranas celulares en el hepatocito. Esto abre la posibilidad de purificar alguna de estas proteínas, deglicosilarla, y usarla como aceptor exógeno para localizar a la glicosiltransferasa responsable de la adición de la O-GlcNAc.

También sería importante purificar alguna de las glicoproteínas integrales de membrana, donde se mostró que la O-GlcNAc está orientada hacia el citoplasma, y obtener un anticuerpo contra ella, para así poder seguir su biosíntesis. Se podría determinar si ella es sintetizada en poliribosomas libres o unidos a membrana, si su inserción en la membrana del retículo es co- o

post-traducciona l y d ó n d e y c u á n d o e s
glicosilada. Responder estas preguntas ay u d a r í a a
comprender la biogénesis de membranas en general.



Abel S. Fernández

LITERATURA CITADA

- Aaronson, N.N., Jr., and Touster, O. (1974) *Methods in Enzymol.* 31, 90-102.
- Abeijon, C., Capasso, J.M., Tal, D., Vann, W.F., and Hirschberg, C.B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 11374-11377.
- Abeijon, C., and Hirschberg, C.B. (1987a) *J. Biol. Chem.* 262, 4153-4159.
- Abeijon, C., and Hirschberg, C.B. (1987b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (in press).
- Adelman, M.R., Blobel, G., and Sabatini, D.D. (1974) *Methods in Enzymol.* 31, 201-214.
- Ainger, K.J., and Meyer, D.I. (1986) *EMBO J.* 5, 951-955.
- Ames, B.N. (1966) *Methods in Enzymol.* 8, 115-118.
- Anderson, B., Seno, N., Sampson, P., Riley, J.G., Hoffman, P., and Meyer, K. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2716-2717.
- Arion, W.J., Ballas, L.M., Lange, A.J., and Wallin, B.K. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4901-4907.
- Ashwell, G., and Morell, H.G., (1974) *Adv. Enzymol.* 41, 99-118.
- Aubert, J.P., Biserte, G., and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 410-418.
- Baenziger, J., and Kornfeld, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7270-7277.
- Bahl, O.P. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 567-573.
- Balch, W.E., Glick, B.S., and Rothman, J.E. (1984) *Cell* 39, 525-536.
- Behrens, N.H., Parodi, A.J., and Leloir, L.F. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 2857-2860.
- Behrens, N.H., Carminatti, H., Staneloni, R.J., Leloir, L.F., and Cantarella, A.I. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70, 3390-3394.
- Bergman, L.W., and Kuehl, W.M. (1978) *Biochemistry* 17, 5174-5180.
- Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.I., Paulson, J.C., and Hill, R.L. (1981) *Adv. Enzymol.* 52, 24-175.
- Blobel, G., and Potter, V.R. (1966) *Science* 154, 1662-1665.
- Bosch, F.X., Orlich, M., Legler, G., Schwarz, R.T., and Roth, R. (1984) *Virology* 132, 199-204.
- Braell, W.A., Balch, W.E., Dobberty, D.C., and Rothman, J.E. (1984) *Cell* 39, 511-524.
- Brandan, E., and Fleischer, B. (1982) *Biochemistry* 21, 9640-9645.
- Briand, J.P., Andrews, S.P., Cahill, E., Conway, N.A., and Young, J.D. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12205-12207.
- Brown, M.A., Anderson, R.G.W., and Goldstein, J.L. (1983) *Cell* 32, 663-667.

- Buck, C.A., Glick, M.C., and Waren, L.A. (1970) *Biochemistry* 9, 4567-4574.
- Buck, C.A., Glick, M.C., and Waren, L.A. (1971) *Science* 172, 169-171.
- Butler, W.T., and Cunningham, L.W. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3882-3888.
- Capasso, J.M., and Hirschberg, C.B. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 7051-7055.
- Cardini, C.E., and Leloir, L.F. (1957) *J. Biol. Chem.* 215, 317-324.
- Carey, D.J., and Hirschberg, C.B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4348-4354.
- Carey, D.J., and Hirschberg, C.B. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 989-993.
- Coates, S.W., Gurney, T., Jr., Sommers, L.W., Yeh, M., and Hirschberg, C.B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9225-9229.
- Creek, K.E., and Morre, D.J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 643, 292-305.
- Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J., Hobgood, K.K., Tollerhaugh, H., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 15261-15273.
- Dallner, G., Ernster, L., and Azzi, A. (1971) *Chem. Biol. Interactions* 3, 254-262.
- Davidson, E.A. (1966) *Methods in Enzymol.* 8, 277-283.
- Davis, L.I., and Blobel, G. (1986) *Cell* 45, 669-709.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans (1955) *Biochem. J.* 60, 604-617.
- De Pierre, J.W., and Dallner, G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415, 411-472.
- Deutscher, S.L., Nuwayhid, N., Stanley, P., Briles, E.I.B., and Hirschberg, C.B. (1984) *Cell* 39, 295-299.
- Deutscher, S.L., and Hirschberg, C.B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 96-100.
- Elbein, A.D. (1979) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30, 239-253.
- Elhammer, A., and Kornfeld, S. (1984) *J. Cell Biol.* 99, 327-331.
- Feizi, T., and Childs, R.A. (1985). *Trends Biochem. Sci.* 10, 24-29.
- Finlay, D.R., Newmeyer, D.D., Price, T.M., and Forbes, D.J. (1987) *J. Cell Biol.* 104, 189-200.
- Finne, J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 412, 317-323.
- Fleck, A., and Begg, D. (1954) *Biochim. Biophys. Acta* 108, 333-339.
- Fleischer, B. (1981) *J. Cell Biol.* 89, 246-255.
- Fleischer, S., and Kervina, M. (1974) *Methods in Enzymol.* 31, 6-41.
- Fletcher, A.P., Marks, G.S., Marshall, R.D., and Neuberger, A. (1963) *Biochem. J.* 87, 265-273.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., and Lazarow, P.B. (1982) *J. Cell Biol.* 93, 97-102.
- Furokawa, K., and Terayama, H. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 585, 575-588.
- Furthmayr, H. (1978) *Nature* 271, 519-521.

- Geetha-Habib, M., Campbell, S.C., and Schwartz, N.B. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7300-7310.
- Geoghegan, K.F., Osuga, D.T., Ahmed, A.I., Yeh, Y., and Feeney, R.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 663-671.
- Glaser, L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2801-2815.
- Gram, T.E. (1974) Methods in Enzymol. 31, 225-237.
- Grebner, E.E., Hall, C.W., and Neufeld, E.F. (1966a) Arch. Biochem. Biophys. 116, 391-410.
- Grebner, E.E., Hall, C.W., and Neufeld, E.F. (1966b) Biochem. Biophys. Res. Commun 22, 672-685.
- Green, E.D., Morishima, C., Boime, I., and Baenziger, J.V. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7850-7854.
- Green, E.D., Boime, I., and Baenziger, J.V. (1986) J. Biol. Chem. 261, 16309-16316.
- Guan, J.L., and Rose, J.K. (1984) Cell 37, 779-787.
- Hagopian, A., and Eylar, E.H. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 128, 422-433.
- Hanover, J.A., and Lennarz, W.J. (1978) J. Biol. Chem. 254, 9237-9246.
- Hanover, J.A., and Lennarz, W.J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2787-2784.
- Hanover, J.A., Lennarz, W.J., and Young, J.D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6713-6716.
- Hanover, J.A., Elting, S., Mintz, G.R., and Lennarz, W.J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10172-10177.
- Hanover, J.A., Cohen, C.K., Willingham, M.C., and Park, M.K. (1987) J. Biol. Chem. 262, 9887-9894.
- Hansen, W., Garcia, P.D., and Walter, P. (1986) Cell 45, 397-406.
- Harbon, S., Herman, G., Rossignol, B., Jolles, P., and Clauser, H. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 157-161.
- Havel, R.J. (1980) Ann. New York Acad. Sci. 348, 16-25.
- Hayes, M.L., and Castellino, F.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8777-8785.
- Higgins, T., Parish, C., Hogarth, P., Mc Kenzie, and Hammerling, G., (1980) Immunogenetics 11, 467-672.
- Hill, H.D., Reynolds, J.A., and Hill, R.L., (1977a) J. Biol. Chem. 252, 3791-3799.
- Hill, H.D., Schwyzer, M., Steinman, H.M., and Hill, R.L., (1977b) J. Biol. Chem. 252, 3799-3807.
- Hirschberg, C.B., and Snider, M.D. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56, 63-87.
- Hoffman, H.P., Schwartz, N.B., Roden, L., and Prockop, D.J. (1984) Connect Tissue Res. 12, 151-163.
- Holmes, K.V., Doller, E.W., and Sturman, L.S. (1981) Virology 115, 334-344.
- Holstege, A., Schulz-Holstege, C., Henninger, H., Reiffen, K.A., Schneider, F., and Kepleer, D.O.R. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 469-474.
- Holt, G.D., and Hart, G.W. (1986) J. Biol. Chem. 261, 8049-8057.

- Holt, G.D., Snow, M.C., Senior, A., Haltiwanger, R.S., Gerace, L., and Hart, G.W. (1987) *J. Cell Biol.* 104, 1157-1164.
- Hubbard, A.L., Wall, D.A., and Ma, A. (1983) *J. Cell Biol.* 96, 217-229.
- Hubbard, S.C., and Ivatt, R.J. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50, 555-582.
- Hudgin, R.L., Pricer, Jr., W.E., Ashwell, G., Stockert, R.J., and Morelli, A.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5536-5542.
- Ishihara, H., and Heath, E.C. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1110-1117.
- Ito, S., Yamashita, K., Spiro, R.G., and Kobata, A. (1977) *J. Biochem. Tokyo* 81, 1621-1629.
- Johansen, P.G., Marshall, R.D., and Neuberger, A. (1961) *Biochem. J.* 78, 518-527.
- Johnson, D.C., and Spear, P.G. (1983) *Cell* 32, 987-997.
- Jokinen, M., Andersson, L.C., and Gahmberg, C.G. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 11313-11321.
- Jones, A.L., and Fawcett, D.W. (1966) *J. Histochem. Cytochem.* 14, 215-232.
- Jutisz, M., and De La Llosa, P. (1972) A. Gottschalk Ed. *Glycoproteins Part B.* Elsevier, Amsterdam, p. 1019.
- Katz, F.N., Rothman, J.E., Lingappa, V.R., Blobel, G., and Lodish, H.F. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 3278-3282.
- Kawasaki, T., and Ashwell, G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6536-6541.
- Kawasaki, T., Etoh, R., and Yamashina, I. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1018-1024.
- Kean, E.L. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2301-2307.
- Kessler, M.J., Mise, T., Ghai, R.D., and Bahl, O.P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7909-7916.
- Kim, Y.S., Pedromo, J., and Nordberg, J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5466-5476.
- Kimura, J.H., Lohamander, L.S., and Hascall, V.C. (1984) *J. Cell Biochem.* 26, 261-278.
- Klenk, H.D., and Rott, R. (1980) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 90, 19-48.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664.
- Kreibich, G., Ulrich, L., and Sabatini, D.D. (1978) *J. Cell Biol.* 77, 464-487.
- Krusius, T., Jukka, F., Margolis, R.K., and Margolis, R.V. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8237-8242.
- Kuhn, N.J., and White, A. (1976) *Biochem. J.* 154, 243-244.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Leelavathi, D.E., Este, L.W., Feingold, D.S., and Lombardi, B. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 221, 124-138.
- Lehle, L. (1980) *Eur. J. Biochem.* 109, 589-596.
- Lingappa, V.R., Lingappa, J.R., Prasad, R., Ebner, K. E., and Blobel, G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2338-2342.

- Lohmander, L.S., Hascall, V.C., Yanagishita, M.L.,
Kuettner, K.E., and Kimura, J.H. (1986) Arch. Biochem.
Biophys. 250, 211-227.
- Louchex-Lefebvre, M.H., Aubert, J.P., and Lolle's, P. (1978)
Biophys. J. 23, 323-336.
- Lloyd, K.O., and Kabata, E.A. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA. 61, 1470-1476.
- Magee, S.C., Mawal, R., and Ebner, K.E. (1974) Biochemistry
13, 99-102.
- Maley, F., and Maley, G.F. (1959) Biochem. Biophys. Acta
31, 575-582.
- Maley, F. (1972) Methods in Enzymol. 28, 271-274.
- Merks, G.S., Marshall, R.D., and Neuberger, A. (1963)
Biochem. J. 87, 274-281.
- Maxwell, E. (1957) J. Biol. Chem. 229, 139-151.
- Mc Gurie, E.J., and Roseman, S. (1967) J. Biol. Chem. 242,
3745-3747.
- Meezan, E., Wu, H., Black, P., and Robbins, P.W. (1969)
Biochemistry 8, 2518-2523.
- Meyer, D.I., and Burger, M.M. (1976) Biochim. Biophys.
Acta 443, 428-436.
- Mizouchi, T., Yamashita, K., Fujikawa, K., Titani, K., and
Kobata, A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3526-3531.
- Mueckler, M., and Lodish, H.F. (1986) Cell 44, 629-637.
- Nagakura, K., H. Tachibana, Y, Kaneda, and Nakae T. (1986)
Exp. Parasitol. 61, 335-342.
- Nakajima, T., and Ballou, C.E. (1974) J. Biol. Chem. 249,
7679-7684.
- Nicolson, G.L., and Singer, S.J. (1974) J. Biol. Chem. 60,
236-248.
- Niemann, H., Boschek, D., Evans, M., Rosing, T., and Klenk,
H.D. (1982) EMBO J. 1, 1499-1504.
- Nuenke, R.H., and Cunningham, L.W. (1961) J. Biol. Chem.
236, 2452-2460.
- Nuwayhid, N., Glaser, J..H., Johnson, J.C., Conrad, H.E.,
Hauser, S.C., and Hirschberg, C.B. (1986) J. Biol.
Chem. 261, 12936-12941.
- Oates, M.D., Robottom, A.C., and Schruager, J. (1974)
Carbohydr. Res. 34, 115-123.
- Olden, K., Parent, J.B., and White, S.C. (1982) Biochem.
Biophys. Acta 650, 209-231.
- Osuga, D.T., and Feeney, R.E. (1978) J. Biol. Chem. 253,
5338-5346.
- Parodi, A.J., and Leloir, L.F., (1979) Biochim. Biophys.
Acta 599, 1-37.
- Patzelt, C., and Weber, B. (1986) EMBO J. 5, 2103-2108.
- Pazur, J.H., and Aronson, N.N. (1973) Adv. Carbohydr. Chem.
27, 30-38.
- Perez, M., and Hirschberg, C.B. (1985) J. Biol. Chem. 260,
4671-4678.
- Perez, M., and Hirschberg, C.B. (1986) J. Biol. Chem. 261,
6822-6830.

- Peterson, G.L. (1977) *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Prohaska, R., Koerner, T.A.W., Armitage, I.M., and Furthmayr, H. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5781-5789.
- Quesada-Allue, L.A. (1980) *Mol. Cell. Biochem.* 33, 149-153.
- Raizda, M.K., Schtzbach, J.S., and Ankel, H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 3310-3315.
- Rao, A.K., and Mendicino, J. (1978) *Anal. Biochem.* 91, 490-495.
- Reading, C.L., Penhoet, E.E., and Ballou, C.E. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5600-5608.
- Repp, R., Tamura, T., Boschek, C.B., Wege, H., Schwarz, R.T., and Niemann, H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15873-15879.
- Rodriguez-Boulan, E., Kreibich, G., and Sabatini, D.D. (1978) *J. Cell Biol.* 78, 874-893.
- Rome, L.H., Weissmann, B., and Neufed, E.F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 2331-2335.
- Roth, J. (1984) *J. Cell. Biol.* 98, 399-406.
- Roth, J., Taatjes, D.J., Lucocq, J.M., Weinstein, J., and Paulson, J.C. (1985) *Cell* 43, 287-295.
- Roth, J., Taatjes, D.J., Weinstein, J., Paulson, J.C., Greenwell, P., and Watkins, W.M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14307-14312.
- Rothman, J.E., and Lenarad, J. (1977) *Science* 195, 743-753.
- Rothman, J.E., and Lodish, H.F. (1977) *Nature* 269, 775-780.
- Rottier, P.J.M., Horzinek, M.C., and Van der Zeijst, B.A.M. (1981) *J. Virol.* 40, 350-357.
- Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T., and Adesnik, M. (1982) *J. Cell Biol.* 92, 1-22.
- Sambrook, J., Rodgers, L., White, J., and Gething, M.J. (1985) *EMBO J.* 4, 91-103.
- Samor, B., Mazuries, C., Goudemand, M., Debiere, P., Fourmet, B., and Montreuil, J. (1982) *Thromb. Res.* 25, 81-88.
- Sasaki, H., Bother, B., Dell, A., and Fukuda, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12059-12076.
- Schauer, R. (1973) *Angew. Chem. Int. Ed.* 12, 127-132.
- Schindler, M., Hogan, M., Miller, R., and DeGaetano, D. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1254-1260.
- Shida, H., and Matsumoto, S. (1983) *Cell* 33, 423-434.
- Schwarz, J.K., Capasso, J.M., and Hirschberg, C.B. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3554-3559.
- Sly, W.S., Fischer, H.D., Gonzalez Noriega, A., Grubb, J., and Natowicz, M. (1981) *Hand and C. Oliver, Eds. Basic Mechanisms of Cellular Secretion, Academic Press, New York* p. 191.
- Smets, L.A., Van Beek, W.P., and Van Nie, R. (1977) *Cancer Lett.* 3, 133-141.
- Snider, M.D., and Robbins, P.W. (1981) *A.R. Hand and C. Oliver, Eds., Basic Mechanisms of Cellular Secretion, Academic Press, New York, p. 89.*

- Snider, M.D., and Robbins, P.W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6796-6807.
- Snider, M.D., and Rogers, O.C. (1984) *Cell* 36, 753-761.
- Snider, M.D., and Rogers, O.C. (1985) *J. Cell Biol.* 100, 826-834.
- Snow, C.M., Senior, A., and Gerace, L. (1987) *J. Cell Biol.* 104, 1143-1156.
- Sommers, L.W., and Hirschberg, C.B. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10811-10817.
- Soulier, S., and Gaye, P. (1981) *Biochemie* 63, 619-624.
- Spiro, R.G. (1967a) *J. Biol. Chem.* 242, 1923-1932.
- Spiro, R.G. (1967b) *J. Biol. Chem.* 242, 4318-4323.
- Spiro, R.G. (1972) *Methods in Enzymol.* 28, 3-43.
- Spiro, R.G. (1973) *Adv. Protein. Chem.* 27, 349-467.
- Spiro, R.G., and Bhoyroo, V.D. (1971) *Fed. Proc.* 30, 1223.
- Staneloni, R.J., Tomalsky, M.E., Petriella, C., Ugalde, R.A., and Leloir, L.F. (1980) *Biochem. J.* 191, 257-261.
- Stanley, P., Sudo, T., and Carver, J.P. (1980) *J. Cell Biol.* 85, 60-69.
- Steck, T.L. (1974) *J. Cell Biol.* 62, 1-19.
- Strous, G.J.A.M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 2691-2698.
- Struck, D.K. and Lennarz, W.J. (1980) W. J. Lennarz, Ed. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum, New York, p. 35.
- Sugiura, M., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9501-9507.
- Takasaki, S., Yamashita, K., and Kobata, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6086-6094.
- Tanaka, K., Bertolini, M., and Pigman, W. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 404-409.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M., and Plummer, T.H., Jr. (1985) *Biochemistry* 24, 4665-4671.
- Tartakoff, A.M., and Vassalli, P. (1983) *J. Cell Biol.* 97, 1243-1248.
- Torres, C.R., and Hart, G.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3308-3317.
- Trimble, R.B., Maley, F., and Tarentino, A.L., (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10232-10239.
- Trouet, A. (1974) *Methods in Enzymol.* 31, 323-329.
- Turnquist, R.L., Gillelt, T.A., and Hansen, R.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7695-7702.
- Uhlenbruck, G., Haput, H., Reesel, I., and Steinhausen, G. (1977) *Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 561-569.
- Van Nest, G., and Grimes, W.J. (1977) *Biochemistry* 16, 2902-2909.
- Wall, D.A., Wilson, G., and Hubbard, A.L. (1980) *Cell* 21, 79-83.

- Waters, M.G., and Blobel, G. (1986) J. Cell Biol. 102, 1543-1550.
- Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R., and Hess, F.A. (1969) J. Cell Biol. 42, 68-91.
- Welply, J.K., Shenbagamurthi, P., Lennarz, W.J., and Naider, F. (1983) J. Biol. Chem. 258, 11856-11863.
- White, D.A., and Speake, B.K. (1980) Biochem. J. 192, 297-301.
- Wice, B.M., Trugman, G., Pinto, M., Reusset, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Lacroix, B., and Zweibaum, A. (1985) J. Biol. Chem. 260, 139-146.
- Wickner, W.T., and Lodish, H.F. (1985) Science 230, 400-407.
- Yamashima, I., and Makino, M. (1962) J. Biochem. (Tokyo) 51, 359-364.
- Yamashita, K., Tachibana, Y., and Kobata, A. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3862-3869.
- Young, J.D., Tsuchiya, D., Sandlin, D.E., and Holroyde, M.J. (1979) Biochemistry 18, 4444-4448.