

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de polisacáridos : iniciación en la biosíntesis del glucógeno, enzimas involucradas

Tolmasky, Diana Silvia

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas 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:

Tolmasky, Diana Silvia. (1990). Biosíntesis de polisacáridos : iniciación en la biosíntesis del glucógeno, enzimas involucradas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2325_Tolmasky.pdf

Cita tipo Chicago:

Tolmasky, Diana Silvia. "Biosíntesis de polisacáridos : iniciación en la biosíntesis del glucógeno, enzimas involucradas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2325_Tolmasky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DE POLISACARIDOS-INICIACION EN LA BIOSINTESIS
DEL GLUCOGENO-ENZIMAS INVOLUCRADAS

AUTORA: *DIANA SILVIA TOLMASKY*

DIRECTORA: *CLARA R. KRISMAN DE FISCHMAN*

LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
DR. LUIS F. LELOIR, "FUNDACION CAMPOMAR"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1990

A *SERGIO,*

MARIELA Y DAN

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Clara R. Krisman, directora de esta tesis y con quien comencé a descubrir el apasionante mundo de la investigación, por haberme transmitido con mucho cariño y paciencia todos sus conocimientos, por haber aguantado mis enojos y problemas y por haberme estimulado y apoyado siempre.

A los miembros de la Comisión Directiva de la Fundación Campomar, por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al Dr. Ricardo A. Wolosiuk, Consejero de Estudio, por haber tenido siempre cinco minutos para escucharme.

A todos mis compañeros del I.I.B. y en especial a mis amigos: Marta Bravo, Alejandra Raimondi, Viviana Lepek, Angeles Zorreguieta, Juan José Miret, Cecilia Sánchez, Mariana Stein, Ariel Wilner, Horacio Nastri, Olga Castro y Tony Coira.

A mis amigos del "Club del Café", Vivian Alvarez, Eduardo Guillén, Eduardo Cafferata y Beto Couso por todos los lindos momentos pasados entre café y café.

A mis compañeros de laboratorio, Marta Blumenfeld, Roberto Geremia, Alfredo Curá, Eduardo Pagano y Elda M.

Salmoral por haber compartido charlas, broncas, alegrías y mucho mate y galletitas.

A mi amigo Marcelo de las Heras por que siempre estuvo dispuesto a ayudarme a operar a las ratas y por haber leído los borradores de esta tesis.

A Susana Raffo y Marta Bravo por su apoyo técnico y a Alejandra Raimondi por sus corridas.

Finalmente le quiero agradecer a mi marido, porque con su constante apoyo, paciencia, estímulo y amor hizo que todo resultara más fácil.

ABREVIATURAS

ADP-Glc	adenosina 5' difosfoglucosa
AMP	adenosina 5' monofosfato
cAMP	adenosina 5' monofosfato cíclico
ATP	adenosina 5' trifosfato
cpm	cuentas por minuto
DEAE	diethylaminoetil
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilén diamino tetraacetato
EtOH	etanol
GDP-Glc	guanosina 5' difosfoglucosa
Glc	glucosa
Glc-1-P	glucosa-1-fosfato
Glc-6-P	glucosa-6-fosfato
Gno	glucógeno
GS	glucógeno sintetasa
GSI	glucógeno sintetasa iniciadora
Hepes	
hs	horas
kDa	kilodaltons
KOH-EtOHpp	fracción digerida con KOH33% y precipitada con etanol
M _i - M _n	glucosa-glucosa _n
min	minuto

PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
Pi	fosfato inorgánico
PM	peso molecular
PMSF	fenilmetil sulfonil fluoruro
PPi	pirofosfato inorgánico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloro acético
TCApp	fracción insoluble en TCA 10%
TCAsol-EtOHpp	fracción insoluble en TCA 10% e insoluble en EtOH
Tris	tris-(hidroximetil)aminometano
UDP	uridina 5' difosfato
UDP-Glc	uridina 5' difosfo glucosa
UMP	uridina 5' monofosfato
UTP	uridina trifosfato

INDICE

	pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	
POLISACARIDOS-GENERALIDADES	4
POLISACARIDOS DE PLANTAS	5
<i>Almidón</i>	5
<i>Amilosa</i>	5
<i>Amilopectina</i>	6
POLISACARIDOS DE ANIMALES	
<i>Glucógeno</i>	7
METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN MAMIFEROS	11
<i>Síntesis</i>	13
INICIACION	13
<i>Crecimiento</i>	16
<i>Glucógeno sintetasa</i>	17
ENZIMA RAMIFICANTE	18
<i>de mamíferos y bacterias</i>	20
<i>de plantas</i>	21
<i>Mecanismo de acción</i>	22
<i>Métodos de dosaje</i>	24
<i>Degradación</i>	27
REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO	27
GLUCOGENO EN CEREBRO	31

<i>Desórdenes metabólicos cerebrales</i>	32
<i>Del sistema de desramificación</i>	33
<i>De la enzima ramificante</i>	33
<i>De la glucógeno sintetasa</i>	34
OBJETIVOS GENERALES DE ESTA TESIS	35
MATERIALES Y METODOS	
<i>Materiales</i>	37
<i>Métodos analíticos</i>	37
<i>Sustratos radioactivos</i>	37
<i>Enzimas auxiliares</i>	38
OBTENCION DE ENZINAS RAMIFICANTES	
<i>De origen animal</i>	38
<i>De origen vegetal</i>	39
<i>Fosforilasa b</i>	40
<i>Sistema de desramificación</i>	40
OBTENCION DEL COMPLEJO DE INICIACION DE LA BIOSINTESIS DEL GLUCOGENO A PARTIR DE CEREBRO DE RATA	40
OBTENCION DE GLUCOPOLISACARIDOS $\alpha 1, 4-\alpha 1, 6$	
<i>Glucógeno de hígado de rata</i>	44
<i>Polisacáridos de papa</i>	44
<i>Polisacáridos de maíz dulce</i>	45
DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS	
<i>Actividad ramificante</i>	45

Método A	45
Método B	46
<i>Actividad de glucógeno sintetasa</i>	47
<i>Actividad de glucógeno sintetasa iniciadora</i>	48
<i>Actividad fosforilasa</i>	49
DETERMINACION DE LA LONGITUD PROMEDIO DE CADENA (LC)	
DE DISTINTOS POLISACARIDOS	49
TRATAMIENTOS ENZIMATICOS	50
α -amilasa	50
β -amilasa	50
amiloglucosidasa	50
subtilisina	51
pronasa E	51
TRATAMIENTOS QUIMICOS	
<i>Hidrólisis ácida suave</i>	51
<i>Hidrólisis alcalina</i>	52
METODOS CROMATOGRAFICOS	
<i>Cromatografía en papel</i>	52
<i>Filtración en geles</i>	53
<i>Cromatografía líquida de alta presión</i>	53
METODOS ELECTROFORETICOS	
<i>Geles disociantes en presencia de SDS/urea</i>	54
<i>Marcadores de peso molecular</i>	54

RESULTADOS-I) PROCESO DE RAMIFICACION

ENZIMAS RAMIFICANTES

DESARROLLO DE UN METODO DE DETERMINACION ENZIMATICA	56
<i>Condiciones óptimas</i>	57
<i>Estudio de gluco polisacáridos $\alpha 1,4-\alpha 1,6$</i>	60
<i>Análisis de la actividad ramificante utilizando el método desarrollado</i>	63
<i>Análisis comparativos de los gluco polisacáridos $\alpha 1,4-\alpha 1,6$ nativos y los sintetizados "in vitro"</i>	64
<i>Definición del parámetro A</i>	65
<i>Polisacáridos contenidos en el maíz dulce</i>	69
ESPECIFICIDAD DE LAS ENZIMAS RAMIFICANTES	
<i>medición de largos de cadenas</i>	71
DISCUSION-I) PROCESO DE RAMIFICACION	73

RESULTADOS-II) PROCESO DE INICIACION

INICIACION DE LA BIOSINTESIS DEL GLUCOGENO EN CEREBRO DE RATA	78
<i>Purificación de las actividades enzimáticas</i>	79
<i>Producto sintetizado por la enzima ramificante</i>	80
ACTIVIDADES DE GLUCOGENO SINTETASA Y GLUCOGENO	
SINTETASA INICIADORA	84
<i>Requerimientos</i>	84
<i>Naturaleza del producto TCApp formado</i>	84

<i>Especificidad del dador de glucosas</i>	88
<i>Efecto del pH</i>	92
<i>OLIGOSACARIDOS UNIDOS A LA PROTEINA SINTETIZADOS</i>	
<i>POR LA ACTIVIDAD GSI</i>	92
<i>Gel en poliacrilamida con SDS/urea</i>	95
<i>Curvas de tiempo</i>	97
<i>Efecto del agregado de Mn²⁺</i>	100
DISCUSION-II) PROCESO DE INICIACION	103
<u>CONCLUSIONES</u>	115
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	116

RESUMEN

EL glucógeno es el polisacárido de reserva presente en tejidos animales, como así también en algunas algas, plantas superiores, hongos y bacterias. Es un polímero ramificado de D-glucosas unidas entre sí por uniones glucosídicas $\alpha 1,4$ en las cadenas lineales y $\alpha 1,6$ en los puntos de ramificación.

La síntesis del glucógeno involucra tres etapas: a) iniciación, b) crecimiento y c) terminación.

Desde el descubrimiento de las enzimas glucógeno sintetasa y ramificante, se planteó la necesidad de conocer como se origina "de novo" una molécula de glucógeno. A partir de resultados obtenidos en hígado de rata y *E. coli* donde , a partir de un nucleótido- (^{14}C) glucosa se transfiere la marca radioactiva a una proteína, Krisman postuló un modelo para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno. En base a este modelo, la síntesis "de novo" de una molécula de glucógeno involucraría una etapa inicial donde, si no más, por lo menos una glucógeno sintetasa iniciadora, formaría un glucano unido covalentemente a una proteína que serviría como "primer" para la acción conjunta de la glucógeno sintetasa y la ramificante. De esta forma se originarían moléculas de glucógeno unidas a proteína.

Por otro lado, la etapa de crecimiento de la molécula de glucógeno ha sido muy bien estudiada. Si bien se conocen todos los mecanismos regulatorios de la glucógeno sintetasa

es muy poco lo que se sabe acerca de la regulación de la enzima ramificante. Esto se debe a la inexistencia de métodos específicos y cuantitativos para medir su actividad enzimática.

Teniendo en cuenta las características particulares del cerebro en cuanto al metabolismo del glucógeno, ya que éste no lo acumula salvo en casos patológicos, se estudió el proceso de iniciación y ramificación del mismo en este tejido.

Los resultados obtenidos en esta Tesis son los siguientes:

-Se desarrolló un método específico, sensible y cuantitativo para determinar la actividad ramificante. La metodología propuesta consiste en la determinación específica de las glucosas involucradas en los puntos de ramificación.

-Se demostró que la estructura final de un polisacárido depende de la especificidad de la enzima ramificante involucrada en su síntesis.

-Se demostró que en el cerebro, tejido que no acumula glucógeno en condiciones normales, también es operativo el modelo propuesto por Krisman para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno.

-Se estudiaron, en particular las actividades involucradas en la formación del "primer" proteico. Se demostró la

existencia de más de una actividad glucógeno sintetasa iniciadora.

INTRODUCCION

POLISACARIDOS - GENERALIDADES

Los hidratos de carbono desempeñan en el organismo funciones energéticas y estructurales. El animal los emplea como fuente de energía y cuando los recibe en exceso los almacena como polisacáridos o los convierte en grasas para utilizarlos en el momento oportuno. Los polisacáridos son hidratos de carbono con unidades monosacarídicas enlazadas formando cadenas lineales o ramificadas. Estas unidades monosacarídicas pueden ser iguales (homopolisacáridos) o diferentes (heteropolisacáridos).

Las funciones biológicas de los polisacáridos son principalmente dos: a) como almacenadores de energía, tal es el caso del almidón (1), fructanos (2) ó galactomananos (3) en plantas; del glucógeno en animales (4), hongos (5), algas (6) y bacterias (4); o del paramilon en algunas algas (7) y b) como elementos estructurales formando parte de la pared celular, actuando de nexo entre otros componentes de la pared celular o controlando la permeabilidad de ésta (8-14).

Los polisacáridos se diferencian entre sí por el tipo de monosacáridos que los forman, por las uniones entre estos y por la existencia o no de ramificaciones. En este caso nos resultan de interés, específicamente, los

polisacáridos formados por uniones glucosídicas $\alpha 1,4$ y $\alpha 1,6$ y en particular el glucógeno.

Este tipo de polisacárido está ampliamente distribuido en la naturaleza, así se encontró el glucógeno en vertebrados (4), invertebrados (15), hongos (5), algas (6) y bacterias (4). En plantas superiores el polisacárido de reserva es el almidón (1), pero también se halló otro del tipo del glucógeno (fitoglucógeno) en algunas variedades de maíz (16) y *Cecropia peltata* (17).

POLISACARIDOS DE PLANTAS

Almidón

Los componentes naturales del almidón son la amilopectina y la amilosa. Ambos son homopolímeros de α -D-glucosa con uniones glucosídicas $\alpha 1,4$ en el caso de la amilosa y $\alpha 1,4 - \alpha 1,6$ en el caso de la amilopectina. La proporción de amilopectina y amilosa en el almidón varía según el vegetal y puede poseer también una pequeña proporción de lípidos, nucleótidos y proteínas (18).

Amilosa

Su estructura esencialmente lineal le otorga propiedades específicas. Forma hélices que se empaquetan en un arreglo hexagonal con características hidrofóbicas en su interior. Estos bolsillos hidrofóbicos le permiten formar complejos con ácidos grasos, alcoholes de bajo peso

molecular y con iodo. Los complejos formados con el iodo son dependientes de la temperatura e involucran la inclusión del iodo dentro de la hélice de amilosa. Son complejos de color azul con una longitud de onda de máxima absorción a 660 nm. En presencia del reactivo de Krisman(19), esto es $I_2/K/CaCl_2$, los complejos formados son más estables y la longitud de onda de máxima absorción es de 640 nm.

Los cristales helicoidales que forma la amilosa la hacen capaz de retrogradar un agua, esto es cristalizar en forma espontánea ya que las moléculas pueden alinearse formando puentes de hidrógeno (18).

Cada molécula de amilosa posee 1 ó 2 ramificaciones lo cual explica que no sea totalmente degradada por la acción de la β -amilasa. El tratamiento combinado con β -amilasa e isoamilasa resulta en un 95% de conversión a maltosa (20).

Amilopectina

Es el componente ramificado del almidón. Es estable en solución acuosa, y su afinidad por el iodo es menor que la de la amilosa. Los complejos formados con el reactivo de Krisman(19) son de color púrpura con un máximo de absorción entre 520-540 nm. La β -amilolisis de la amilopectina rinde un 50 a 60 % de conversión a maltosa ya que la enzima actúa sobre las cadenas externas y se detiene a una distancia de 2

a 3 unidades de glucosas antes de un punto de ramificación (18).

POLISACARIDOS DE ANIMALES

Glucógeno

El glucógeno es un homopolisacárido de reserva de α -D-glucosa altamente ramificado. Sus uniones glucosídicas son α 1,4 y α 1,6. Se diferencia de la amilopectina por tener un mayor porcentaje de uniones α 1,6. En la Tabla I se presentan algunas propiedades comparativas entre el glucógeno, la amilopectina y la amilosa.

La alta ramificación del glucógeno y su alto peso molecular le confieren características que le son propias. Estas características son: a) alta solubilidad por lo que no necesita almacenarse en organelas como lo hace el almidón en el amiloplasto (21); b) fácil movilización, lo cual le permite al organismo una rápida y eficiente provisión de glucosa y c) baja presión osmótica, mucho menor que la que ejercería una cantidad equivalente de glucosas libres.

Se han propuesto varios modelos de la estructura espacial del glucógeno. Luego de cuidadosos estudios (22) se demostró que estaría de acuerdo con la propuesta por el modelo arbóreo. A partir de estos datos que sugerían la existencia de tres tipos de cadenas A, B y C (Fig.1), el modelo arbóreo propone una ramificación regular, de manera que cada cadena B tiene por lo menos una cadena A y todas

	Glucógeno	Amilopectina	Amilosa
PM	10 ⁶ - 10 ⁷	10 ⁷ - 10 ⁸	10 ⁶
LC	10-14	20-25	10 ³
CE	6-9	12-17	
CI	3-4	5-8	
Glc α 1,6(%)	8-10	4-5	1-2
...	460	520	640
Conversión a maltosa			
con β -amilasa(%)	40-50	50-60	70

Tabla 1- *Propiedades comparativas del glucógeno, la amilopectina y la amilosa.*

LC: longitud promedio de cadena, medida en unidades de glucosa.

CE: longitud promedio de cadena externa.

CI: longitud promedio de cadena interna.

Glc α 1,6(%): porcentaje de ramificación.

las cadenas se extienden hacia la periferia de la molécula.

De ser así la densidad de las cadenas terminales en la superficie limitarían el crecimiento ulterior. Sin embargo distintos estudios demostraron que en el interior de la molécula existen cadenas que no llegan a la superficie (23). Para explicar este hecho se propuso un modelo multiramificado pero no regular, en el cual el tamaño no está limitado por la concentración de cadenas terminales en la superficie. Este modelo no postula cual es el factor determinante que detiene el crecimiento de la molécula (22).

En general el glucógeno presenta pesos moleculares entre 10^6 y 3×10^7 según el método de extracción y el organismo del cual se extrae (24).

La observación al microscopio electrónico revela la existencia de tres niveles estructurales de organización, cada uno con tamaño y morfología característicos. Las partículas más grandes aparecen en forma de racimo o rosetas de tamaño variable en el rango de 60-200 nm. con un promedio de 150 nm de diámetro; son las llamadas partículas α . Estas a su vez, están compuestas por unidades menores llamadas partículas β , de forma ovoide o poliédrica, cuyo tamaño varía de 20-40 nm de diámetro. Finalmente, dentro de las partículas β se observa una estructura más fina, las

partículas γ que presentan formas de bastón con un tamaño entre 3 y 20 nm(25).

En el hígado, el glucógeno se encuentra formando partículas α . En el músculo, se describieron partículas β , y más recientemente también partículas α (26).

Respecto a los complejos que el glucógeno forma con el I_2 , en presencia del reactivo de Krisman(19), éstos adquieren un color marrón característico con una longitud de onda de máxima absorción a 460 nm.

METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN MAMIFEROS

El estudio del metabolismo del glucógeno llevó a descubrimientos importantísimos sobre la base molecular de la regulación enzimática. Este fue el primer polisacárido sintetizado "in vitro", a partir del UDP-glc, con características similares al glucógeno nativo (24,27). A partir de los estudios realizados sobre su regulación a nivel de la fosforilasa b se descubrió el AMPc (28), y la regulación por fosforilación y desfosforilación de la fosforilasa y glucógeno sintetasa (29).

Los estudios sobre el metabolismo del glucógeno, también demostraron que la síntesis y degradación del mismo se produce por reacciones diferentes.

En la Fig. 2 se presenta un esquema de los pasos de síntesis y degradación del glucógeno con las enzimas involucradas en los mismos.

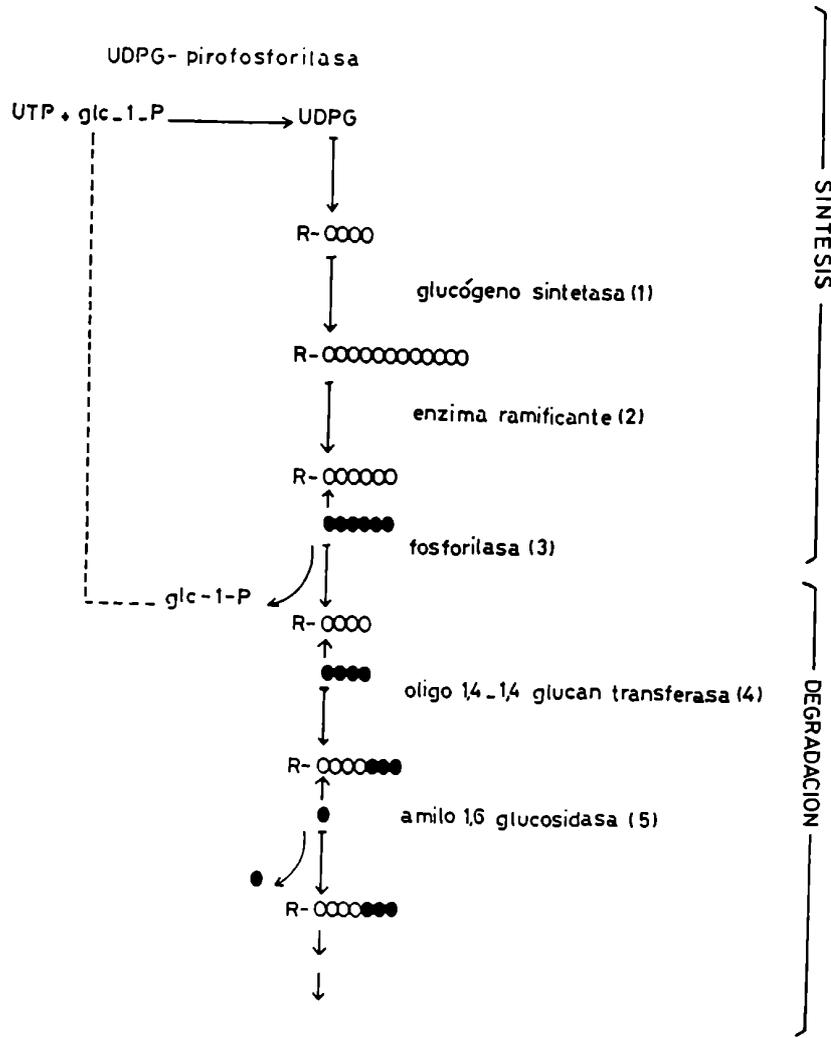


Figura 2- Síntesis y degradación del glucógeno.

Síntesis

La síntesis del glucógeno ocurre en tres etapas distintas: a) Iniciación, b) Crecimiento y c) Terminación (30). La segunda de ellas es la más estudiada y los mecanismos de su regulación son ampliamente conocidos. El proceso de iniciación no ha sido, aún, del todo aclarado, y se desconoce la naturaleza del proceso de terminación.

a) INICIACION

Desde el descubrimiento de las enzimas responsables de la formación de las uniones glucosídicas $\alpha 1,4$ (glucógeno sintetasa) y $\alpha 1,6$ (ramificante) del glucógeno, se planteó la necesidad de conocer como se inicia su biosíntesis (31).

Los primeros estudios realizados para dilucidar el mecanismo de iniciación de la biosíntesis del glucógeno fueron realizados por Krisman y su grupo de investigación. Demostraron que una fracción microsomal de hígado de rata libre de glucógeno, catalizaba la transferencia de restos glucosilo de UDP-glc a un compuesto insoluble en TCA (32,33). La transferencia de esos restos glucosilo requería una alta concentración salina. En presencia de un aceptor exógeno como el glucógeno, la marca se incorporaba a una fracción soluble en TCA e insoluble en etanol. Por otro lado la marca incorporada al material insoluble en TCA se podía solubilizar por tratamiento ácido suave, y por la acción de

enzimas amilolíticas y proteolíticas, lo que indicaba que el compuesto sintetizado era un glucano $\alpha 1,4$ unido a proteína. Krisman y Barengo (34) confirmaron que este proteoglucano era un intermediario en la síntesis del glucógeno.

A partir de estas evidencias se postuló el modelo de la Fig. 3 para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno. Según este modelo la formación del "acceptor" o "primer" tiene lugar por adición de restos glucosilos del UDP-glc a una proteína endógena que actúa como aceptora (34). Es una enzima nueva que llamaron glucógeno sintetasa iniciadora la que transfiere las primeras moléculas de glucosas a una proteína sintetizando un oligosacárido unido a ella. Sobre este glucano $\alpha 1,4$ unido a la proteína la glucógeno sintetasa une restos glucosilos $\alpha 1,4$. La enzima ramificante los reordena introduciendo los puntos de ramificaciones con uniones $\alpha 1,6$. De esta manera se origina "de novo" una molécula de glucógeno siendo el producto final una molécula de glucógeno unida a proteína (32-34).

Este mecanismo de iniciación de la biosíntesis del glucógeno fue demostrado "in vitro" en varios tejidos de mamíferos (32-34), bacterias (35,36), y en hongos (37).

En el año 1986 se demostró que la glucosa unida covalentemente a la proteína comigraba en geles de poliacrilamida con la glucógeno sintetasa de músculo cardíaco de rata (38). A partir de estos datos se postuló

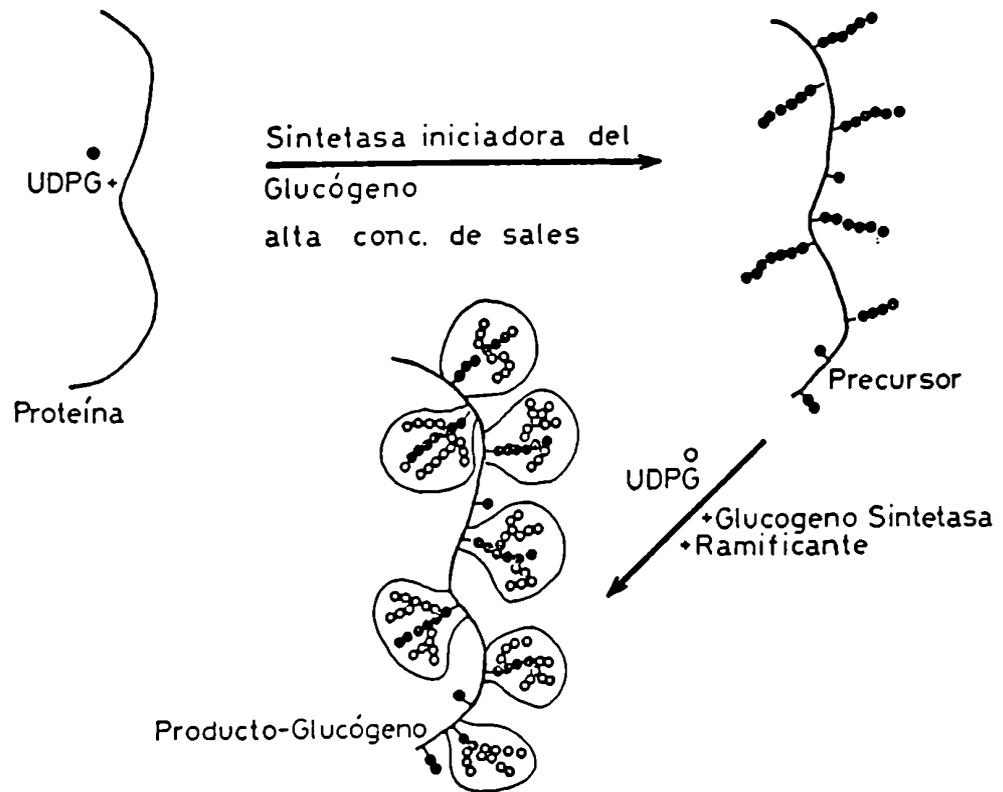


Figura 3- Modelo de Krisman para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno (32-34).

que la glucoproteína formada puede ser o bien una proteína asociada fuertemente a la enzima o la enzima misma. Analizando la bibliografía referente al tema se comprobó que en el año 1976 Nimmo y col. demostraban que la glucógeno sintetasa de músculo de conejo purificada comigraba con una banda que reaccionaba positivamente con el reactivo de Schiff (39). El grupo de Cohen (40) logró separar, a partir de glucógeno sintetasa de músculo de conejo, un componente proteico de 38 KDa que coincide en peso molecular con la glucogenina aislada por Whelan (41) a partir de glucógeno del mismo tejido. Resultados similares se obtuvieron a partir de retina bovina (42).

Teniendo en cuenta el modelo propuesto (Fig. 3) los residuos glucosilos unidos covalentemente a la glucogenina podrían ser los transferidos por la glucógeno sintetasa iniciadora antes de que actúen la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante.

b)Crecimiento

El crecimiento de los "aceptores" o "primers" formados en la iniciación o utilizando aceptores celulares polisacáridicos involucra dos etapas: a) alargamiento de las cadenas glucosídica $\alpha 1,4$ debido a la actividad de la glucógeno sintetasa (UDP-glc: $\alpha 1,4$ glucan- $\alpha 1,4$ glucosil-transferasa E.C. 2.4.1.11) y b) ramificación de las cadenas elongadas en el paso anterior por la acción de la

enzima ramificante (α 1,4 glucan - α 1,4 glucan - α 6 glucosil transferasa, E.C. 2.4.1.18). Los pasos a y b se esquematizan en las reacciones 1 y 2 de la Fig. 2.

Glucógeno sintetasa

La glucógeno sintetasa cataliza la transferencia de glucosas del UDP-glc al extremo no reductor de una cadena glucosídica α 1,4 sintetizando una nueva unión α 1,4. El peso molecular de la sintetasa nativa oscila entre 140-500 kDa y por análisis en geles desnaturalizantes la subunidad tendría alrededor de 85 KDa. Estos datos demuestran que la glucógeno sintetasa es una proteína oligomérica (43, 44).

Observaciones derivadas de los estudios regulatorios de la glucógeno sintetasa de músculo esquelético de conejo evidenciaron la presencia de dos formas cinéticas distintas e interconvertibles, ambas formas son distinguibles por la sensibilidad a la activación por glc-6-P. La interconversión entre las dos formas de la enzima se correlacionó con un proceso de fosforilación y desfosforilación específica. Surgen así, la forma D, dependiente de glc-6-P, que contiene un grupo fosfato unido en forma covalente y baja actividad en ausencia de glc-6-P, y la forma I, defosforilada e independiente de glc-6-P

La hormono dependencia de la interconversión de las especies de sintetasa le dió un significado funcional a la fosforilación y desfosforilación de la enzima. Las hormonas,

tales como el glucagon y la epinefrina, encargadas de movilizar las reservas de carbohidratos, promueven, por fosforilación, el aumento de la forma D inactiva en hígado y músculo, deteniendo la síntesis de glucógeno. Por otro lado, la insulina aumenta la forma I, activa por defosforilación, estimulando la formación de glucógeno. Numerosos laboratorios afirman la validez de este modelo hormonal.

Las glucógenos sintetetasas de un gran número de fuentes mostraron existir en formas distinguibles por su sensibilidad a glc-6-P, aún en organismos sin control hormonal clásico, siendo las levaduras el mejor ejemplo (44).

La glucógeno sintetasa tiene una alta afinidad por el glucógeno (45). Ha sido purificado de casi todos los tejidos de mamíferos, fundamentalmente de músculo, de hígado, tejido adiposo, corazón, riñon y placenta (43).

ENZIMA RAMIFICANTE

La enzima ramificante es la encargada de transferir un fragmento de una cadena de glucosas con uniones glucosídicas $\alpha 1,4$ (dador) por ruptura de una de dichas uniones a un aceptor, que puede o no ser el dador original, generando una unión $\alpha 1,6$ (Fig. 2. reacción 2). "In vivo" el sustrato dador probablemente sea una cadena externa de una molécula de glucógeno que está siendo elongada por la glucógeno sintetasa y el aceptor el trozo remanente de esta cadena o

alguna cadena adyacente. De esta forma la enzima ramificante es la responsable de introducir los puntos de ramificación en el glucógeno. El grado de ramificación del glucógeno se expresa como porcentaje (% α 1,6) y a partir de él se puede calcular el CL (largo promedio de cadena).

El estudio de glucógenos de diferentes fuentes dio como resultado valores de CL entre 10 y 14 y un porcentaje de ramificación entre 7 y 10.

A partir del hecho de que el glucógeno se forma por una acción concertada entre una actividad de elongación de las cadenas α 1,4 (sintetasa) y una ramificación de dichas cadenas por introducción de una unión α 1,6 (ramificante) es que se postuló que las actividades relativas de las enzimas glucógeno sintetasa y ramificante, serían las responsables de la estructura final del polisacárido. Así, una alta actividad relativa de glucógeno sintetasa daría por resultado un glucógeno con bajo porcentaje de ramificación. Por otro lado, una baja actividad relativa de sintetasa originaría un polisacárido con un alto grado de ramificación (46). Si este postulado fuera correcto, debería existir una regulación de la enzima ramificante paralelo al de la sintetasa pero aún no se han demostrado evidencias de un mecanismo regulatorio para esta enzima.

Se estudio la enzima ramificante de hígado de rata (47,48), músculo de conejo (49), hígado de conejo (50), maíz

dulce (51), otros tipos de maíces (52), sorgo (53), levaduras (54), E. coli (55), arroz (56) y Neurospora Crassa (57).

Ramificantes de mamíferos y bacterias

En casi todos los tejidos las enzimas ramificantes presentan microheterogeneidad, evidenciable por isoelectroenfoque (50). Esta presencia de isoenzimas no se observó en E. coli (55) ni en Neurospora Crassa (57), de las que sólo se obtuvo una especie. Por electroforesis en geles desnaturizantes se obtiene siempre una única banda indicando que, en todos los casos, la proteína tiene un solo tipo de monómero con un peso molecular entre 71 y 84 kDa según la fuente analizada. Los pesos moleculares de las distintas enzimas ramificantes son: 82 kDa para la del hígado de rata (48), 71 kDa para la de hígado de conejo (50), 77 kDa para músculo de conejo (49), 84 kDa para la de E. coli (55) y 80 kDa para la de N. crassa (57); todos ellos medidos en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

En el año 1979 Korneeva y col. describieron que la enzima ramificante de músculo de conejo estaba asociada a un RNA de 2.5 S (58). La actividad enzimática dependía en este caso, de la presencia del RNA. Otros autores trataron de confirmar este hecho pero fracasaron (49). Posteriormente el grupo de Satoh y Sato (48) logró aislar una especie enzimática asociada al RNA de 2.5 S a partir de hígado de

rata. En este caso el RNA no era esencial para la actividad y se vio que la asociación RNA-proteína, si existía, era débil.

Ramificantes de plantas

Con respecto a las enzimas ramificantes de origen vegetal se han estudiado en detalle las provenientes de papa (59), maíz dulce (51), mutantes de maíces (52), hojas de espinaca (60), arroz (56) y sorgo (53).

Al igual que las enzimas ramificantes de mamíferos, las vegetales también presentan microheterogeneidad. Algunos autores postularon que probablemente la microheterogeneidad de las enzimas ramificantes sería la responsable de la estructura asimétrica de la amilopectina (61). Esta asimetría tiene en cuenta la relación de cadenas A (Fig. 1) por cadenas B (A:B). Para la amilopectina este valor es 2 y para el glucógeno es 1. Este postulado no se ha podido demostrar y no explica porqué en mamíferos, donde la estructura del glucógeno es más simétrica, también existe microheterogeneidad (50).

No obstante las pequeñas diferencias entre los pesos moleculares de las ramificantes de distintos tejidos todos los valores caen dentro de un rango entre 75-85 kDa, con excepción de la enzima de arroz, cuyo valor es de 40 kDa (62). Los pesos moleculares de las ramificantes vegetales

oscilan entre 80 kDa para las de maíz (63,64) y hojas de espinaca (65) y 85 kDa para la de papa (59).

Dentro de las enzimas ramificantes de plantas es importante destacar un caso especial, el del maíz dulce. En este maíz existe además del almidón, el fitoglucógeno como polisacárido de reserva. A partir de extractos de maíz dulce se pueden obtener dos tipos de actividades ramificantes, una que transforma amilosa a amilopectina y otra que transforma tanto la amilosa como la amilopectina para dar fitoglucógeno (14,51)

Mecanismo de acción de la enzima ramificante.

Como ya se dijo la enzima ramificante es la responsable de la formación de los puntos de ramificación del glucógeno y de la amilopectina.

Trabajos realizados por Larner (66) y luego corroborados por Verhue y Hers (67) dilucidaron el mecanismo por el cual la enzima ramificante introduce las uniones glucosídicas $\alpha 1,6$. Las posibilidades que se presentaban eran dos y se esquematizan en la Fig. 4.

La enzima ramificante es una transglucosilasa capaz de transferir un segmento terminal de una cadena a una posición 6 de una glucosa no terminal. Si bien se sabía que existía un requerimiento específico del largo de la cadena para que pueda ocurrir la ramificación, el tamaño del segmento que se transfería no se conocía. Así surgió la duda sobre si lo que

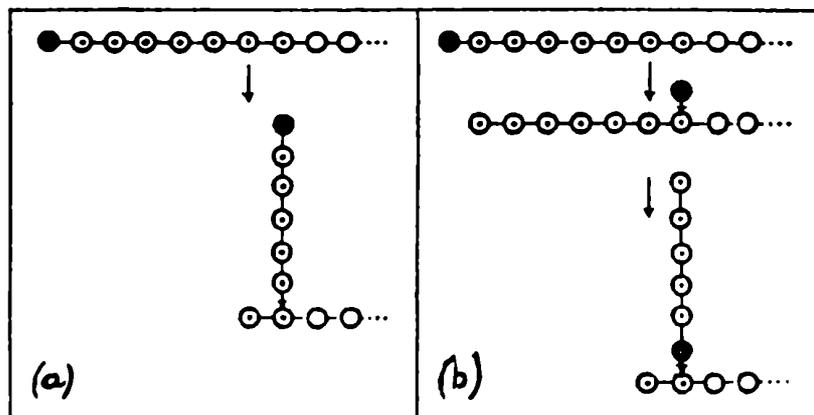


Figura 4- Representación esquemática de los posibles mecanismos de acción de la enzima ramificante (67).
 a) Transferencia de un trozo de cadena de glucosas $\alpha 1,4$; de una posición 4 a otra posición 6.
 b) Transferenciaa secuencial de una glucosa terminal a una posición 6 y sobre ésta una posterior transferencia de un resto maltopentosilo.

se transfería era el segmento entero o si había transferencias sucesivas de las glucosas de a una por vez.

Estos autores demostraron que la transferencia es por una única transglucosilación del oligosacárido (Fig. 4, panel a) y la glucosa periférica no reductora mantiene estas características luego de la ramificación (67).

Verhue y Hers (67) demostraron también, que la enzima ramificante de hígado de rata transfiere con preferencia oligosacáridos de 6-7 unidades de glucosa. Larner demostró que las cadenas externas del glucógeno deben tener una longitud mínima de 6 unidades de glucosa para que pueda actuar la enzima ramificante (66). Según los resultados de Brown y Brown, las enzimas ramificantes de músculo e hígado poseen la misma especificidad en cuanto a la longitud de cadena transferible (68).

Si bien este mecanismo de acción parece ser común a las enzimas de todas las fuentes estudiadas, éstas difieren en el requerimiento de longitud de cadena, lo cual resulta en la formación de diferentes productos.

Métodos de dosaje de la enzima ramificante

La determinación de la actividad ramificante presenta dificultades originadas en el hecho de que su mecanismo de acción no involucra una síntesis neta de polisacárido.

Además, los métodos desarrollados son poco sensibles o no cuantitativos.

El método más utilizado originalmente fue el descrito por Larner (69) basado en la disminución en la absorbancia a 520 nm del complejo amilopectina- I_2 . La definición de unidad enzimática utilizada era "la cantidad de enzima que disminuye en 0,001 unidades la densidad óptica por minuto en condiciones previamente establecidas". Este método no permitía relacionar dicha disminución con el número de uniones $\alpha 1,6$ sintetizadas por la actividad enzimática. Otro problema que presentaba era la interferencia por α -amilasa, ya que también producía una disminución en la densidad óptica, pero en este caso, por degradación.

Para eliminar esta interferencia, Krisman (70) desarrolló un método que permite determinar en forma diferencial las concentraciones de diferentes polisacáridos $\alpha 1,4$ $\alpha 1,6$. Dicho método se basa en la formación de complejos con $I_2/KI/CaCl_2$ (reactivo de Krisman) que son estables y específicos de polisacárido, a diferencia de lo que ocurre con los complejos con I_2 . Los complejos amilopectina- $I_2/KI/CaCl_2$ y glucógeno- $I_2/KI/CaCl_2$ pueden determinarse por medición de la absorbancia a 520 y 460 nm respectivamente. De ésta manera, incubaciones paralelas con glucógeno permiten determinar la actividad de α -amilasa presente en la preparación de enzima ramificante ya que éste

no es sustrato para esta última enzima. La actividad ramificante se calcula entonces por la disminución de la absorbancia a 520 nm menos la disminución de la absorbancia a 460 nm.

En el año 1966 Brown y Brown (68) desarrollaron un método alternativo para la determinación de la actividad ramificante. Este método se basa en la capacidad de la enzima ramificante de modificar la velocidad de formación de polisacárido a partir de fosforilasa y Glc-1-P. En ausencia de enzima ramificante, la formación de polisacárido (en este caso amilosa) es lenta debido a la baja concentración de glucosas terminales con las cuales reacciona la fosforilasa. La presencia de enzima ramificante aumenta el número de glucosilos terminales, acelerando la formación de polisacárido con liberación de ortofosfato. Así, la medición de la liberación de fosfato a partir del Glc-1-P permite determinar en forma indirecta la actividad ramificante.

Finalmente, Krisman y Kopun (71) desarrollaron otro método, por el cual también se elimina la interferencia por α -amilasa. Este se basa en la síntesis de un polisacárido ramificado a partir de una pequeña cantidad de glucógeno como "primer", Glc-1-P, fosforilasa y la muestra de enzima ramificante. El polisacárido sintetizado se mide con el reactivo de Krisman (19). Al igual que los otros métodos colorimétricos de dosaje de polisacáridos éste tampoco

indica el número de uniones $\alpha 1,6$ que introdujo la ramificante.

Degradación

La degradación del glucógeno involucra dos etapas, al igual que la etapa de crecimiento. Estas etapas involucran el acortamiento de las cadenas externas con uniones glucosídicas $\alpha 1,4$ por la acción de la enzima fosforilasa (E.C. 2.4.1.1, Fig. 2, reacción 3) (72) y posterior desramificación de la dextrina límite formada. Esta desramificación se lleva a cabo por el sistema desramificante (E. C. 3.2.1.33) que tiene dos actividades enzimáticas, una oligo $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,4$ glucoantransferasa y una amilo $\alpha 1,6$ glucosidasa (Fig. 2, reacciones 4 y 5). "In vitro", el glucógeno también puede ser degradado por α -amilasas y α -glucosidasas de mamíferos. La α -amilasa está ampliamente distribuida en los tejidos y es una endoenzima que hidroliza uniones $\alpha 1,4$. Por otro lado las glucosidasas son exoenzimas ácidas que hidrolizan uniones $\alpha 1,4$ y $\alpha 1,6$ por lo que degradan completamente al glucógeno.

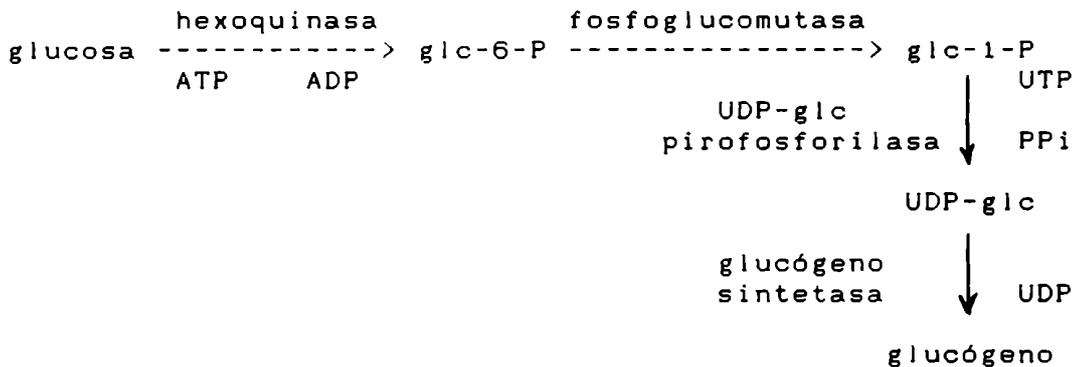
REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO

Es sabido que el hígado y el músculo esquelético son los tejidos donde se acumula en mayor proporción el glucógeno de los mamíferos.

En el hígado, el glucógeno es poco utilizado como fuente de energía inmediata, ya que consume principalmente ácidos grasos. La glucosa es almacenada en forma de glucógeno cuando se halla en exceso, y es liberada, durante el ayuno para ser utilizada por otros tejidos como cerebro (73).

El músculo esquelético utiliza el glucógeno como fuente de energía inmediata, durante la contracción muscular. Durante la contracción, el consumo de glucógeno genera ATP y ácido láctico. Este llegaría al hígado por vía sanguínea y allí se convierte en glucosa, ya sea directamente o a través del glucógeno (74). La glucosa vuelve al músculo por vía sanguínea, en un proceso conocido como ciclo de Cori.

Para la conversión de glucosa a glucógeno se conocen dos vías, a) una directa que se esquematiza de la siguiente manera:



y b) una indirecta en la cual la glucosa se metabolizaría primero a triosa y luego a glucógeno por la vía gluconeogénica (4).

En el organismo la glucemia se mantiene en valores bastante constantes a pesar de alternar alimentación y ayunos cortos. Esto se debe al control homeostático y hormonal de la síntesis y degradación del glucógeno.

La regulación hormonal del metabolismo del glucógeno tiene lugar a nivel de la glucógeno sintetasa (para la síntesis) y de la fosforilasa (para la degradación). Ambas enzimas existen en dos formas interconvertibles. La interconversión entre la forma activa y la inactiva está regulada en músculo por adrenalina e insulina, y en hígado, también influye la noradrenalina y glucagón. También existe una regulación no hormonal como es el caso del Ca^{+2} a nivel de músculo.

La interconversión enzimática está controlada de forma coordinada, así la activación de la enzima glucogénica es simultánea a la inactivación de la glucogenolítica y viceversa.

En animales bajo régimen alimenticio normal la administración de adrenalina resulta en la fosforilación de la glucógeno sintetasa disminuyendo su actividad enzimática. Por el contrario la administración de insulina disminuye el

grado de fosforilación de la enzima aumentando su actividad (75,76).

GLUCOGENO EN CEREBRO

La concentración de glucógeno en el cerebro es pequeña, aproximadamente 0,1g/100g de tejido fresco, en comparación con lo hallado en músculo (1,0g/100g) y en hígado (6g/10g). La importancia fisiológica del glucógeno en el cerebro no está totalmente aclarada ya que éste depende de la glucosa circulante para mantener sus funciones metabólicas, si bien se acepta generalmente que constituye una fuente disponible ante una disminución de glucemia. Sin embargo esta reserva tan limitada de glucógeno hace que el cerebro sea muy vulnerable a daños, en pocos minutos, por hipoglucemia y/o hipoxia. Durante la hipoglucemia, otros tejidos disminuyen la utilización de la glucosa, dejándola a disposición del cerebro.

Como ya señalamos, el metabolismo del glucógeno en el hígado se halla bajo control hormonal y neural permitiendo una respuesta sensible a las necesidades del cerebro.

La localización del glucógeno en cerebro, analizada por microscopía electrónica, difiere en animales inmaduros y en los adultos. En los primeros los gránulos de glucógeno se localizan en la glía y en las neuronas pero en los adultos sólo se observan en los astrocitos (77).

Luego de la administración de barbitúricos, que se sabe disminuyen el metabolismo cerebral, aumenta el número de gránulos de glucógeno que se depositan en las regiones

sinápticas. Asociados a los gránulos de glucógeno se encuentran las enzimas involucradas en la síntesis del mismo y probablemente también las de la degradación (89). Estas enzimas difieren en sus propiedades cinéticas y regulatorias de las correspondientes a otros tejidos (78).

El metabolismo del glucógeno en el cerebro, a diferencia del músculo y del hígado, es controlado localmente ya que se encuentra aislado por la barrera hematoencefálica.

En el cerebro, como en otros tejidos, la glucógeno sintetasa se presenta en dos formas interconvertibles por fosforilación, la forma "D" dependiente de Glc-6-P y la "I" independiente de Glc-6-P. La forma I no requiere estimulador y tiene baja afinidad por el UDP-Glc (78). También en el cerebro la fosforilasa del glucógeno, presenta dos formas, una inactiva y dependiente de AMP (b) y otra activa (a) aún a bajos niveles de AMP. Ambas se interconvierten por fosforilación.

El sistema de desramificación en el cerebro se halla presente en forma completa (77).

Desórdenes metabólicos cerebrales que involucran al glucógeno.

Se conocen varios desórdenes metabólicos cerebrales que involucran a las enzimas del metabolismo del glucógeno.

Deficiencia en el Sistema de desramificación.
(Glucogenosis tipo III)

Las deficiencias en este sistema enzimático causan efectos generalizados y han sido demostrados en eritrocitos, leucocitos, músculo, hígado, etc. Esta deficiencia causa disfunción hepática en los niños con hepatomegalia, crecimiento retardado con disminución de la talla e hipoglucemia. El músculo presenta miopatías vacuolares con depósitos de glucógeno. Por microscopía electrónica se vió que las vacuolas corresponden a acúmulos de glucógeno en el citoplasma.

En el cerebro, cuando no existe esta actividad enzimática, se ve un aumento en la concentración de glucógeno y el signo clínico presentado por la disfunción cerebral está limitado a convulsiones(77).

Deficiencia en la enzima ramificante
(Glucogenosis tipo IV).

Se han descripto defectos en la enzima ramificante en varios tejidos, entre ellos en el cerebro. Aunque los signos y la sintomatología de los pacientes con defectos a nivel de la enzima ramificante en el cerebro no son evidentes, se encuentran depósitos de un polisacárido anormal en todo el tejido si bien no dentro de las neuronas. Por microscopía electrónica se vió que el polisacárido anormal se deposita formando esferas de 600 nm de diametro (79).

Se ha encontrado otro tipo de desorden metabólico en el que la enzima ramificante se encuentra presente pero su punto isoeléctrico es diferente del de la enzima normal. Esta enfermedad llamada de los cuerpos de Lafora se caracteriza por epilepsia y demencia. Por métodos histológicos y bioquímicos se detecta un polisacárido con estructura heterogénea, una población de granulos densos y otra con ramificaciones muy irregulares. Esta patología produce la muerte de los pacientes antes de los 25 años. Puede afectar otros tejidos, como hígado, corazón y músculo liso y esquelético (80).

Deficiencia de la glucógeno sintetasa

Los casos descriptos, si bien son muy pocos ya que tienen escasa sobrevida, permiten demostrar que la deficiencia de la glucógeno sintetasa produce retardo mental, detención del crecimiento e hipoglucemia severa con cetonuria. El hígado y el cerebro están totalmente privados de glucógeno.

Se demostró que la glucógeno sintetasa se encuentra muy disminuida en hígado y cerebro pero es normal en eritrocitos, músculo y leucocitos, lo que sugiere la existencia de isoenzimas específicas de tejido que están bajo control genético independiente (77).

OBJETIVOS GENERALES DE ESTA TESIS

El objetivo de este trabajo es adquirir un mayor conocimiento acerca de la biosíntesis del glucógeno. Se estudiarán dos procesos, que si bien están relacionados, se analizarán en forma independiente. Estos procesos son: I) la ramificación del glucógeno en su etapa de crecimiento y II) la iniciación de su biosíntesis.

I) *Proceso de ramificación:* para poder medir en forma específica y cuantitativa la actividad ramificante, como así también su regulación y propiedades, se desarrollará un método adecuado de determinación enzimática.

Utilizando el método desarrollado se analizarán actividades ramificantes de diferentes tejidos para inferir algunas propiedades relacionadas con el mecanismo de acción de la enzima.

II) *Proceso de iniciación:* se tratarán de aclarar los puntos todavía oscuros de la iniciación de la biosíntesis del glucógeno. Con éste fin se utilizará, como fuente de enzimas y factores, cerebro de rata.

Como ya señalamos, el cerebro es un tejido particularmente interesante por acumular glucógeno en cantidad muy pequeña en el estado fisiológico y poseer toda

su batería biosintética activa. Se tratará de comprobar si en el cerebro es válido el modelo propuesto por Krisman (34) para la iniciación. En caso afirmativo se analizarán en detalle las actividades enzimáticas que forman el "primer" endógeno.

MATERIALES Y METODOS

Materiales: El glucógeno tipo II de hígado de conejo y de ostra fueron adquiridos a Sigma Chem. Co. La amilopectina y la amilosa fueron preparadas por el método de Cowie y Greenwood (81). El fitoglucógeno se preparó a partir de endosperma de maíz usando HgCl₂ 3% y fenol 40% (82).

Métodos analíticos: Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry (83). Utilizando el método del fenol-sulfúrico (84) se determinaron los azúcares totales y aquellos reductores se midieron según Somogyi (85). Los glucopolisacáridos α 1,4- α 1,6 como tales se determinaron utilizando el reactivo de Krisman (19). Los espectros de absorción de los polisacáridos se analizaron en un espectrofotómetro Hitachi 220A. Los extremos no reductores se determinaron por medio de una oxidación con periodato (86).

Sustratos radioactivos

La (¹⁴C)-glucosa-1-fosfato (220 Ci/mol) fue adquirida en New England Nuclear.

UDP-(¹⁴C)glucosa (285 Ci/mol) fue preparada según el método de Couso et al. (87) con ligeras modificaciones.

Todos los compuestos se diluyeron con los correspondientes sustratos no radioactivos (Sigma) hasta las actividades específicas que se indiquen en cada caso.

Enzimas auxiliares

Las enzimas utilizadas provinieron de las fuentes que se detallan a continuación: proteasa tipo VII P5380 (subtilisina, libre de actividad amilolítica), pronasa E, proteasa tipo XIV P5147, α -amilasa bacteriana tipo II A6380 y amiloglucosidasa A7255 de Sigma Chemical Co. La β -amilasa de cebada, de Mann Res. Lab.

OBTENCION DE ENZIMAS RAMIFICANTES

-De origen animal

a) *Hígado de rata*: se purificó según lo descrito por Krisman (47). Brevemente, las ratas fueron mantenidas durante 24 horas con una dieta normal suplementada con gran cantidad de agua con sacarosa. Fueron decapitadas y se les extrajo el hígado en forma inmediata, los cuales se perfundieron rápidamente con sacarosa 0,25M que contenía 2mM EDTA y 1mM 2-mercaptoetanol (Buffer B) a 4°. Luego se homogenizaron en un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón en tres volúmenes del mismo buffer. Se centrifugó a 100.000xg durante 2 horas y el sobrenadante se llevo a 50% de saturación con sulfato de amonio(SAM). La proteína

precipitada se resuspendió en un mínimo volumen de citrato de sodio 0,5M pH 6,5 (Buffer A).

b) *Hígado de conejo*: los hígados extraídos de los conejos se perfundieron rápidamente con buffer B. Luego se cortaron en pequeños trozos y se homogenizaron en dos volúmenes del mismo buffer. El homogenato se centrifugó a 25000xg durante 30 min., se descartó el pellet y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 100.000xg durante 60 min.

El sobrenadante de esta última centrifugación se llevó a 50% de saturación con sulfato de amonio. La proteína precipitada se resuspendió en un mínimo volumen de buffer A.

-De origen vegetal

a) *Papa* (fuente de enzima Q): dos papas medianas se pelaron bajo agua fría y se rallaron en un rallador de vidrio. Este material se filtró por un lienzo y el filtrado se llevó a 10mM con β -mercaptoetanol. El almidón se eliminó centrifugando a 5000xg durante 30 min. El sobrenadante libre de almidón se centrifugó a 25000xg durante 60 min. El sobrenadante obtenido se llevo a 50% de saturación con SAM. Luego de 24 hs a 4° se volvió a centrifugar a 25000xg durante 20 min y la proteína precipitada se resuspendió en buffer A.

b) *Maíz dulce*: los granos de maíz (100 g) se molieron con dos volúmenes de buffer B en una licuadora Omnimixer, Los

pericarpios y los granos molidos en forma incompleta se separaron filtrando el homogenato por un lienzo. El filtrado se centrifugó a 100000xg durante 2 hs. El pellet se descartó y el sobrenadante se fraccionó con SAM entre 0-30%, 30-50%, y 50-70% de saturación. Las proteínas precipitadas en todas las fracciones se resuspendieron en un mínimo volumen de buffer A luego de centrifugar 20 min a 25000xg.

-Fosforilasa b

La enzima fosforilasa b de músculo de conejo se preparó según lo publicado por Fisher y Krebs (88) o se utilizó un preparado comercial de Sigma Chem. Co. (Sigma P6635).

-Sistema desramificante

Las enzimas del sistema de desramificación del glucógeno se purificaron a partir de músculo de conejo hasta la precipitación con SAM (41% de saturación) según lo descrito por Brown y Brown (89).

OBTENCION DEL COMPLEJO DE INICIACION DE LA BIOSINTESIS DEL

GLUCOGENO A PARTIR DE CEREBRO DE RATA

Se utilizaron ratas Wistar de 200 g de peso mantenidas con una dieta normal de laboratorio. Estas ratas fueron decapitadas con guillotina e inmediatamente se extrajeron los cerebros, los cuales fueron colocados en buffer SEM

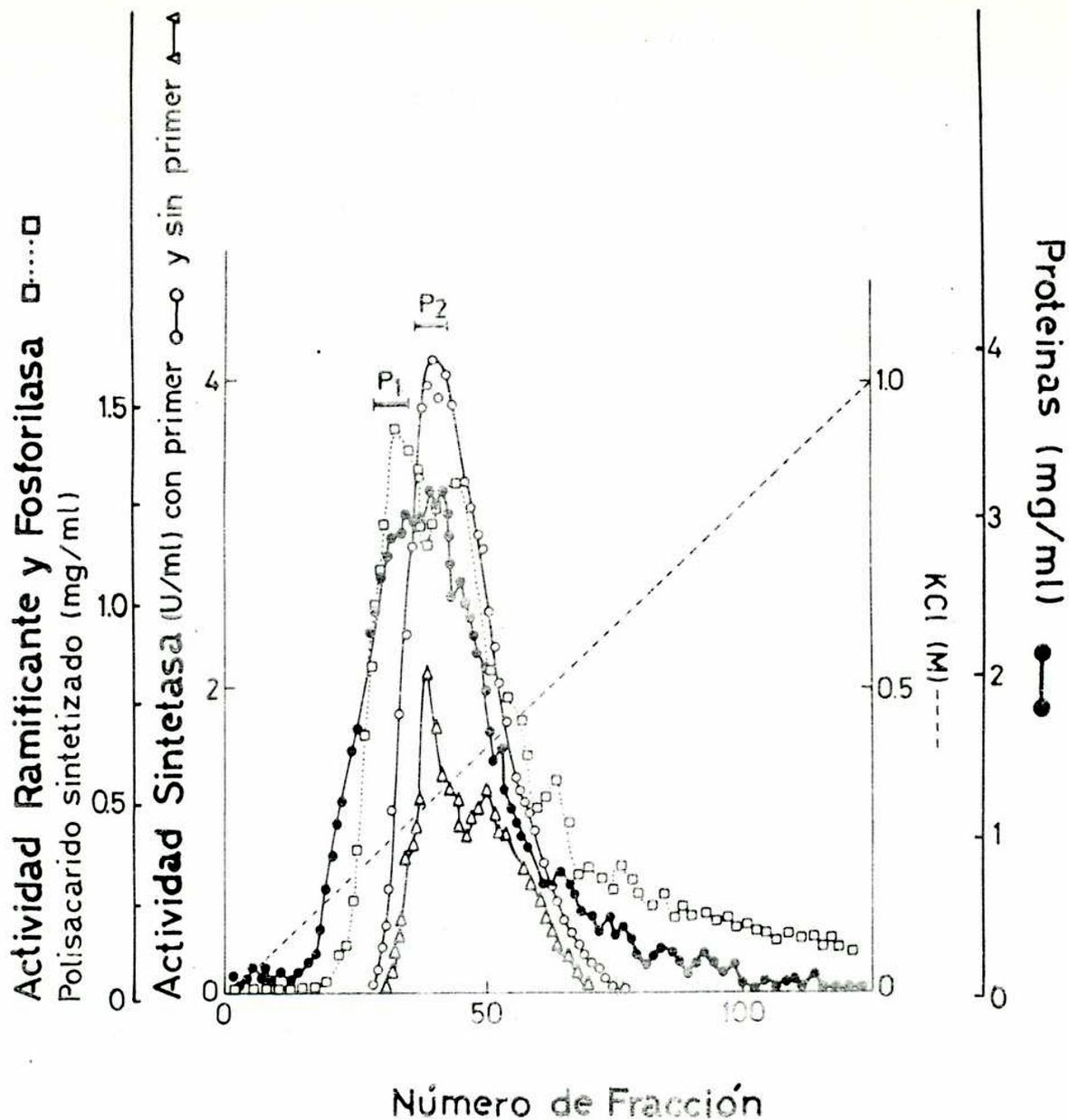


Figura 5- *Cromatografía en DEAE-celulosa.*
 El material del paso 2 (Tabla VI) se sembró en una columna de DEAE-celulosa (2.2 x 13 cm) equilibrada con buffer C. La elución se hizo con un gradiente lineal de 0-1 M de KCl en buffer C (150 ml). Se recogieron fracciones de 2 ml a 0.7 ml/min. Se determinó: ($\square-\square-\square$) actividad ramificante y fosforilasa, ($o-o$) actividad GS, ($\Delta-\Delta$) actividad GSI y ($\bullet-\bullet$) proteínas. Las fracciones se juntaron como se indica (P_1 y P_2) y se dializaron contra buffer C.

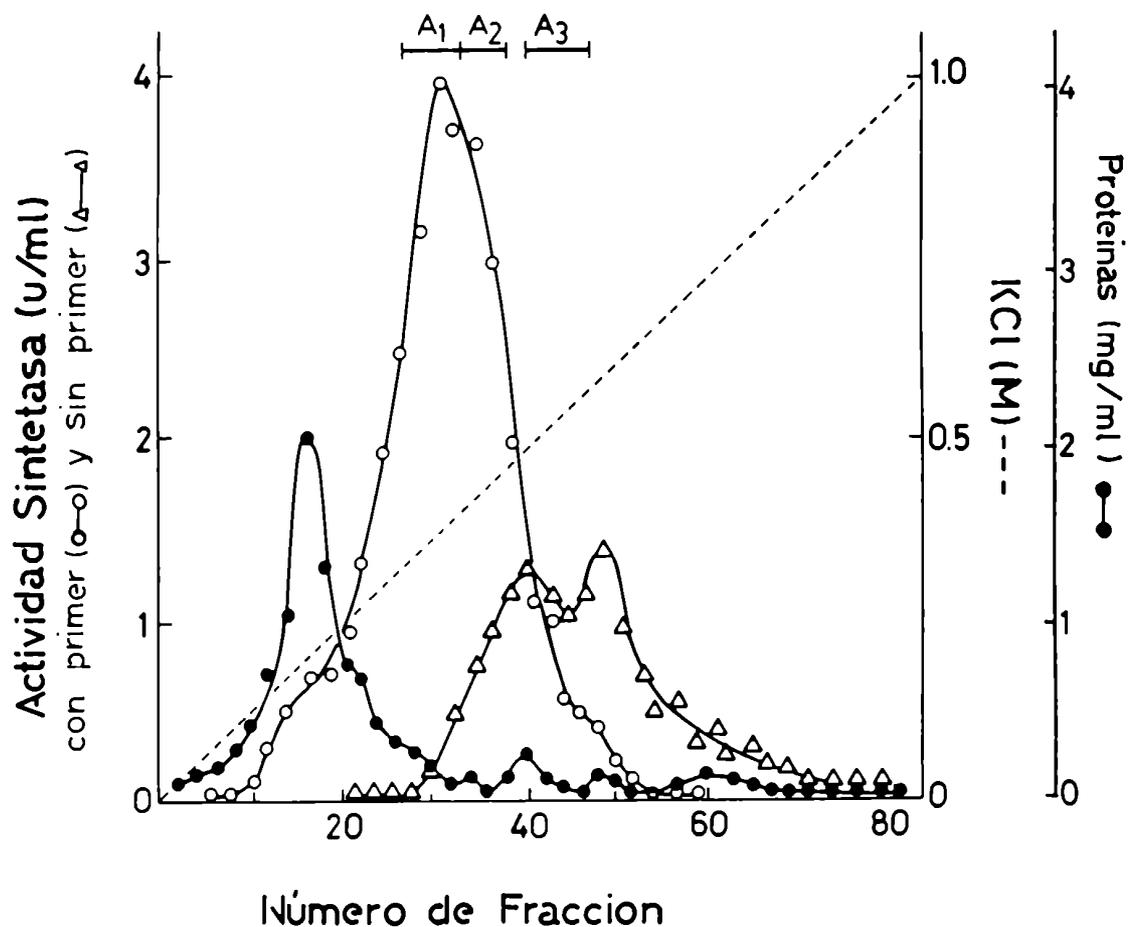


Figura 6- *Cromatografía en w-aminobutil agarosa.*
 La fracción P₂ dializada (Fig. 5) se sembró en una columna de w-aminobutil agarosa (0.9 x 13 cm) equilibrada con buffer C. La elución se hizo con un gradiente lineal de 0-1 M de KCl en buffer C (50 ml). Se recogieron fracciones de 1 ml a 10 ml/hora. Se determinó: actividad fosforilasa y ramificante (percolado), (o-o) actividad GS, (Δ-Δ) actividad GSI y (●-●) proteínas. Las fracciones se juntaron como se indica (A₁, A₂ y A₃).

(sacarosa 0.25 M, EDTA 5 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM, pH 7) helado. Los cerebros se homogenizaron en 2 volúmenes de buffer SEM conteniendo además PMSF 1 mM, utilizando un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a 4° C. El homogenato se centrifugó a 25000xg durante 60 min. y se descartó el pellet. El sobrenadante se llevó a 60% de saturación con sulfato de amonio anhidro y la proteína precipitada se resuspendió en un mínimo volumen de buffer C (glicina 50 mM, glicerol 25%, 2-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1mM, ph 8.6). Luego de dializar la proteína durante 24 hs contra el mismo buffer C, se aplicó en una columna de DEAE-celulosa (2,2 cm x 13 cm). Luego de lavar la columna con 150ml del buffer C, se aplicó un gradiente lineal de 150 ml de KCl entre 0 y 1M en buffer C. Las fracciones que tenían actividad enzimática se juntaron en P1 y P2 (Fig.5) y se dializaron exhaustivamente contra buffer C.

El P2 dializado se aplicó sobre una columna de W-aminobutil agarosa (0.9 cm x 13 cm) equilibrada en el mismo buffer. Luego de lavar se eluyó la proteína con un gradiente lineal de 50 ml de KCl entre 0 y 1M en buffer C. Nuevamente las fracciones activas se juntaron en A1, A2 y A3 (Fig. 6).

-OBTENCION DE GLUCOPOLISACARIDOS α 1,4- α 1,6

Glucógeno de hígado de rata y de conejo: los hígados de rata y conejo fueron digeridos con KOH 33% durante 15 min. a 100° y luego se los precipitó con tres volúmenes de etanol 96%, según lo descrito por Krisman (19). Luego de centrifugar a 5000xg durante 15 min. se descartó en sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0,1 ml de agua para reprecipitarlo dos veces y purificarlo.

Polisacáridos de papa: se pelaron dos papas medianas bajo agua fría y se rallaron en un rallador de vidrio. El material obtenido se filtró a través de un lienzo y se ajustó el filtrado a 10 mM de 2-mercaptoetanol. Luego se centrifugó a 5000xg durante 30 min. y el sedimento se secó secuencialmente con etanol, acetona, y éter. Este precipitado se sometió a un fraccionamiento con n-butanol/agua en una relación 1:7 según la técnica de Schoch(90), se autoclavó por 1-3 hs y se enfrió suavemente hasta temperatura ambiente. Por una centrifugación a 5000xg durante 15 min. se separaron los dos componentes del almidón. La amilosa se recuperó en la fracción insoluble en n-butanol y la amilopectina quedó en el sobrenadante (soluble en n-butanol).

Polisacáridos de maíz dulce: se molieron granos de maíz dulce y se les agregaron dos volúmenes de agua deionizada. Se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min. y luego se centrifugó a 5000xg durante 15 min. El sedimento obtenido se sometió a una nueva extracción con agua deionizada pero a 100°C por 5 min. Nuevamente se centrifugó a 5000xg durante 15 min. y se juntaron los sobrenadantes de ambas centrifugaciones. El polisacárido soluble en agua se precipitó con tres volúmenes de etanol 96% previo agregado de algunas gotas de una solución saturada de acetato de amonio. El precipitado obtenido en estas condiciones resultó ser el fitoglucógeno.

El sedimento insoluble en agua se fraccionó con n-butanol/agua (1:7) para separar amilosa de amilopectina .

El fitoglucógeno se obtuvo también a partir de endosperma de maíz utilizando HgCl₂ 3% y fenol 40%(82).

DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

-Actividad ramificante

Método A: este método es el descrito por Krisman(70) pero con mínimas modificaciones. La mezcla de reacción contenía 0,1-0,2 mg de amilopectina, buffer citrato 0,1 M pH 6,5 y la fuente de enzima a ensayar (0,012-0,2 µg de proteína) en un volumen total de 100 µl. Esta mezcla se incubó 30 min. a 37°C y se detuvo la reacción agregando 0,4 ml de ácido perclórico 6N. luego de centrifugar a 5000xg durante 10 min.

se separó el sobrenadante y a éste se le agregó 2,6 ml del reactivo de Krisman (19). La actividad de la enzima ramificante se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 520 nm.

Método B: este método se desarrolló en tres pasos i) Síntesis del polisacárido: la mezcla de reacción contenía 40 mmoles de Glc-1-P, 10 mmoles de 5'AMP, 15 mmoles de buffer citrato pH 6,5 , 50 µg de glucógeno, 0,8 mg de fosforilasa b preparada según lo descrito en la obtención de enzimas ó bien 11 µg de la preparación comercial Sigma P6635, y la enzima ramificante a analizar, en un volumen total de 200µl. La incubación se llevó a cabo a 37° durante 1-3 hs y se detuvo agregando 0,4 ml de ácido perclórico 6N. Luego de centrifugar a 3000 rpm durante 15 min. se separó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con el mismo ácido y se volvió a centrifugar. Luego de juntar ambos sobrenadantes se precipitó el polisacárido con tres volúmenes de etanol 96%. El polisacárido precipitado se separó por centrifugación a 3000 rpm. Cabe destacar que siempre fue necesario ensayar las soluciones nuevas de fosforilasa b, tal que la cantidad utilizada no produzca síntesis de polisacárido en ausencia de enzima ramificante.

ii) Purificación del polisacárido: con el fin de eliminar proteínas desnaturalizadas, se trató al polisacárido proveniente del paso i) con 0,9 ml de KOH 33%, se digirió

durante 15 min. a 100°C y se reprecipitó con tres volúmenes de etanol 96%. La muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y el precipitado se lavó y secó con éter. El polisacárido se disolvió en 0,1 ml de agua.

iii) Determinación de las glucosas involucradas en uniones α 1,6: para su medición se degradó el polisacárido con fosforilasa b y sistema de desramificación. La mezcla de incubación contenía 50 μ l de la solución de polisacárido, 60 mM de buffer fosfato pH 7, AMP 5mM, 1,2 mg de fosforilasa b preparada según lo ya descrito ó 17 μ g de la preparación comercial y 0,85 mg del sistema de desramificación. Luego de incubar 3 horas a 37° en un baño de agua con agitación se detuvo la reacción agregando tres volúmenes de etanol 96%. Luego de centrifugar a 3000 rpm por 15 min. se descartó el precipitado y en el sobrenadante se midieron las glucosas liberadas de los puntos de ramificación utilizando el método de Somogyi (85).

Actividad de transferencia de (¹⁴C)glucosa del UDP-(¹⁴C)glc a un "primer" exógeno (Actividad GS): La incorporación de glucosa a un "primer" exógeno del tipo glucógeno se determinó según lo ya descrito por Blumenfeld y Krisman (91) con algunas modificaciones. La mezcla de incubación contenía: buffer glicina-NaOH 100mM pH 8,6 , DTT 5mM, EDTA 50 mM, glucógeno de hígado de conejo 1% (P/V), Glc-6-P 10

mM, UDP-(¹⁴C)Glc 1 mM (700 cuentas/min nmol) y la fracción enzimática a analizar (0.1-1.0 mg) en un volumen total de 0,1 ml. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 30 min. o el tiempo especificado en cada caso. La reacción se detuvo agregando 0,9 ml de KOH 33% y digiriendo a 100°C durante 15 min. El polisacárido se precipitó por el agregado de 1,5 ml de etanol 96%. El glucógeno obtenido se reprecipitó, se disolvió en 0,5 ml de agua y se transfirió a un vial para contar la marca incorporada en presencia de solución de Bray (92).

Una unidad enzimática corresponde a la incorporación de 1 μ mol de glucosa del UDP-Glc al glucógeno por minuto.

Actividad de transferencia de (¹⁴C) glucosa del UDP-(¹⁴C)Glc un aceptor proteico endógeno (Actividad GSI):

La incorporación de (¹⁴C)glucosa a la proteína se midió, en ausencia de primer exógeno (glucógeno), en una fracción precipitable por TCA 10% (TCApp). La mezcla de incubación contenía buffer glicina-NaOH 100 mM pH 8,6, DTT 5 mM, EDTA 50 mM, Glc-6-P 10 mM, UDP-(¹⁴C)Glc 3 μ M (850 cuentas/min pmol) y la fracción enzimática (0.1-1.0 mg) en un volumen total de 0,1 ml. Se incubó a 37°C durante una hora, a excepción de los casos en que se especifique otra cosa, y se detuvo la reacción en dos formas distintas:

a) la mezcla de incubación se absorbió sobre papeles tratados con TCA según lo descrito previamente por Krisman

y Barengo (93). La (¹⁴C)glucosa incorporada al material insoluble en TCA y retenida en los papeles se determinó sumergiendo éstos papeles en una solución de Tolueno-PP0 y midiendo la radioactividad en un contador de centelleo;

b) la reacción se detuvo agregando 0,5 ml de TCA 10% helado. La marca incorporada en el TCApp se procesó según lo descrito por Mendonca y Krisman (94).

Una unidad enzimática corresponde a la incorporación de 1 pmol de (¹⁴C)glucosa del UDP-(¹⁴C)Glc a la fracción TCApp por minuto.

Actividad fosforilasa: la actividad de glucógeno fosforilasa se determinó como incorporación de (¹⁴C)glucosa a partir de (¹⁴C)Glc-1-P a glucógeno exógeno. La mezcla de incubación contenía 1 mg de glucógeno, buffer citrato 0,1M pH 6,5, 5'AMP 8 mM, (¹⁴C)Glc-1-P 0,5 mM (1,02 x 10 cuentas/min pmol) y la fracción enzimática (0.1-1.0 mg) en un volumen total de 0,2 ml. La reacción se detuvo agregando 0,9 ml de KOH 33% y digiriendo a 100°C por 15 min. El polisacárido marcado se precipitó agregando 1,5 ml de etanol 96% y se midió la marca incorporada.

DETERMINACION DE LA LONGITUD PROMEDIO DE CADENA (LC) DE

DISTINTOS POLISACARIDOS

Con el objeto de determinar las longitudes promedio de las cadenas de los polisacáridos, éstos se sometieron a una

degradación con β -amilasa. La mezcla de incubación contenía 0.3M de buffer acético/acetato pH: 5, 0.5 mg de β -amilasa y entre 2 y 50 μ g de glucosas/ml del polisacárido medido por fenol-sulfúrico (84) en un volumen total de 0.1 ml. Se incubó durante 24 hs a 37°C y a ese tiempo se detuvo la reacción por calentamiento a 100°C. Luego se precipitó la dextrina con tres volúmenes de etanol 96% y en el sobrenadante se determinaron las glucosas liberadas.

TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

Los proteoglucanos sintetizados en las condiciones descritas para la actividad sin "primer" se incubaron con α -amilasa, β -amilasa, amiloglucosidasa, proteasa (subtilisima) y pronasa E.

Las condiciones de incubación fueron las siguientes:

a) α -amilasa: Tris/ClH 100mM pH 7,4, CaCl₂ 50 mM y 0,22 unidades de α -amilasa.

b) β -amilasa: Tris/ClH 100mM pH 7,4 y 1 mg de β -amilasa

c) amiloglucosidasa: Tris/ClH 100mM pH 7,4 y 2,5 unidades de amiloglucosidasa

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C bajo vapores de tolueno durante 48 hs con agregado de la misma cantidad de enzima y buffer a las 24 hs.

Las condiciones utilizadas para las digestiones con proteasas fueron las siguientes:

a) proteasa (subtilisina): Tris/ClH 100 mM, CaCl₂ 50mM y 1 mg de proteasa.

b) pronasa E: Tris/ClH 100 mM pH 7,4 CaCl₂ 50mM y de pronasa E.

Las incubaciones se realizaron a 37°C bajo vapores de tolueno durante 4 días agregando la misma cantidad de enzima y buffer cada 24 hs.

En todos los casos las reacciones se detuvieron agregando 0,5 ml de TCA 10% helado. Luego de centrifugar a 6000 rpm por 15 min se lavaron los precipitados del TCA (TCApp) y se determinó la radioactividad remanente como también la liberada al soluble en TCA. El material TCA soluble fue extraído con éter para eliminar el TCA antes de medir la marca radioactiva.

TRATAMIENTOS QUÍMICOS

-Hidrólisis ácida suave

Las fracciones TCApp se resuspendieron en 0,1 ml de HCl 0,1N y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. Después de la hidrólisis, se enfriaron los tubos en baño de hielo, se les agregó proteína carrier y se reprecipitaron con 0,5 ml de TCA 10% frío. Luego de centrifugar, los precipitados resultantes se lavaron con TCA 10% frío juntándose ambos sobrenadantes. Finalmente los precipitados se lavaron con n-butanol, se secaron y se contaron con solución de Bray (92) en un contador de centelleo.

La fracción soluble en ácido se extrajo varias veces con éter para eliminar el TCA y se llevó a sequedad. El residuo se resuspendió cinco veces en 0,1 ml de agua llevando a seco cada vez para eliminar el HCl. Finalmente se resuspendieron en 0,1 ml de agua y se sometieron a distintos tratamientos (medición de radioactividad, cromatografía en papel, columna de resolución de carbohidratos por HPLC)

-Hidrólisis alcalina

Las fracciones TCApp se resuspendieron en 0,100 ml de NaOH 0,1N ó 0.5N y se incubaron durante 1 min a 100°C, o durante toda la noche en heladera, respectivamente. Se detuvo la reacción neutralizando el NaOH con HCl 0,1N ó 0,5N y luego se precipitó con 0,5 ml de TCA 10% frío. Los precipitados se lavaron con TCA 10% y con n-butanol. Después de secarlos se midió la radioactividad remanente en los precipitados en presencia de solución de Bray (92).

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

-Cromatografía en papel:

Las muestras a analizar se sembraron en papel Whatman N° 1. Se realizaron cromatografías descendentes utilizando como solvente de corrida n-butanol/Piridina/agua (4:3:4), durante 24-48 hs. Se utilizaron standards internos de azúcar, entre ellos una mezcla de maltooligosacáridos

detectados en el papel con el reactivo alcalino de plata (95).

Los cromatogramas de las muestras de interés que tenían compuestos marcados se analizaron en un radiocromatógrafo Packard (modelo 7202).

-Filtración en geles

Se utilizó una columna de Biogel P₄ (BioRad). La columna se armó y equilibró en acetato de piridina 0,1 M pH 5. El volumen de exclusión (V_0) y el volumen total (V_t) se determinaron midiendo los volúmenes de elución de la ferritina y del CoCl_2 , respectivamente.

-Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Las muestras a analizar por este método fueron las provenientes de la hidrólisis ácida suave de los proteoglicanos sintetizados en las condiciones descritas para la actividad GSI. Los productos liberados por la hidrólisis, secados y resuspendidos en agua se diluyeron al medio con acetonitrilo 100% (grado HPLC) y se inyectaron en una columna de resolución de carbohidratos (Carbohydrate Analysis Column, Waters Associates 30 cm x 3,9 ID). Los glucooligosacáridos se eluyeron con H_2O /acetonitrilo (21:79) con un flujo de 1 ml/min y a cada fracción se le determinó la radioactividad con solución de Bray (92).

MÉTODOS ELECTROFORETICOS

-Geles disociantes en presencia de SDS/urea.

Estas electroforesis se llevaron a cabo en geles planos (12 x 14 x 0,15 cm) con un sistema discontinuo de buffers según lo descrito por Laemmli (96) con 7,5% (P/V) de acrilamida en el gel separador, pH 8,8 y 3% (P/V) de acrilamida en el gel concentrador, pH 6,8.

Las muestras a analizar se digirieron durante 10 min a 100°C con una mezcla desnaturalizante que contenía: 1% (P/V) de SDS, 1% (V/V) de β -mercaptoetanol, 20% (V/V) de glicerol, Tris-HCl pH 6,8 0,05M, urea 0,5M y azul de bromofenol 0,002% (V/V). Las electroforesis se llevaron a cabo a corriente constante (5mA durante 16 hs ó 25mA durante 5 hs). El buffer de corrida utilizado fue Tris 0,025M, glicina 0,2M , 0,1% (P/V) de SDS, pH 8,3. Los geles se tñieron para proteínas con Coomasie Blue (97) y se autoradiografiaron según Chamberlain (98).

Marcadores de peso molecular

Para la determinación de los pesos moleculares se utilizaron proteínas marcadoras tratadas de la misma forma que las muestras a analizar.

Los marcadores utilizados fueron una preparación comercial de Sigma Chem Co. (HMWS SDS-6H) que contenía: anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (P.M. 29000), albúmina (huevo, P.M. 45000), albúmina bovina (P.M. 66000),

fosforilasa-b de músculo de conejo (P.M. 97400), β -galactosidasa de E. coli (P. M. 116000) y miosina de músculo de conejo (P.M. 205000).

Los pesos moleculares de las proteínas en estudio se determinaron utilizando una curva de calibración obtenida de graficar log P.M. de las proteínas marcadoras en función de sus correspondientes R_v.

RESULTADOS-1) PROCESO DE RAMIFICACION

ENZIMAS RAMIFICANTES

DESARROLLO DE UN METODO DE DETERMINACION ENZIMATICA

Teniendo en cuenta que, hasta el momento, no existía un método adecuado para la determinación de la actividad ramificante desarrollamos uno por el cual se miden selectivamente las glucosas involucradas en los puntos de ramificación. Este método implica la síntesis de un polisacárido ramificado, su purificación y posterior degradación con fosforilasa y sistema de desramificación. De esta forma el polisacárido es degradado a Glc-1-P y a una Φ -dextrina por la fosforilasa en presencia de fósforo inorgánico (Pi) (68). El sistema de desramificación degrada a la Φ -dextrina mediante sus dos actividades: una oligo- α 1,4- α 1,4-glucantransferasa y una amilo- α 1,6-glucosidasa. La primera actividad transfiere un fragmento maltotriosilo de una cadena α 1,4 a otra dejando expuesta la glucosa α 1,6 del punto de ramificación. Sobre esta glucosa α 1,6 actúa la segunda actividad que es una glucosidasa, liberando glucosa (Fig.2, reacción 5). De esta manera la acción coordinada de la fosforilasa y el sistema de desramificación dan como productos finales Glc-1-P y glucosa. Las glucosas se miden como glucosas reductoras luego de separar la Glc-1-P por precipitación con etanol.

Condiciones óptimas para la degradación del polisacárido ramificado

Para determinar el tiempo óptimo de incubación del polisacárido con el sistema de degradación (fosforilasa y sistema de desramificación en presencia de Pi) se hizo una curva de tiempo utilizando 0,1 mg de glucógeno standard (Fig. 7).

Como se ve en la Fig. 7 a las tres horas se llega a una meseta para la liberación de glucosas, siendo éste el tiempo utilizado en las determinaciones posteriores. También se ha determinado la concentración óptima de Pi. Esta concentración es de 60 mM y produce la máxima liberación de glucosas sin interferir en su determinación utilizando el método de Somogyi-Nelson (85). Por otro lado ni la fosforilasa ni el sistema de desramificación liberan glucosas per se y son utilizadas en un gran exceso.

Como se puede ver en la Fig. 8 (A) la medición de la cantidad total de polisacárido sintetizado utilizando el reactivo de Krisman (19) o el método del fenol-sulfúrico (84) no es proporcional a la cantidad de enzima ramificante utilizada. Por lo tanto esta cantidad de polisacárido no refleja la actividad enzimática. Por el contrario, cuando se miden las glucosas α 1,6 liberadas de los puntos de ramificación se observa una correlación lineal entre éstas y la cantidad de enzima utilizada. Estos datos demuestran que

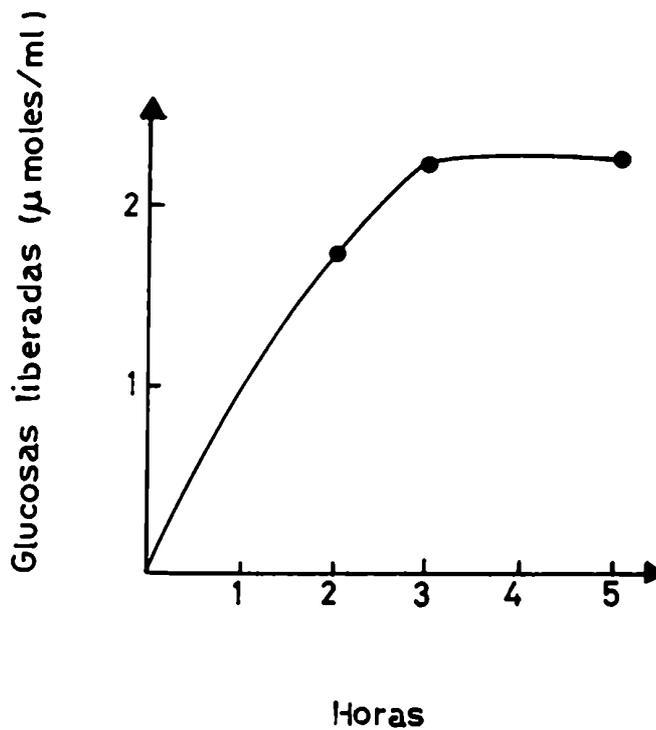


Figura 7- *Tiempo óptimo de incubación para degradar totalmente el polisacárido sintetizado en el paso "i" del método B (Materiales y Métodos).*

Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos, en el paso "iii" del método B para la determinación de la actividad ramificante.

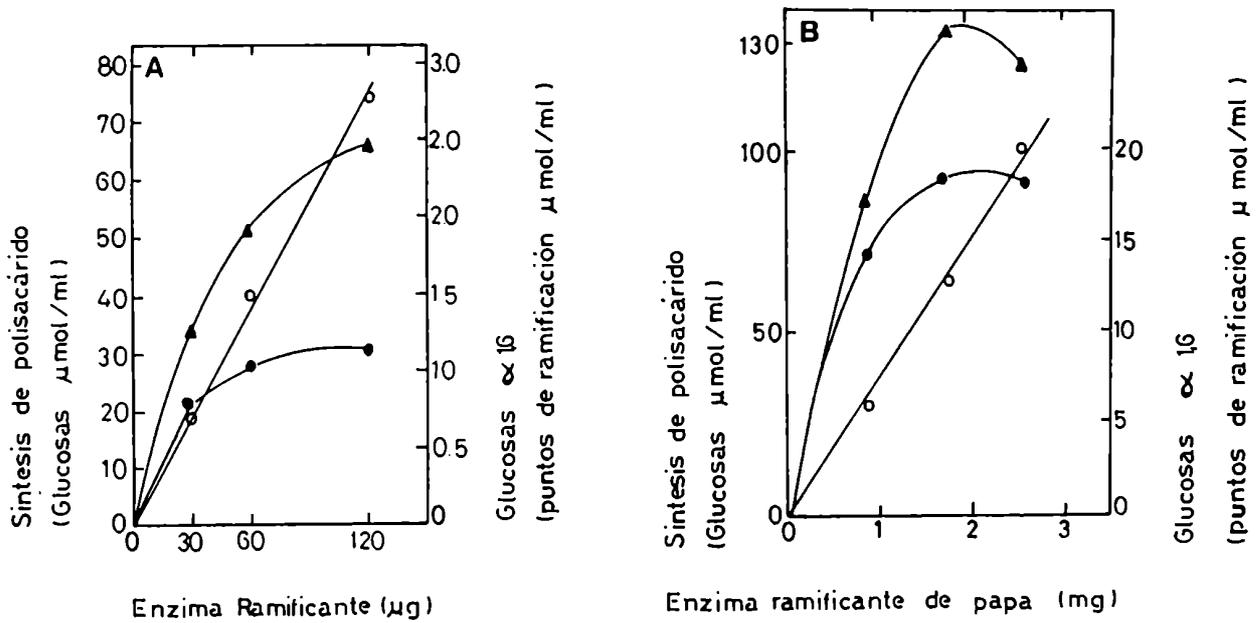


Figura 8- Síntesis de un polisacárido ramificado a partir de Gic-1-P por la acción simultánea de la fosforilasa b y la cantidad indicada de enzima ramificante.

Se siguió el procedimiento descrito en el método B (i) de Materiales y Métodos.

a) Enzima ramificante de hígado de rata.

b) Enzima ramificante de papa (Q).

Polisacárido sintetizado determinado por el método del fenol-sulfúrico (●) y con el reactivo de Krisman (▲). Glucosas involucradas en los puntos de ramificación, o.

un aumento en la concentración de enzima ramificante implica un aumento en el número de glucosas unidas en $\alpha 1,6$ y no en la cantidad de polisacárido sintetizado.

A partir de estos resultados era necesario comprobar que el método desarrollado era funcional con distintos tipos de enzimas ramificantes. Para ello preparamos, a partir de papa, la enzima Q, que se sabe actúa sobre la amilosa para dar un producto similar a la amilopectina(59) y se aplicó la metodología propuesta.

Como se ve en la Fig. 8 (B), existe una correlación lineal entre las glucosas unidas en $\alpha 1,6$ y la concentración de enzima, a pesar de que disminuyó la cantidad de polisacárido sintetizado medido por fenol-sulfúrico (84) o con el reactivo de Krisman (19). Esta disminución fue debida a la presencia de una enzima degradante del tipo de la α -amilasa presente en la preparación.

Estudio de gluco polisacáridos $\alpha 1,4-\alpha 1,6$

El principio utilizado en el método desarrollado, es decir la medición específica de las glucosas involucradas en los puntos de ramificación, se puede aplicar al estudio de estructuras de distintos polisacáridos ramificados $\alpha 1,4-\alpha 1,6$.

En la tabla II se analizaron distintos glucanos $\alpha 1,4-\alpha 1,6$ standards ramificados. Con este fin, solo se siguió el paso del procedimiento recomendado. A los polisacáridos en

Polisacárido	Cantidad de polisacárido (glucosa, $\mu\text{moi/ml}$)			Grado de ramificación (glucosa, %)*	
	1 ^o	FS ^c	R(I/FS)	Nvo.método	Periodato
1)Glucógeno de Híg.conejo	56	58	0.98	9.4	8.9
2)Glucógeno de de ostra	68	37.5	1.8	7.9	11.9
3)Fitogno.	111	58	1.5	7.1	6.4
4)Φ-dext.(G)	0.123	1.3	0.1	15.6	11.4
5)Amilopectina	106	56	1.7	5.7	3.1
6)Φ-dext.(A)	185	232	0.79	10.0	
7)Amilosa	69.7	41.5	1.7	1.2	1.4

Tabla 11- *Porcentajes de ramificación de distintos polisacáridos.Comparación entre el nuevo método desarrollado y la oxidación con periodato.*

a)Porcentaje de ramificación: relación entre las glucosas unidas por uniones glucosídicas $\alpha 1,6$ medidas por el método de Somogyi y las glucosas totales determinadas por el método del fenol-sulfúrico.

Cantidad de polisacárido: b) determinado utilizando el reactivo de Krisman y c) utilizando el método del fenol-sulfúrico.

Φ-dext.(G): dextrina de fosforilasa del glucógeno de hígado de conejo.

Φ-dext.(A): dextrina de fosforilasa de la amilopectina de papa.

estudio se les calculó el porcentaje de ramificación por dos métodos diferentes: a) el descripto precedentemente y b) el clásico de oxidación con periodato (86). Los resultados obtenidos por ambos métodos son comparables (Tabla II). Cabe destacar que, comparando un polisacárido con su dextrina de fosforilasa existen grandes diferencias en cuanto a sus porcentajes de ramificación. A pesar de tener el mismo número real de glucosas unidas en $\alpha 1,6$ la dextrina tiene ramas externas más cortas, dando un porcentaje de ramificación mayor. Así, los valores de 15,6% y 10,0% (Tabla II, línea 4 y 6) obtenidos para las Φ -dextrinas son mayores que los de los polisacáridos de las cuales provienen (Tabla II, línea 1 y 5).

Para un polisacárido como la amilosa (Tabla II, línea 7) se obtiene un valor de 1,2% del grado de ramificación.

Para tener una idea más amplia de la estructura de los polisacáridos analizados determinamos el parametro R (19.99,100) que es una relación entre los mg de polisacárido determinados con el reactivo de Krisman (19) y con el método del fenol-sulfúrico (84). En presencia del reactivo de Krisman el polisacárido desarrolla un color que depende de la estructura del mismo (largo de las cadenas y grado de ramificación), en cambio el método del fenol-sulfúrico mide las glucosas totales del polisacárido sin tener en cuenta su estructura. Debido a esta diferencia entre las dos

determinaciones del polisacárido (con el reactivo de Krisman y con el fenol-sulfúrico) es que una cantidad igual del mismo cuantificada por los dos métodos no da valores iguales ($R < 1$ y $R > 1$). Tomando al glucógeno de hígado de conejo como standard se obtiene un valor de $R = 0,98$. Analizando polisacáridos con ramas externas más largas (amilopectina, amilosa) o más cortas que el glucógeno (dextrinas) se obtienen valores de R mayores o menores que 1 respectivamente (Tabla II, líneas 5 y 6).

Análisis de la actividad ramificante utilizando el método desarrollado

A diferencia de la gran cantidad de información existente sobre la regulación de la glucógeno sintetasa y de la fosforilasa es muy poco lo que se conoce acerca de la regulación de la enzima ramificante. Se asume que una alta actividad de elongación, esto es, síntesis de cadenas glucosídicas $\alpha 1,4$, respecto de la actividad ramificante daría como resultado un polisacárido poco ramificado. Por el contrario una baja actividad de elongación le permitiría a la enzima ramificante introducir una mayor proporción de uniones glucosídicas $\alpha 1,6$ (46).

En la naturaleza se encuentran polisacáridos con distintos y muy variados grados de ramificación. Así, la amilopectina de diferentes orígenes (papa, maíz, trigo) son estructuralmente distintas. Lo mismo ocurre con los

glucógenos de hígado de rata, de hígado de conejo o de bacterias.

A partir de estos datos nos cuestionamos si la densidad de puntos de ramificación depende de la actividad de la enzima ramificante, de la relación entre actividad ramificante y actividad sintetasa o es debida a una característica intrínseca de la enzima ramificante. Para ello cuantificamos los puntos de ramificación de distintos polisacáridos $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ nativos y los sintetizados "in vitro" con las enzimas ramificantes obtenidas de los mismos tejidos.

Análisis comparativos de los glucopolisacáridos $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ nativos con los correspondientes sintetizados in vitro

Para medir específicamente la actividad de la enzima ramificante se siguieron los 3 pasos propuestos en el desarrollo del nuevo método (Método B descrito en Materiales y Métodos). De esta forma, en un primer paso se sintetizó un polisacárido en presencia de Glc-1-P, una muy pequeña cantidad de glucógeno como "primer" y la enzima a estudiar.

Luego de purificar el polisacárido, se lo degradó con fosforilasa y sistema de desramificación. Las enzimas ramificantes de hígado de conejo y rata, papa y maíz dulce se purificaron según lo descrito en Materiales y Métodos.

Para poder correlacionar el porcentaje de ramificación con la actividad ramificante se comparó un polisacárido altamente ramificado como el glucógeno de hígado de conejo y la enzima obtenida del mismo tejido con otro menos ramificado como la amilopectina de papa y su enzima ramificante.

En la Tabla III se analizan las características de los polisacáridos nativos con aquellos sintetizados "in vitro" por la enzima ramificante obtenida del mismo tejido.

Los polisacáridos, tanto el extraído como el sintetizado, tienen casi la misma longitud de onda de máxima absorción (Tabla III, a y b, línea 1), porcentaje de ramificación(% Glc- α 1,6, Tabla III, a y b, línea 2) y espectro de absorción determinado en presencia del reactivo de Krisman (Fig. 9, paneles a, b y c).

Definición del parámetro A

Los espectros de los polisacáridos, tanto del extraído como del sintetizado, determinados en presencia del reactivo de Krisman muestran un perfil típico. Tienen una longitud de onda de máxima absorción y un hombro a 410 nm que se obtuvo en todos los casos analizados. A partir de esto hemos definido un parámetro A como el cociente entre la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción y la absorbancia a 410nm (100). Como se ve en la Tabla IV, los valores de A obtenidos para distintos polisacáridos standard

a) Parámetro	Glucógeno de hígado			
	de rata		de conejo	
	E	S	E	S
λ_{max} (nm)	475	470	460	465
glc α 1,6 (%)	7.2	7.0	9.4	10.4
A	1.49	1.48	1.38	1.65

b) Parámetro	Amilopectina		Maíz dulce			
	de papa		F		A	
	E	S	E	S	E	S
λ_{max} (nm)	500	520	470	475	525	500
glc α 1,6 (%)	6.1	6.4	8.2	7.2	4.3	4.7
A	2.14	2.01	1.61	1.58	1.60	1.73

Tabla III- Análisis comparativo entre los glucopolisacáridos α 1,4- α 1,6 nativos y los sintetizados "in vitro".

a) Polisacáridos de origen animal.

b) Polisacáridos de origen vegetal.

A= Absorbancia λ_{max} /Absorbancia λ_{min} .

R= Relación entre la cantidad de polisacárido determinada con el reactivo de Krisman y con el método del fenol-sulfúrico.

El porcentaje de ramificación se determinó como se describe en la Tabla II.

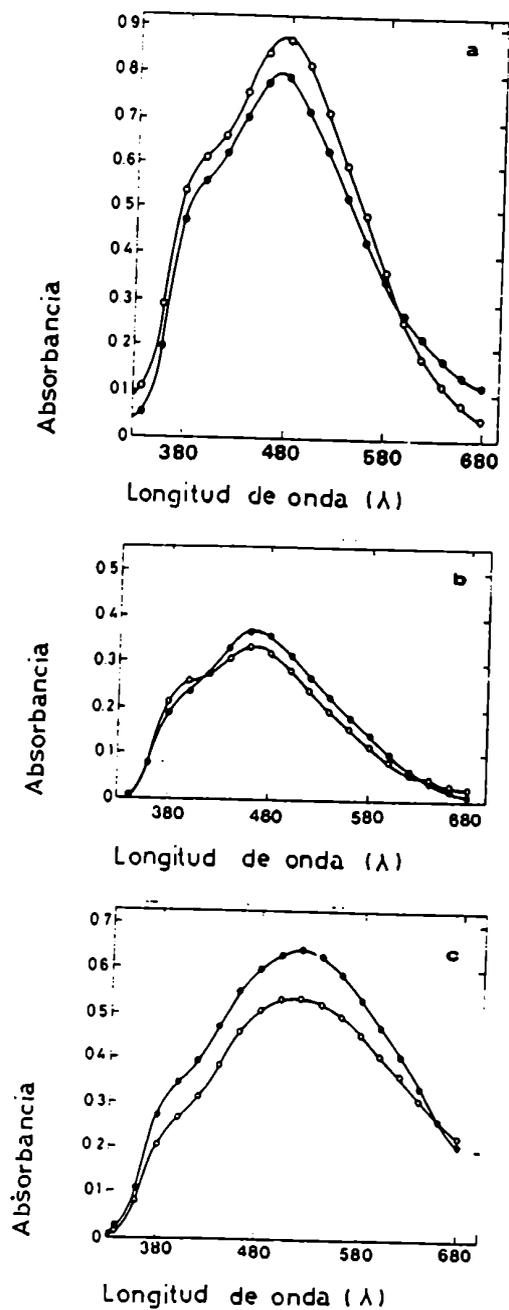


Figura 9- Espectros de absorción de los glucanos $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ nativos y de los sintetizados "in vitro" en presencia del reactivo de Krisman.

Polisacárido nativo (o--o) y sintetizado (●--●) con la correspondiente enzima ramificante extraída de: a) hígado de rata, b) hígado de conejo, c) papa.

Polisacárido	A	R	Puntos de ramificación (glucosasa α 1,6,%)
Amilosa	4.7	1.7	1.4
Amilopectina	2.2	1.7	5.7
Fitogno.	1.6	1.5	7.1
Glucógeno de híg. de rata	1.5	1.0	7.2
Glucógeno de híg. de conejo	1.4	0.98	9.4
Φ -dext. de Amilopectina	1.2	0.79	10.0

Tabla IV- Propiedades de diferentes glucopolisacáridos α 1,4- α 1,6 standard.

A= Absorbancia $\lambda_{...}$ /Absorbancia $\lambda_{...}$.

R= Relación entre la cantidad de polisacárido determinada con el reactivo de Krisman y con el método del fenol-sulfúrico.

El porcentaje de ramificación se determinó como se describe en la Tabla II.

varian según el largo de sus cadenas externas. El valor de A aumenta desde 1,2 para la Φ -dextrina de amilopectina a 2,2 para la amilopectina y 4,7 para la amilosa. Para el glúcido de hígado de conejo que se usa como standard el valor obtenido es 1,4.

Polisacáridos contenidos en el maíz dulce

Los granos de maíz dulce se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos para extraer los polisacáridos y las enzimas ramificantes. A partir de una precipitación fraccionada con sulfato de amonio se pudieron separar dos actividades ramificantes con distintas especificidades. Como se ve en la Tabla III(b) el producto final sintetizado por la fracción precipitada a 30% de SAM fue amilopectina (longitud de onda de máxima absorción=500nm, Glc α 1,6= 4,7%) mientras que el polisacárido sintetizado por la fracción precipitada entre 50 y 70% de SAM fue fitoglúcido (longitud de onda de máxima absorción=475nm, Glc α 1,6= 7,2%). Los espectros de absorción de los polisacáridos nativos y de los sintetizados por las fracciones enzimáticas de 30 y 50-70% de SAM presentan el mismo patrón con longitudes de onda de máxima absorción coincidentes (Fig.10). Así la fracción enzimática que precipitó al 30% de SAM sintetizó "in vitro" un polisacárido similar a la amilopectina nativa, y la fracción precipitada entre 50 y 70% de SAM sintetizó un polisacárido del tipo del fitoglúcido.

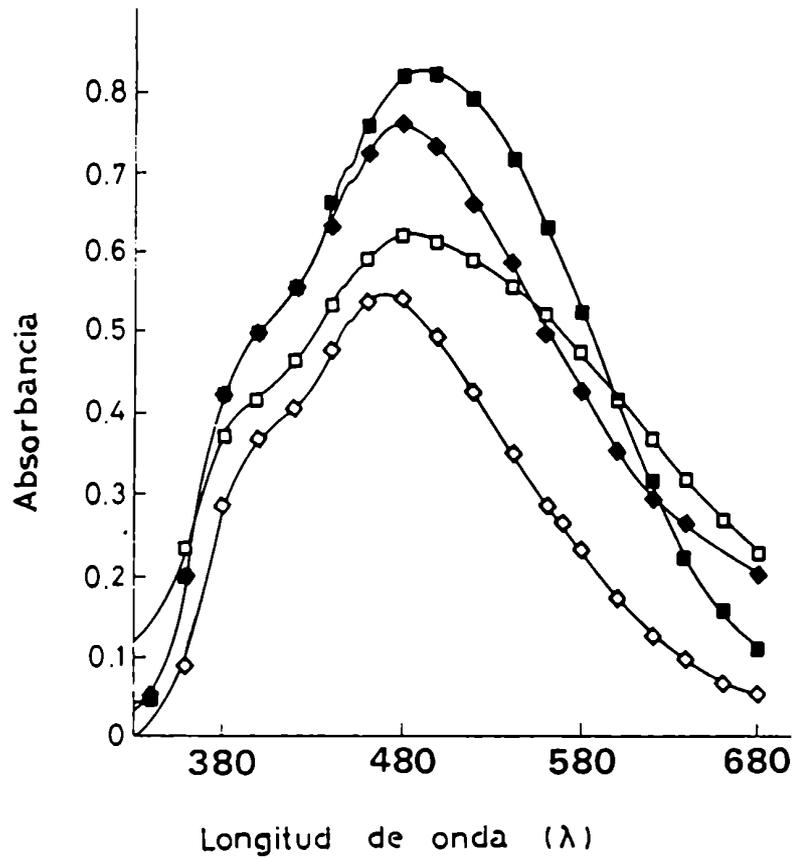


Figura 10- Espectros de absorción, en presencia del reactivo de Krisman, de los polisacáridos $\alpha 1,4-\alpha 1,6$ nativos y sintetizados a partir de maíz dulce. Polisacáridos nativos: (□ -- □), amilopectina y (◇ -- ◇), fitogiucógeno. Polisacáridos sintetizados "in vitro" con la fracción enzimática precipitada con sulfato de amonio hasta 30% de saturación (■ -- ■) y entre 50 y 70% de saturación (◆ -- ◆).

Especificidad de las enzimas ramificantes

- Medición de largos de cadenas.

Con el fin de determinar si la especificidad de las distintas enzimas ramificantes estaba dada por el número de glucosas que deja cada una de ellas entre puntos de ramificación, se sintetizaron distintos polisacáridos con enzimas de hígado de conejo, papa, y maíz dulce (fracción 50-70% SAM). Los polisacáridos sintetizados fueron tratados con β -amilasa para obtener sus respectivas dextrinas. A partir del grado de ramificación de cada polisacárido y de las glucosas liberadas por la β -amilasa se pudieron calcular tres parámetros importantes: LC (largo promedio de cadena), CE (longitud promedio de cadena externa) y CI (longitud promedio de cadena interna). Como se ve en la Tabla V cada enzima deja, entre puntos de ramificación, un número distinto de glucosas que se correlaciona en forma inversa con el grado de ramificación de dicho polisacárido. A medida que la enzima deja menos glucosas entre uniones glucosídicas $\alpha 1,6$ más ramificado resulta ser este polisacárido. Esto nos llevo a pensar que cada enzima ramificante tiene una especificidad distinta tanto respecto del tamaño de oligosacárido que deja en las ramas externas luego de la transferencia de $\alpha 1,4$ a $\alpha 1,6$ como de la distancia, medida en número de glucosas, que mantiene entre puntos de ramificación.

Enzima ramificante	Polisacárido sintetizado				
	glc α 1,6 (%)	λ_{max} (nm)	LC (número de glucosas)	CE	CI
Hígado de conejo	9.6	460	10.4	5.8	4.6
Papa	5.2	530	19.1	9.3	9.8
Maíz dulce*	8.3	475	12.1	6.8	5.3

Tabla V- *Especificidad de diferentes enzimas ramificantes.*

LC: Largo promedio de cadena.

CE: Largo promedio de la cadena externa.

CI: Largo promedio de la cadena interna.

a) Enzima ramificante precipitada entre 50 y 70% de saturación con sulfato de amonio.

DISCUSION-1) PROCESO DE RAMIFICACION

Los métodos utilizados hasta el momento para medir la actividad ramificante (47, 68 y 71), si bien son específicos, no son cuantitativos ni muy sensibles.

El método propuesto en esta Tesis determina específicamente las glucosas unidas por uniones glucosídicas α 1,6 introducidas por la actividad ramificante. Este puede hacerse más sensible midiendo las glucosas liberadas por algún otro método cuya sensibilidad sea mayor que la del Somogyi-Nelson (0,05 μ mol de glucosas). Otra opción para aumentar la sensibilidad consiste en sintetizar, en el paso del procedimiento recomendado, un polisacárido con (14 C)Glc-1-P y medir la (14 C)glucosa liberada luego de la degradación (paso "iii"). Bajo estas condiciones, el porcentaje obtenido para el glucógeno standard fue de 12,0% y la liberación de glucosas en función de la cantidad de enzima también fue lineal. Como control, al precipitado obtenido luego del tratamiento con etanol en el paso "iii" se lo disolvió y se sometió a una electroforesis en papel en buffer acetato de piridina 1,2M pH 6,5. Se recuperó un 80% de (14 C)Glc-1-P, lo que demuestra que el proceso de degradación fue casi completo.

La utilización de este método como herramienta para determinación de estructuras tiene ciertas ventajas respecto

a la oxidación con periodato. El método del periodato requiere más tiempo y su sensibilidad depende del cambio de color de un indicador (86). Por otro lado, si los polisacáridos son poco ramificados es necesario utilizar mayor cantidad del mismo para poder determinar el grado de ramificación. Con el método aquí propuesto se puede utilizar una cantidad 25 veces menor de polisacárido que la requerida para la oxidación con periodato.

La síntesis de polisacárido fue llevada a cabo en condiciones tales que la actividad de elongación (fosforilasa) no fuera detectable en ausencia de enzima ramificante. En estas condiciones nos independizamos de la relación entre las actividades de elongación y ramificación. Es a través de la acción coordinada de ambas actividades que se obtienen glucanos $\alpha 1,4-\alpha 1,6$ con un grado específico de uniones glucosídicas $\alpha 1,6$ introducidas por la enzima ramificante.

Los datos obtenidos para los polisacáridos nativos son totalmente coincidentes con aquellos sintetizados in vitro. Además, los parámetros $\lambda_{\text{máx}}$, %Glc $\alpha 1,6$ y A de los polisacáridos nativos y los sintetizados coinciden con los standards (Tabla III). Cabe destacar que la cantidad de polisacárido necesaria para hacer el espectro y determinar el parámetro A es mínima, por lo que se puede tener una idea

rápida y sensible de la estructura del polisacárido en estudio.

Los valores de los parámetros A y R dan una idea similar acerca de la estructura de los polisacáridos estudiados. Valores de R mayores o menores que 1 indican ramas externas más o menos largas que el standard (glucógeno de hígado de conejo). La diferencia principal entre el A y el R es que mientras el valor R parece llegar a un plateau de 1.7 (amilopectina y amilosa), el parámetro A es más sensible y tiene un mayor rango de variabilidad. De esta forma valores de A mayores o menores que 1,4 indican ramas externas más largas (2,2 para amilopectina y 4,7 para amilosa) o más cortas (1,2 para la α -dextrina de la amilopectina) que el standard (glucógeno de hígado de conejo) (Tabla IV).

Como es sabido el almidón y el fitoglucógeno coexisten en el maíz dulce (16). Lavintman y Krisman encontraron en esos granos una actividad enzimática que transforma la amilosa y la amilopectina en fitoglucógeno (51). Más tarde Lavintman demostró que en esas preparaciones estaban presentes dos actividades, una que sintetizaba fitoglucógeno y otra, de tipo Q que ramificaba la amilosa a amilopectina (102).

Otros investigadores también encontraron más de una actividad ramificante en granos de maíz (52, 103). Estas

actividades las separaban luego de una cromatografía por DEAE-celulosa. La metodología utilizada por estos autores para medir la actividad ramificante era indirecta (transformación de la amilopectina por acción de la enzima ramificante o aumento en la liberación de Pi) (51, 52, 102, 103). Esta metodología indirecta hace que no se pueda discriminar entre productos finales obtenidos por ramificantes muy similares. En cambio utilizando el método específico desarrollado en este trabajo pudimos analizar separadamente las dos actividades halladas en el maíz dulce (Tabla III). Las dos actividades ramificantes obtenidas son responsables, en forma independiente, de la síntesis de dos polisacáridos distintos, amilopectina y fitoglucógeno. Por otro lado, en maíz lechoso, no se encontró una enzima ramificante que sintetizara fitoglucógeno. La única actividad presente sintetizó amilopectina y este mismo polisacárido fue el único hallado en el tejido.

Boyer y Preiss demostraron la existencia de más de una forma de enzima ramificante en el maíz dulce y atribuían a la forma I la formación del fitoglucógeno. Sin embargo, llama la atención que esta misma forma I la hallaron en maíces que no acumulaban fitoglucógeno (52).

Tratando de entender que relación había entre el fitoglucógeno y el almidón varios investigadores propusieron distintos mecanismos. Erlander propuso la desramificación

del fitoglucógeno para dar amilopectina y oligosacáridos (104). En forma contraria, Hodges et. al. proponen que a la amilopectina se le incrementaría el grado de ramificación para dar fitoglucógeno (103) y, finalmente, Boyer et al. sugieren que la enzima ramificante I es la involucrada en la transformación de almidón a fitoglucógeno (52).

De nuestros resultados se desprende claramente que la amilopectina del almidón y el fitoglucógeno son sintetizados en forma independiente por distintas actividades ramificantes. Que se forme un polisacárido o el otro dependerá de la actividad ramificante involucrada en su síntesis.

Es también a partir de estos resultados que proponemos la existencia de una relación directa entre actividad de la enzima ramificante y la estructura correspondiente del glucano $\alpha 1,4-\alpha 1,6$.

Estos resultados se ven corroborados por el hecho de que cada enzima ramificante deja un número específico de glucosas entre puntos de ramificación y en las cadenas externas del polisacárido (Tabla V). Según el número de glucosas que haya entre puntos de ramificación la estructura del polisacárido será más o menos compacta.

RESULTADOS - II) PROCESO DE INICIACION

INICIACION DE LA BIOSINTESIS DEL GLUCOGENO EN CEREBRO DE RATA

Como se describió en la **INTRODUCCION**, en el ítem relacionado con la iniciación de la biosíntesis del glucógeno, el modelo propuesto por Krisman (34) involucra dos etapas: a) la síntesis "de novo" de glucanos α 1,4 unidos a un aceptor proteico, catalizada por, al **menos** una glucógeno sintetasa iniciadora y b) la utilización de estos glucanos como sustratos de la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante, para dar moléculas de glucógeno unidas a la proteína.

Si este modelo es operativo en el cerebro, sería posible medir dos actividades de transferencia de glucosas a partir del UDP-(14 C)Glc. una a proteína y otra a un aceptor exógeno del tipo del glucógeno. La actividad de transferencia de glucosas a la proteína (GSI) se mide como incorporación de radioactividad a una fracción insoluble en TCA 10% frío (TCApp). Esto implica la síntesis de glucanos unidos a una proteína (proteoglucanos). Por otro lado la transferencia de glucosas a un aceptor exógeno del tipo del glucógeno, esto es actividad de glucógeno sintetasa (GS), se mide como incorporación de marca radioactiva al precipitado etanólico luego de una digestión alcalina de la mezcla de incubación (KOH-EtOHpp).

Purificación de las actividades enzimáticas a partir de cerebro de rata

Los animales utilizados no fueron sometidos a ningún tratamiento previo a la muerte y extracción de los órganos.

Las enzimas fueron purificadas como se describe en Materiales y Métodos. En la Fig. 5 se ve un perfil típico de las actividades enzimáticas cuando se pasan por una columna de DEAE-celulosa. Se determinaron cuatro actividades: a) fosforilasa, b) ramificante, c) GS (glucógeno sintetasa) y d) GSI (glucógeno sintetasa iniciadora). Las actividades de fosforilasa y ramificante coeluyeron en un pico entre 0,20 y 0,45 M de KCl. Este pico se superpuso, en parte, con el pico de elución de la glucógeno sintetasa (0,25 - 0,45 M de KCl). Por otro lado la actividad GSI eluyó como dos picos a la misma concentración de KCl que la glucógeno sintetasa.

Los tubos que tenían actividad enzimática se agruparon en dos fracciones, uno de ellos (P₁) contenía la actividad fosforilasa y ramificante y la otra (P₂) tenía, además de estas dos actividades, las correspondientes a la glucógeno sintetasa y la GSI (Fig. 5).

Luego de cromatografiar P₂ en una columna de W-aminobutilagarosa (Fig. 6), las actividades de fosforilasa y ramificante se obtuvieron en el líquido de lavado y las de glucógeno sintetasa y GSI se adsorbieron en la resina.

La actividad de glucógeno sintetasa se eluyó como un pico ancho entre 0,17 - 0,46 M de KCl y la actividad GSI lo hizo en dos picos. Uno de ellos coeluyó con la actividad sintetasa y el otro lo hizo entre 0,54 - 0,6 M de KCl.

A partir de los datos obtenidos se construyó la Tabla VI, en la cual se resumen los pasos de purificación. Se puede ver que las actividades específicas y el grado de purificación de la glucógeno sintetasa y la GSI obtenidos no son muy altos (se purificaron 14 y 19 veces respectivamente), probablemente debido a inactivación.

Las actividades enzimáticas obtenidas luego de la precipitación con sulfato de amonio fueron estables por varios meses, mantenidas a -20°C , pero luego de la elución de la columna de w-aminobutilagarosa el 80% de la actividad GSI se perdía en 24 hs a 4°C .

Por lo tanto, las propiedades de las actividades de glucógeno sintetasa y de GSI se analizaron con la fracción precipitada por sulfato de amonio (Tabla VI.,, paso 2). Las actividades ramificantes y de fosforilasa se analizaron con el percolado de la columna de w-aminobutilagarosa.

Producto sintetizado por la enzima ramificante de cerebro

Las fracciones provenientes de la columna de w-aminobutilagarosa que tenían actividad ramificante y de

Actividad GS						
Paso	Volúmen	Proteínas	U, ¹	Act. esp.	R	P
	(ml)	(mg)	unidades	Ux10 ³ /mg	%	veces
1) S _{2,5}	200	1066.0	5.60	5.0	100.0	1.0
2) P _{5,0}	38	617.0	4.90	8.0	88.0	1.6
3) P ₂	122	152.0	4.40	16.0	79.0	3.2
4) A ₁	20	58.0	4.30	70.0	77.0	14.0
A ₂	20	15.6	0.07	6.0	1.2	1.2
A ₃	20	10.4				

Actividad GSI						
Paso	Volumen	Proteínas	U, ²	Act. esp.	R	P
	(ml)	(mg)	unidades	Ux10 ³ /mg	%	veces
1) S _{2,5}	200	1066.0	1.59	1.5	100.0	1.0
2) P _{5,0}	38	617.0	1.28	2.1	81.0	1.4
3) P ₂	122	152.0	1.16	7.7	72.0	12.0
4) A ₁	20	58.0				
A ₂	20	15.6	0.24	15.0	15.4	3.0
A ₃	20	10.4	0.30	98.0	19.0	18.7

Tabla VI- *Purificación de las enzimas involucradas en la iniciación de la biosíntesis del glucógeno a partir de cerebro de rata.*

GS: actividad de glucógeno sintetasa medida como incorporación de (¹⁴C)glucosa a glucógeno agregado como aceptor exógeno. GSI: actividad de glucógeno sintetasa iniciadora medida en ausencia de aceptor exógeno, como incorporación de (¹⁴C)glucosa a la fracción precipitable por TCA.

S_{2,5}: sobrenadante de 25000xg. P_{5,0}: precipitado obtenido llevándolo a 50% de saturación con sulfato de amonio.

¹: μmoles de glucosa incorporada al glucógeno exógeno, a partir del UDP-Glc. en 10 min.

²: μmoles de glucosa incorporada a la fracción precipitable por TCA. a partir del UDP-Glc. en 30 min.

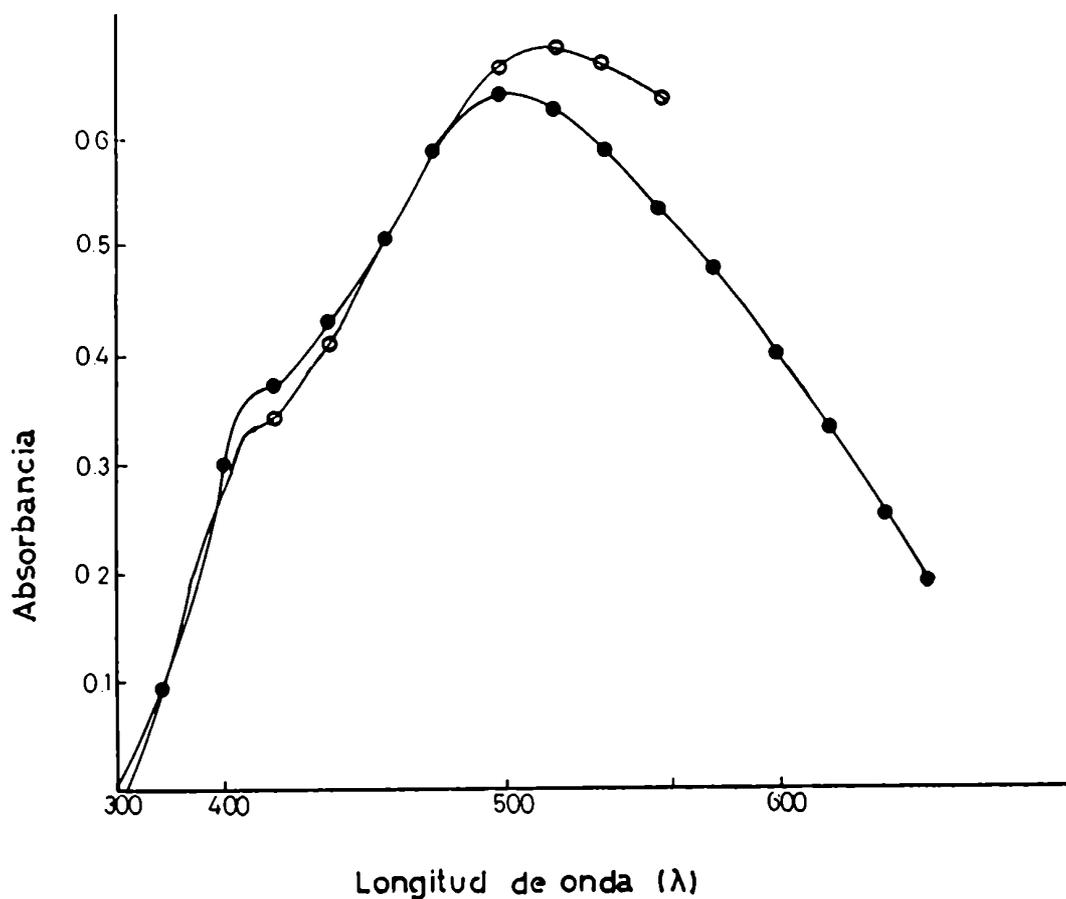


Figura 11- *Espectro de absorción del polisacárido sintetizado por la enzima ramificante obtenida a partir de cerebro de rata.*

● -● Polisacárido sintetizado en las condiciones descritas en el método B (i) para determinar la actividad ramificante (Materiales y Métodos).

○ -○ Polisacárido sintetizado a partir de UDP-Glc (25 mM), enzima ramificante de cerebro parcialmente purificada (líquido de lavado de la w-aminobutil agarosa, 50 μg) y glucógeno sintetasa de cerebro (fracción A₂ de la w-aminobutil agarosa, 50 μg).

fosforilasa se juntaron y concentraron por precipitación con sulfato de amonio hasta 50%. El precipitado se resuspendió en un mínimo volumen del buffer B y a partir de esta fracción se sintetizó "in vitro" un polisacárido según lo descrito en Materiales y Métodos. El espectro obtenido en presencia del reactivo de Krisman (19) se muestra en la Fig.11. El valor del parámetro A que se obtuvo es de 1,9 - 2,1 y la longitud de onda de máxima absorción fue de 500 nm. Teniendo en cuenta que la enzima ramificante y la fosforilasa se encontraban juntas, podría ser que hubiera un exceso de fosforilasa y por eso el polisacárido obtenido fuera del tipo de la amilopectina. Para descartar esta posibilidad, se sintetizó un polisacárido en presencia de UDP-Glc, glucógeno sintetasa de cerebro (fracción A₂, Fig. 6) y la fracción que contenía las actividades ramificante y fosforilasa (líquido de lavado de la w-aminobutil agarosa concentrado). Los resultados obtenidos muestran que el polisacárido sintetizado en estas condiciones tiene un $\lambda_{max} = 510\text{nm}$ y un A= 2.0 (Fig. 11) Estos datos dan la idea de un polisacárido menos ramificado que el glucógeno standard y con ramas externas más largas.

Es importante aclarar que no fue posible, por ninguno de los pasos de purificación utilizados, separar las actividades ramificante y fosforilasa.

**TRANSFERENCIA DE (¹⁴C) GLUCOSA A PARTIR DE UDP-(¹⁴C) GLUCOSA
ACTIVIDADES DE GLUCOGENO SINTETASA (GS) Y GLUCOGENO SINTETASA
INICIADORA (GSI)**

Requerimientos

La máxima actividad enzimática, en ambos casos, se obtiene con la mezcla de incubación completa (Tabla VII). La omisión de DTT, glc-6-P o EDTA disminuye notablemente las actividades enzimáticas.

Naturaleza del producto TCApp formado

El producto formado por la transferencia de (¹⁴C)glucosa del UDP-(¹⁴C)Glucosa a la proteína se analizó por dos tipos de tratamientos: i) enzimáticos y ii) químicos.

i) Tratamientos enzimáticos: la glucoproteína formada en las condiciones descritas en la Tabla VIII fue incubada con diferentes enzimas.

Es decir, el material radiactivo que fue sintetizado a partir del UDP-(¹⁴C)Glucosa y precipitable por TCA 10% frío (TCApp) se trató con las enzimas α y β -amilasa, amiloglucosidasa y subtilisina. Todas las enzimas digirieron el producto radiomarcado (Tabla VIII), lo que sugiere la presencia de un glucano α 1,4 unido covalentemente a una proteína.

Por otro lado, el glucano α 1,4 unido a la proteína se eluía en el V_0 cuando se pasaba por una columna de Biogel

Mezcla de incubación	(^{14}C) glucosa incorporada al material	
	TCApp	TCA _{0.1} -EtOHpp
Completa	100.0	100.0
- Glc-6-P	44.1	75.7
- EDTA	39.0	56.9
- DTT	16.0	11.0
- (EDTA y DTT)	3.8	48.0

Tabla VII- *Requerimientos para la transferencia de (^{14}C) Glucosa a partir del UDP- (^{14}C) glucosa a la proteína (actividad GSI) y al glucógeno (actividad GS).*

-: sin el agregado de la respectiva sustancia.

Las condiciones utilizadas son las descritas en Materiales y Métodos para la determinación de las actividades GS y GSI.

Tratamientos enzimáticos	(¹⁴ C)Glucosa reprecipitada por TCA luego de la digestión	%
		100
α -amilasa		32
β -amilasa		63
amiloglucosidasa		38
subtilisina		50

Tabla VIII- *Digestión enzimática de la glucoproteína sintetizada en las condiciones de determinación de la actividad GSI.*

La mezcla estándar de reacción (según lo descrito en Materiales y Métodos para la determinación de la actividad GSI) se incubó a 37°C durante 60 min. Se detuvo la reacción agregando TCA 10% frío. El material precipitado con el TCA se lavó con butanol y se secó. La proteína precipitada y seca se incubó con las distintas enzimas, en los medios y por el tiempo descritos en Materiales y Métodos. Luego de reprecipitar la proteína con TCA 10% frío se midió la radioactividad en el precipitado y en el sobrenadante.

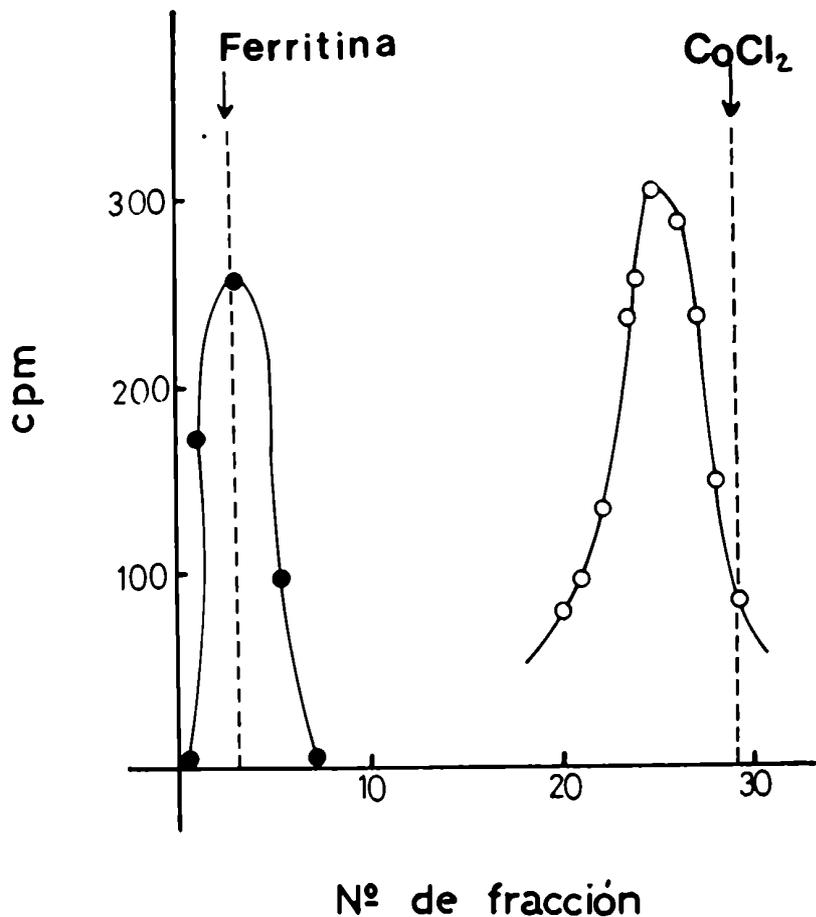


Figura 12- Cromatografía en Biogel P₄ del producto formado por la actividad GSI.

Los proteoglicanos fueron sintetizados en las condiciones descritas en Materiales y Métodos para la determinación de la actividad GSI, durante 1 hora.

(●-●) Proteoglicano sintetizado.

(o-o) Proteoglicano tratado con pronasa E según lo descrito en Materiales y Métodos.

La ferritina y el CoCl₂ indican los volúmenes de exclusión y de inclusión de la columna respectivamente.

P.(Fig.12). Si este proteoglicano se digería en forma exhaustiva con pronasa E, la marca radioactiva quedaba incluida.

ii) Tratamientos químicos: el producto TCApp fue sometido a una hidrólisis ácida suave y otra alcalina. La glucoproteína marcada fue sensible a la hidrólisis ácida suave (0,1N HCl, 10 min, 100°C). En la Fig. 13 se ven los productos liberados al sobrenadante por la hidrólisis ácida luego de reprecipitar con TCA.

Por otro lado el producto TCApp marcado con (¹⁴C)glucosas sometido a una hidrólisis alcalina en distintas condiciones (Tabla IX) no liberó la marca radioactiva de la proteína.

Especificidad del dador de glucosas

El agregado de cualquier otro nucleótido azúcar distinto del UDP-glc no produce dilución de la marca (Tabla X), más aún, el GDP-Glc produce una estimulación del 14 y 23% en la incorporación de (¹⁴C)glucosa a la proteína y al acceptor exógeno. Cuando el nucleótido azúcar agregado es UDP-glc frío, entonces sí hay dilución de la marca radioactiva. Esto significa que sólo se transfiere glucosa a partir del UDP-Glc.

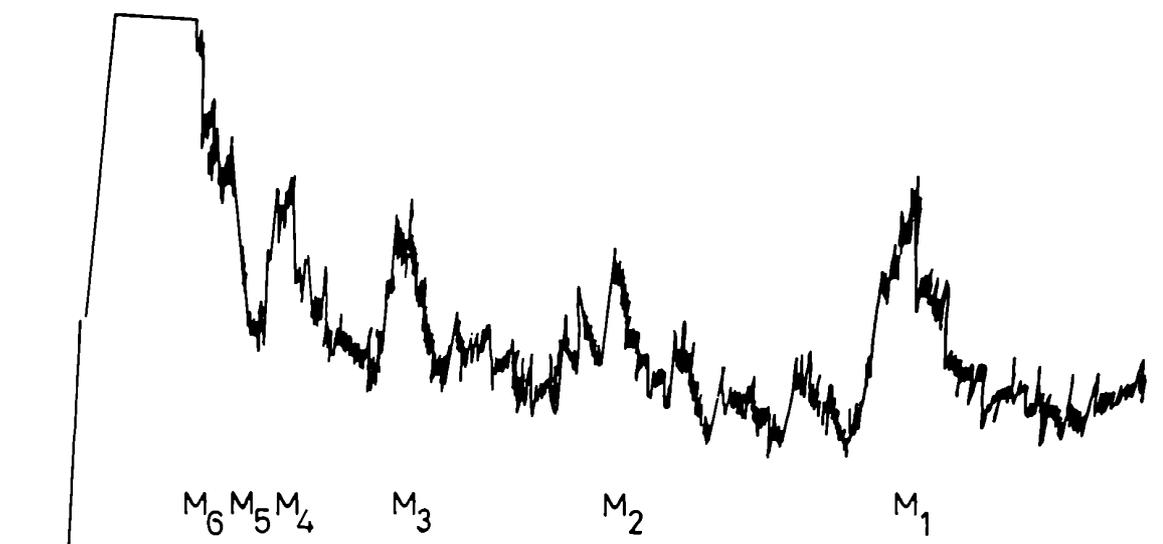


Figura 13- *Crómatagrafia de los productos liberados por hidrólisis ácida suave del proteoglucono sintetizado en la reacción GSI.*

Los productos solubilizados por el tratamiento con HCl 0.1N a 100°C durante 10 min. se cromatografiaron en papel con butanol/piridina/agua (4:3:4) según lo descrito en Materiales y Métodos.

M₁-M₆: glucosa, -glucosa..

Tratamiento	(¹⁴ C)Glucosa reprecipitada por TCA luego de la hidrólisis (%)
	100
NaOH 0.1N, 1 min., temp.amb.	100
NaOH 0.1N, 1 min., 100qC	100
NaOH 0.5N, 12 hs., 4qC	100

Tabla IX- *Hidrólisis alcalina del proteoglucano formado en las condiciones de determinación de la actividad GSI.*

Los proteoglucanos sintetizados por cuadruplicado se procesaron hasta obtener los precipitados de TCA. De los cuatro proteoglucanos a uno se le determinó la incorporación de marca en el TCApp; a los otros tres se los sometió a la hidrólisis alcalina en las condiciones que se detallan en cada caso. Luego de la hidrólisis se neutralizó con HCl, se reprecipitó con TCA y se determinó la marca remanente en el precipitado.

Agregado	¹⁴ C)Glucosa incorporada al material	
	TCApp	TCA _{0.1} -EtOHpp
	100	100
Glc-1-P	94	110
ADP-glc	102	110
GDP-glc	114	123

Tabla X- Especificidad del dador de glucosas.

Las condiciones de incubación para las reacciones de transferencia de glucosa a la proteína y al glucógeno fueron las que se describen en Materiales y Métodos. El tiempo de incubación fue de 60 min. para la actividad GSI y 30 min. para la GS. El competidor no marcado fue agregado a una concentración de 10 mM. La especificidad se determinó como la variación en el porcentaje de incorporación debido al agregado del compuesto no marcado.

Efecto del pH

La actividad enzimática de transferencia de las (¹⁴C)glucosas a partir del UDP-(¹⁴C)Glc tanto a la proteína como al glucógeno fue estudiada en función del pH.

Como se ve en la Fig. 14 en ambos casos se obtuvieron dos picos de actividad. La glucógeno sintetasa y la GSI comparten un pico de actividad a pH 7,9 y tienen el otro a pH 7,2 y 9,0 respectivamente. Estos dos pHs óptimos (7,2 y 9,0) coinciden con los datos ya publicados para las enzimas de hígado (32).

OLIGOSACARIDOS UNIDOS A LA PROTEINA SINTETIZADOS POR LA ACTIVIDAD GSI

Para dilucidar la razón por la cual existía más de un pH óptimos de transferencia de glucosas a la proteína y al glucógeno, se sintetizaron proteoglucanos a los tres pHs y se analizaron en detalle.

Los proteoglucanos sintetizados a pH: 7,2 7,9 y 9,0 se sometieron a una hidrólisis ácida suave y los productos liberados se analizaron en una columna para resolución de carbohidratos en HPLC (Fig. 15). Los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis de los tres proteoglucanos fueron distintos. A pH 7.2 sólo se obtuvo (¹⁴C)glucosa y en algunos casos (¹⁴C)maltosa. A pH 7.9 se obtuvo una serie de oligisacáridos de hasta 6 ó 7 glucosas (M₆-M₇) y a pH 9.0

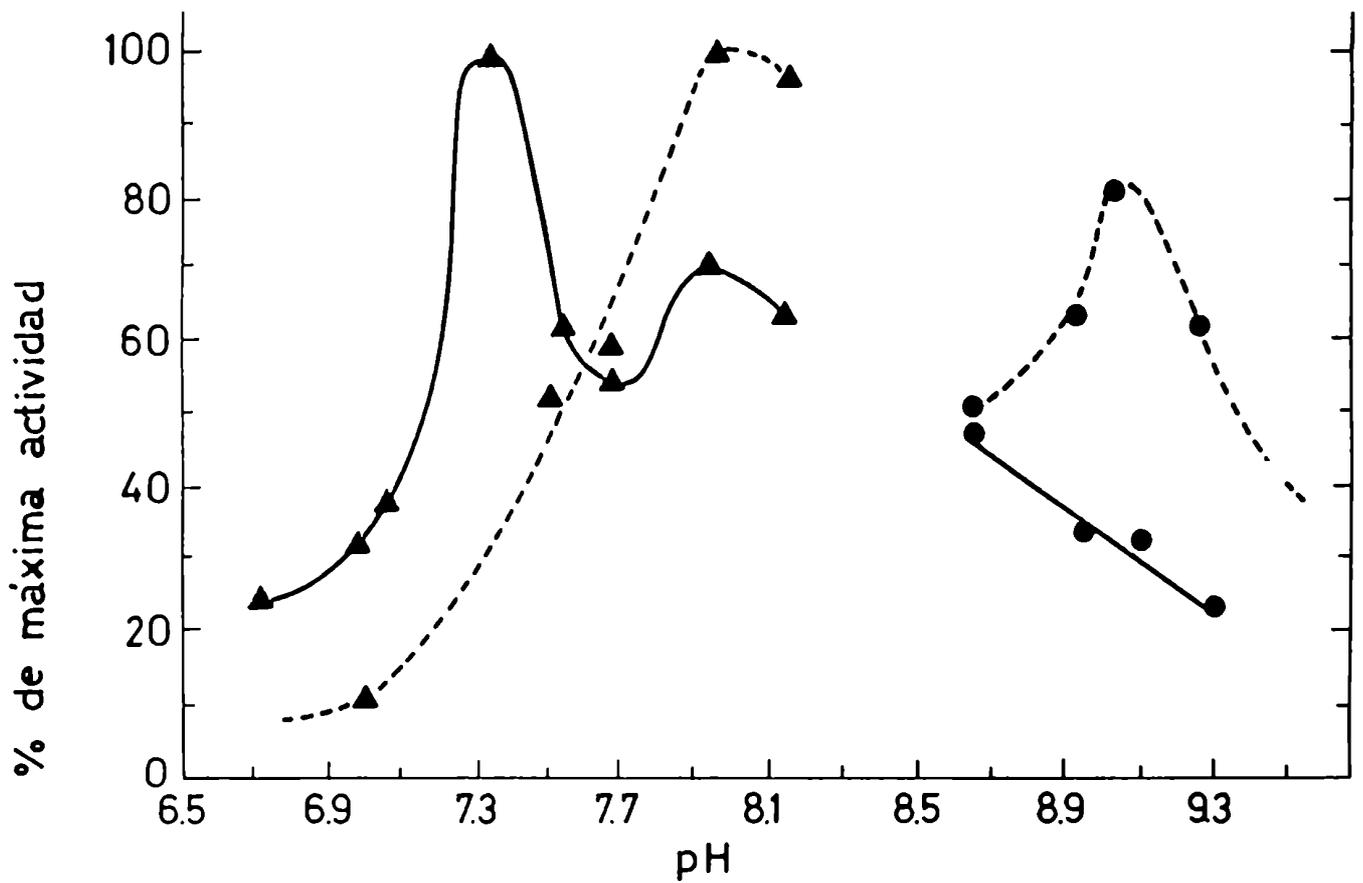


Figura 14- Curva de pH de las actividades GS y GSI.

Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos para la determinación de las actividades GS y GSI, respectivamente con excepción de buffers usados. Los resultados se expresan relativos a actividad (100%).

▲. Hepes: 20 mM NaOH.

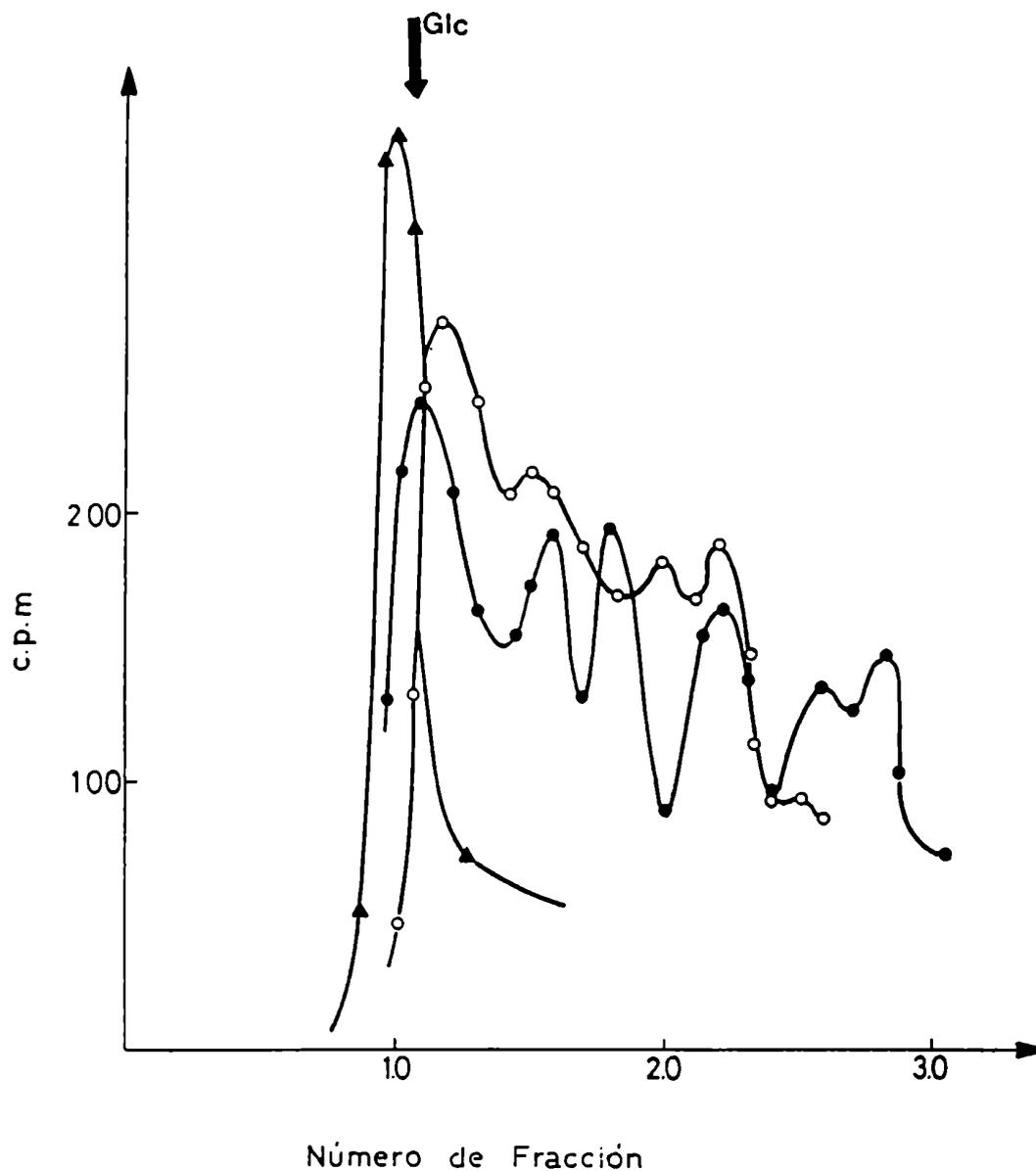


Figura 15- *Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)*. Los productos liberados por hidrólisis ácida suave (HCl 0.1N, 100°C, 10 min.), a partir de los proteoglucanos sintetizados a pH: 7.2 (▲), 7.9 (●) y 9.0 (○) en las condiciones descritas en Materiales y Métodos para la determinación de la actividad GSI pero sin el agregado de Glc-6-P, fueron cromatografiados en una columna para resolución de carbohidratos (30 cm x 3.9 ID), eluyendo con H₂O/acetonitrilo (21:79) con un flujo de 1 ml/min.

los picos obtenidos son menos definidos y llegan hasta 4 glucosas (M_4).

Los resultados obtenidos por HPLC se vieron confirmados cuando a los productos liberados por la hidrólisis ácida suave de los tres proteoglucanos sintetizados (a pH 7,2 ; 7,9 y 9,0) se los sometió a una cromatografía en papel (95) y luego se detectó la marca radioactiva por Scanning (Fig. 16). Los picos marcados que se obtuvieron para los proteoglucanos sintetizados fueron los siguientes: M_1 y M_2 para pH 7,2 y de M_1 hasta M_4 para pH 7,9 y 9,0 . En el caso del proteoglucano sintetizado a pH 9,0 se obtuvo una mayor cantidad de marca. En forma similar a lo que ocurre con el hígado (32), luego de cromatografiar los productos liberados por hidrólisis ácida suave de los tres proteoglucanos se obtuvo un pico marcado en el lugar de la siembra.

***PAGE CON SDS/UREA DE LOS PROTEOGLUCANOS SINTETIZADOS A PH 7,2;
7.9 Y 9.0***

Para corroborar las diferencias mencionadas en el punto anterior entre los proteoglucanos sintetizados a los tres pHs, los mismos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones disociantes con SDS/urea. En condiciones desnaturizantes con SDS 1% y sin urea los proteoglucanos no entraron al gel concentrador y, por lo tanto, no corrieron. Por esta razón los geles utilizados fueron con SDS/urea.

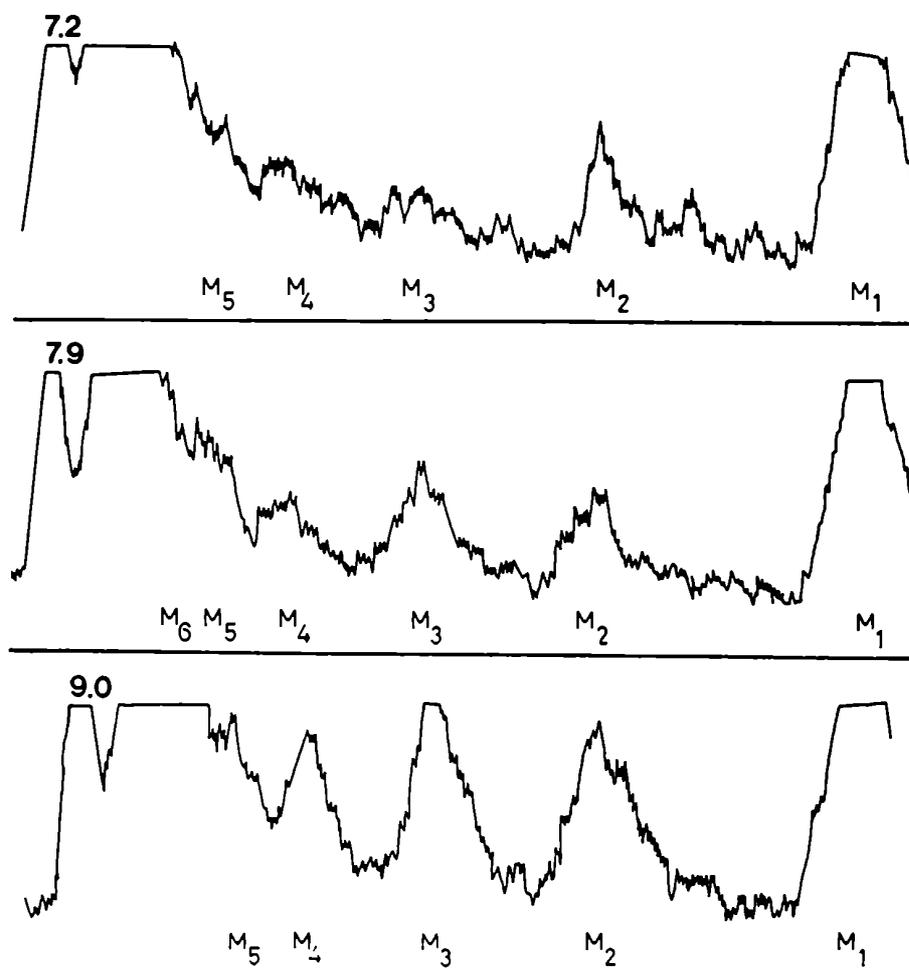


Figura 16- Cromatografía en papel de productos liberados por hidrólisis ácida suave (HCl 0.1N, 100°C, 10 min.), a partir de los proteoglicanos sintetizados a pH: 7.2, 7.9 y 9.0 en las condiciones descritas en la Fig. 15. Los productos liberados se cromatografiaron en papel con butanol/piridina/agua (4:3:4).

En la Fig. 17 se muestra el perfil de corrida de los tres proteoglicanos luego de autorradiografiarlos. La banda radiomarcada de 64,6 kDa es visible para los proteoglicanos sintetizados a los tres pHs. A pH 7,2 la radioactividad también se incorporó a una variedad de bandas con pesos moleculares entre 64,6 y 110 kDa. A pH 7,9 , además de la banda de 64,6 kDa, existen bandas de mayor peso molecular, desde 110 kDa hasta la entrada del gel separador, siendo las de mayor peso las más intensas. A pH 9,0 las bandas más notorias son las que corresponden a pesos moleculares entre 42,7 y 64,6 kDa.

Las diferencias en los perfiles de corrida de los proteoglicanos, junto con los datos presentados en las Figs. 15 y 16 se pueden atribuir al distinto grado de polimerización del (^{14}C)glucano α 1,4 unido a la proteína que existe en cada caso.

Curvas de tiempo

Teniendo en cuenta los resultados presentados en las Figs. 15 16 y 17 respecto de la síntesis de proteoglicanos distintos a los distintos pHs, se hicieron curvas de tiempo para la incorporación de glucosas a la fracción TCApp a pH 7,2 ; 7,9 y 9,0. Como se ve en la Fig. 18 (paneles a, b y c) las curvas de tiempo a los tres pHs muestran la existencia de dos velocidades, una lenta, hasta los 15 min., y un posterior aumento muy brusco de la incorporación de marca. A

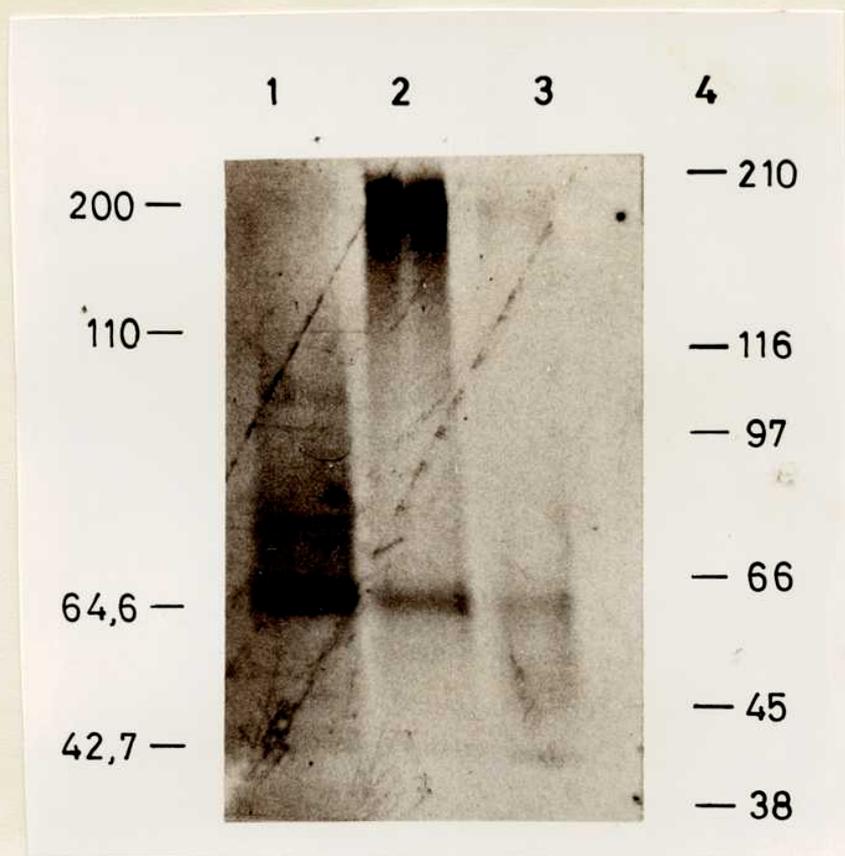


Figura 17- *Electroforesis en presencia de SDS/urea de los proteoglicanos sintetizados a pH: 7.2, 7.9 y 9.0. Autorradiografía.*

Los proteoglicanos fueron sintetizados en las condiciones standard a excepción de los pH's utilizados y sin el agregado de Glc-6-P. Las incubaciones a pH: 7.2 (carril 1), 7.9 (carril 2) y 9.0 (carril 3) se realizaron a 37°C durante 1 hora.

Los pesos moleculares de las bandas radioactivas se calcularon como se describió en Materiales y Métodos, tomando el punto medio de cada banda.

Standards de peso molecular (carril 4): miosina (PM: 205000), β -galactosidasa (PM: 116000), fosforilasa b (PM: 97000), albúmina sérica bovina (PM: 66000) y ovoalbúmina (PM: 45000).

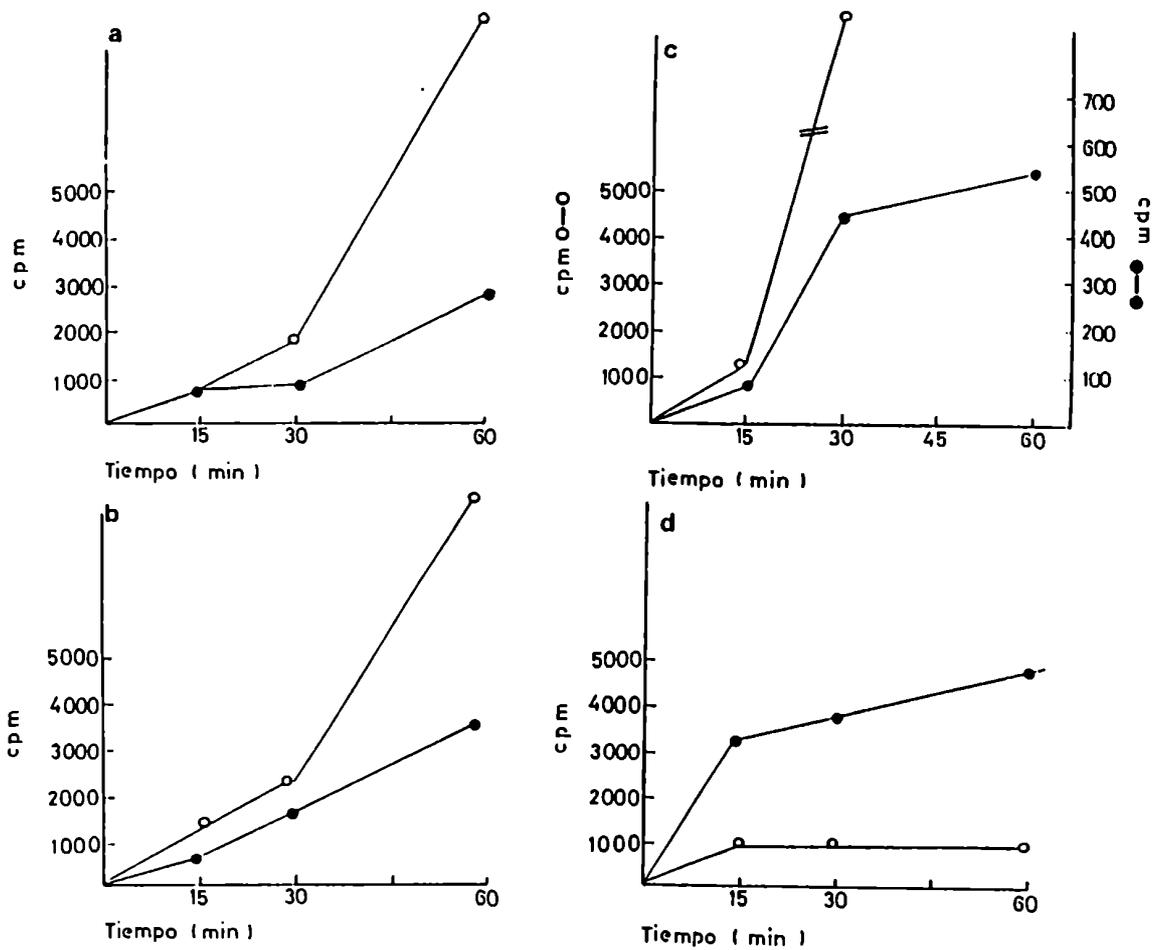


Figura 18- Curva de tiempo de incorporación de (¹⁴C)glucosa a la proteína en la reacción GSI.

Las incubaciones se realizaron a pH: 7.2 (paneles a), 7.9 (paneles b y d) y 9.0 (paneles c); en presencia (panel d) ó ausencia (paneles a, b y c) de MnCl₂ 5mM.

●—● : sin el agregado de Glc-6-P 10mM.

○—○ : con el agregado de Glc-6-P 10mM.

los pHs 7,2 y 7,9 las curvas analizadas en presencia o ausencia de Glc-6-P presentan la misma forma sólo que, cuando está presente la Glc-6-P, el disparo de la reacción es más marcado. Sin embargo, cuando se analiza la curva de tiempo a pH 9,0 se obtiene el mismo perfil que a los otros pHs en presencia de Glc-6-P, pero sin éste agregado se llega a una meseta en la incorporación al TCApp. En todos los casos se analizó el producto radioactivo que pasaba al TCAsol-EtOHpp. En presencia de Glc-6-P, la curva de aparición de producto en esta fase siguió la misma forma que la de aparición de producto en el TCApp. En ausencia de Glc-6-P el pasaje de marca al TCAsol-EtOHpp se hacía mucho más lento.

Efecto del agregado de Mn^{2+}

Cuando las curvas de tiempo analizadas en la sección anterior se hacían en presencia de $MnCl_2$, tanto con o sin Glc-6-P, el perfil obtenido a los tres pHs utilizados era el mismo y difería significativamente de aquellos casos en los que no estaba presente el Mn^{2+} .

Como se ve en la Fig. 18 (panel d) en presencia de $MnCl_2$ no se observa la etapa lenta y la incorporación llega a una meseta a los 15 min.

En presencia de Glc-6-P y $MnCl_2$ la cantidad de (^{14}C)glucosa incorporada al TCApp cuando se llega a la

meseta es sustancialmente menor que en ausencia del azúcar fosfato.

Teniendo en cuenta las condiciones utilizadas por otros autores para otros tejidos (105) se analizó la curva de tiempo para la transferencia de (^{14}C)glucosa al TCApp en presencia de MnCl_2 y Tris/HCl pH 7,5. En este caso se obtiene una curva igual a la del caso anterior (Fig.19). Si a los 15 min., durante la fase lineal de incorporación, se le agrega Glc-6-P, inmediatamente se frena la incorporación de marca a la fracción TCApp. En estas condiciones, la cantidad de marca que pasa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} es muy baja y no se estimula por el agregado de Glc-6-P.

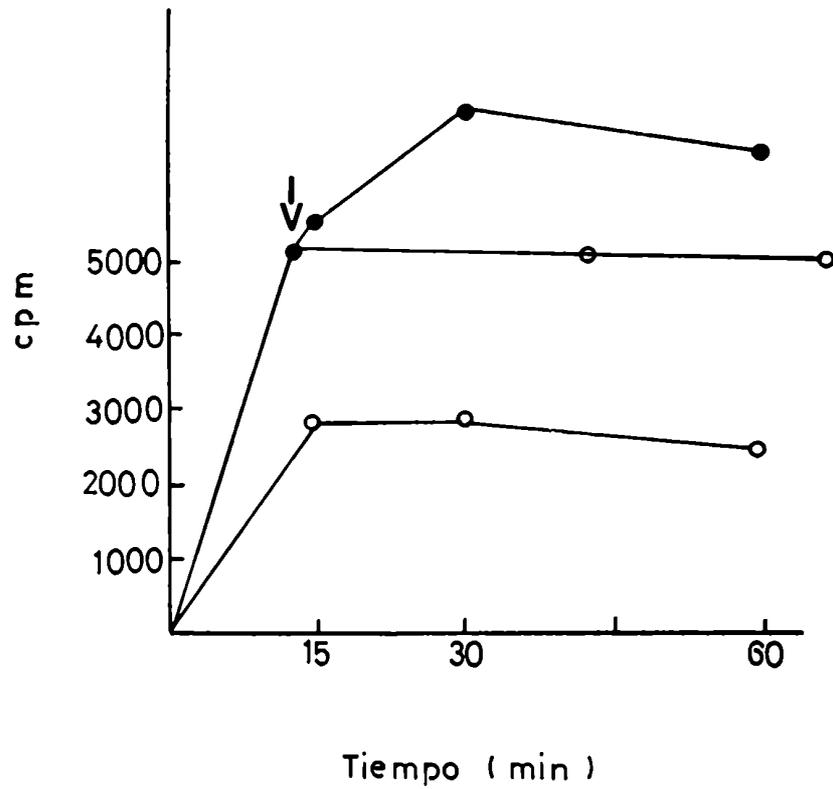


Figura 19- Curva de tiempo de incorporación de (^{14}C)glucosa a la proteína en la reacción GSI en presencia de Tris/HCl y $MnCl_2$.

Las incubaciones se realizaron en presencia de Tris/HCl 40 mM, pH: 7.5, $MnCl_2$ 5 mM, DTT 10 mM, en presencia (○-○) o ausencia (●-●) de Glc-6-P 10mM.

La flecha indica el agregado, a ése tiempo de 0.1 μ mol de Glc-6-P.

DISCUSION-II) PROCESO DE INICIACION

La acumulación de glucógeno en el cerebro está asociada a ciertos tipos de patologías. En estos casos la cantidad de polisacárido acumulada es mayor que en el estado fisiológico (77).

Utilizando ratas normales no fue posible aislar glucógeno a partir de sus cerebros, debido a la baja concentración presente del mismo (77). Sin embargo una primera aproximación sobre la estructura del glucógeno cerebral se pudo hacer analizando el polisacárido sintetizado "in vitro" con la enzima ramificante parcialmente purificada (proveniente del percolado de la columna de w-aminobutil agarosa). El producto obtenido presenta una longitud de onda de máxima absorción a 500 nm y un valor de A (absorbancia a la longitud de onda máxima/absorbancia a 410 nm) de 1.9- 2.1 (Fig. 11), lo que da idea de un polisacárido menos ramificado y con ramas externas más largas que el glucógeno standard (máx: 460 nm, A: 1.4). Ambos valores ubican al glucógeno de cerebro, en cuanto a estructura, entre el glucógeno standard y la amilopectina. Otros autores demostraron que, en casos patológicos como la glucogenosis tipo IV y la epilepsia de Lafora, el glucógeno acumulado presenta un bajo porcentaje de ramificación y un espectro en presencia de I₂ que recordaba al de la amilopectina (79,80).

A diferencia de lo que ocurre con otros tejidos de mamíferos como el corazón (38) e hígado (32) de rata, las preparaciones de cerebro no poseen glucógeno endógeno, o si lo tienen es en una cantidad tan pequeña que no es necesario ningún tratamiento previo o posterior a la extracción de los cerebros.

El homogenato de los cerebros sometido a los pasos de purificación detallados en la Tabla VI permitió detectar todas las actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis del glucógeno.

Las enzimas ramificante y fosforilasa copurificaron en todos los pasos y cromatografiaron en forma distinta a la glucógeno sintetasa (GS) y glucógeno sintetasa iniciadora (GSI) en las dos columnas utilizadas.

El hecho de que la actividad de glucógeno sintetasa y glucógeno sintetasa iniciadora cromatografiaran juntas en la columna de DEAE-celulosa (Fig. 5) podría deberse a que las actividades enzimáticas y el aceptor endógeno fueran la misma proteína, o que debido a sus cargas no fueran separables en las condiciones utilizadas. Sin embargo, la utilización de ω -aminobutilagarosa permitió separar las actividades de glucógeno sintetasa y glucógeno sintetasa iniciadora (Fig. 6), demostrando que existen diferencias entre ambas. En este caso el esquema de purificación permitió obtener las actividades separadas, parcialmente

puras y con un alto grado de inestabilidad (Tabla VI). Passoneau y col. purificaron 200 veces la glucógeno sintetasa de cerebro de cerdo pero con un rendimiento muy bajo (106).

La fracción A₃, con actividad GSI eluida de la columna de w-aminobutilagarosa (Fig. 6) resultó ser muy lábil y perdió su actividad a las 24 horas mantenida a 4°C. Esto pudo deberse a una pérdida de la actividad enzimática o por degradación proteolítica del aceptor endógeno.

Los resultados expuestos en la Tabla VIII confirmaron que el producto sintetizado por la actividad GSI a partir del UDP-glc es un glucano α 1,4 unido a una proteína. La sensibilidad que presentó el producto precipitable por TCA a la acción de proteasas como pronasa E y subtilisina demostraron que esta insolubilidad se debía a que el glucano α 1,4 estaba unido a una proteína. Por otro lado, luego de la digestión con proteasas libre de amilasas, el producto no era reprecipitable por TCA lo que descartó la posibilidad de que la insolubilidad en TCA se debiera a la presencia de glucanos α 1,4 no unidos a proteína y que fueran retrogradables en el medio ácido. El porcentaje de degradación con proteasas fue menor que el obtenido para preparaciones de corazón (38) e hígado (32) de rata.

Analizando las actividades GS y GSI se comprobó que ambas son específicas para el UDP-glc como dador de glucosa y

requieren DTT y EDTA (Tablas VII y X) tal como ocurre en el hígado (32) y el corazón (38).

Respecto a la hidrólisis ácida suave, el producto precipitable por TCA liberó un 60% de la marca radioactiva. En las condiciones utilizadas las uniones glucosídicas $\alpha 1,4$ no se hidrolizan por lo que se concluyó que la liberación de la marca radioactiva se debía a la ruptura de la unión aminoacil-azúcar. La sensibilidad de la unión del glucano a la proteína se demostró en hígado (33) y corazón (38) de rata, *E. coli* (107), y *Neurospora crassa* (37). Analizando los $t_{1/2}$ de la labilidad al ácido, se demostró que existen diferencias entre las uniones aminoacil-azúcar del corazón y las otras fuentes utilizadas.

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en tejidos vegetales (108) la unión glucosil-aminoácido no fue sensible a la hidrólisis por NaOH en las condiciones de β -eliminación utilizadas (Tabla IX). Con los datos obtenidos no se puede concluir cual es el aminoácido involucrado en la unión glucosil-aminoácido. Wheian y col. (109) y Curtino y col. (110) sugirieron, por experimentos contrapuestos, que en músculo de conejo, la unión sería a través del grupo hidroxilo fenólico de la tirosina. Trabajos más recientes del grupo de Cohen y col. demuestran que en la glucogenina de hígado de conejo la unión aminoacil-glucosa sería también por medio de la tirosina (111).

Los pHs óptimos para la transferencia de glucosa del UDP-Glc al glucógeno y a la proteína son claramente distintos (7.2 y 9.0). Estos datos son coincidentes con los publicados para la trãnglucosilación en hígado de rata (32).

La presencia de más de un pH óptimo para cada actividad (GS y GSI) hizo sospechar la presencia de una actividad adicional involucrada en la formación del proteoglucano (Fig.14).

Los glucanos α 1,4 unidos a la proteína, sintetizados a pH: 7.2, 7.9 y 9.0 fueron analizados por diferentes métodos. La hidrólisis ácida suave liberó oligosacáridos distintos en cuanto al número de glucosas para cada proteoglucano (Fig.15 y 16). Los oligosacáridos obtenidos para los proteoglucanos sintetizados a pH: 7.9 y 9.0 coinciden con los liberados por el sistema de hígado de rata (32), *E. coli* (107) y *N. crassa*(37) y son los que se atribuyen a la actividad GSI. Sin embargo, el proteoglucano sintetizado a pH:7.2 liberó solamente glucosa luego de la hidrólisis ácida. En todos los casos analizados por cromatografía en papel, se obtuvo un pico radiomarcado en el lugar de la siembra, lo que podría estar indicando la presencia de oligosacáridos preexistentes unidos a la proteína. Este resultado estaría de acuerdo con lo observado en los otros sistemas (32, 37, 107).

El análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida de los proteoglicanos sintetizados por el sistema de iniciación del cerebro indicó que, según el pH utilizado en la síntesis, las bandas de proteínas (¹⁴C)glucosiladas que se obtienen son distintas (Fig.17). Como ocurre con la preparación de corazón, se obtienen bandas de pesos moleculares variados que se atribuyen al diferente grado de polimerización del glucano sintetizado. La banda de 64.6 kDa, común a los tres productos sintetizados a pH: 7.2, 7.0 y 9.0, es la de mayor intensidad. A pH: 7.2 y 7.9, donde la glucógeno sintetasa tiene actividad detectable, se observan bandas de mayor peso molecular que llegan hasta la entrada del gel (Fig.17). Sin embargo a pH 9.0, donde la glucógeno sintetasa tiene muy baja actividad (20%), las bandas observadas son de pesos moleculares menores (de 42.7 a 64.6 kDa) lo que podría significar que poseen un grado de polimerización de glucosas menor que a pH:7.2 y 7.9. Estas bandas serían las que aún no han sido elongadas por la glucógeno sintetasa. A este pH estaríamos midiendo sólo las actividades GSI.

Por los resultados obtenidos en la Fig.15, donde a pH:9.0 sólo se ven picos correspondientes a glucosa, maltosa, maltotriosa maltotetraosa (M₁-M₄), es lógico pensar que las actividades GSI involucrarían, al menos, una actividad de transglucosilación de la primer glucosa sobre

el "primer" proteico (GSI₁) y otra (u otras) que incorporaría las glucosas (3 ó 4) subsiguientes (GSI₂). Estas dos actividades tendrían especificidades distintas ya que la actividad GSI₁ sería la responsable de la formación de una unión aminoacil-glucosa, mientras que la actividad GSI₂ generaría uniones glucosídicas α 1,4. Estas actividades estarían de acuerdo con el modelo sugerido y no demostrado por Cohen para el proceso de glucosilación de la glucogenina (112)

Según los resultados de las Figs. 15, 16 y 17 al pH: 7.2 las actividades GSI₁ y GS (glucógeno sintetasa) serían las activas, mientras que a pH: 7.9 todas las enzimas actuarían en forma concertada. En la Tabla XI se muestra una correlación entre las actividades transglucosilantes y los pHs utilizados.

Las curvas de transferencia de glucosa del UDP-Glc a la proteína en función del tiempo, a los tres pHs utilizados, presentan dos velocidades tanto en presencia como en ausencia de Glc-6-P. Durante la etapa lenta se formaría el aceptor glucosilado capaz de ser sustrato para la glucógeno sintetasa. A los pHs: 7.2 y 7.9, donde es muy activa la GS, luego de la etapa lenta la reacción de transferencia ocurre en forma rápida por elongación de los

pH	Actividad enzimática
7.2	GSI ₁ + GS
7.9	GSI ₁ + GSI ₂ + GS
9.0	GSI ₁ + GSI ₂

Tabla XI- *Correlación entre las actividades transglucosilantes y los pH's óptimos obtenidos.*

proteoglucanos formados. A pH: 9.0 y en ausencia de Glc-6-P, tambien se observa una etapa lenta y un rápido aumento posterior en la transferencia de glucosa, pero a los 30 min se alcanza una meseta. Este resultado estaría de acuerdo con lo presentado en las Figs. 15, 16 y 17. La meseta representaría la formación de un proteoglucano con pocas glucosas que no puede ser elongado por la GS debido a su baja actividad por el pH y por la ausencia de glc-6-P. En presencia de glc-6-P se hace detectable la actividad de GS no observandose la meseta.

En presencia de Mn^{2+} las curvas de tiempo para la transferencia de glucosa a la proteína no presentan dos velocidades (Figs.18 y 19). La incorporación de glucosa alcanza un meseta a los 30 min y éste no se debe al pasaje de marca a la fracción soluble en TCA y precipitable por etanol. El Mn^{2+} estaría estimulando la formación del "primer" sobre el cual se sintetiza luego una molécula de glucógeno.

Por otro lado, el agregado de Glc-6-P a estas incubaciones (en presencia de Mn^{2+}) produce una disminución en la incorporación de (^{14}C)glucosa a la proteína. Una vez iniciada la reacción de transglucosilación ésta se puede detener en forma inmediata por el agregado de glc-6-P (Fig. 19). Esta activación de la transferencia de las primeras glucosas a la proteína por efecto del Mn^{2+} está de acuerdo

con lo observado por Lomako en músculo de conejo (113) y por el grupo de Cardini en tejidos vegetales (105).

El hecho de que la transferencia de glucosas a la proteína, en presencia de Mn^{2+} , alcance una meseta hace pensar que una vez formado el "primer" (actividad GSI_1) éste no puede crecer hasta hacerse sustrato de la glucógeno sintetasa. Así, la actividad GSI_2 , que sintetiza el proteoglucano sustrato de la GS es inhibida por el Mn^{2+} y mucho más por el Mn^{2+} en presencia de glc-6-P.

Recientemente Pitcher y col. sugirieron también la existencia de dos actividades GSI , una que uniría una glucosa a la tirosina de la glucogenina y otra encargado de unir los 4 ó 5 restos glucosilos subsiguientes. Estos autores basan su sugerencia en análisis indirectos y no por estudios sobre los distintos productos formados por las dos actividades en cuestión. A diferencia de nuestros resultados, estos autores (112) obtienen estimulación por Mn^{2+} en el paso que involucra al actividad GSI_2 .

Tanto el grupo de Whelan (113) como el de Cohen (112) proponen una actividad autoglucozilante de la glucogenina que sería la que nosotros denominamos GSI_2 .

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis confirman la presunción original de Krisman y Barengo respecto de la existencia de más de una actividad de glucógeno sintetasa iniciadora (34).

En la Fig. 20 se esquematiza la síntesis del "primer" con las enzimas involucradas en la misma y se correlaciona cada paso con los resultados obtenidos en este trabajo.

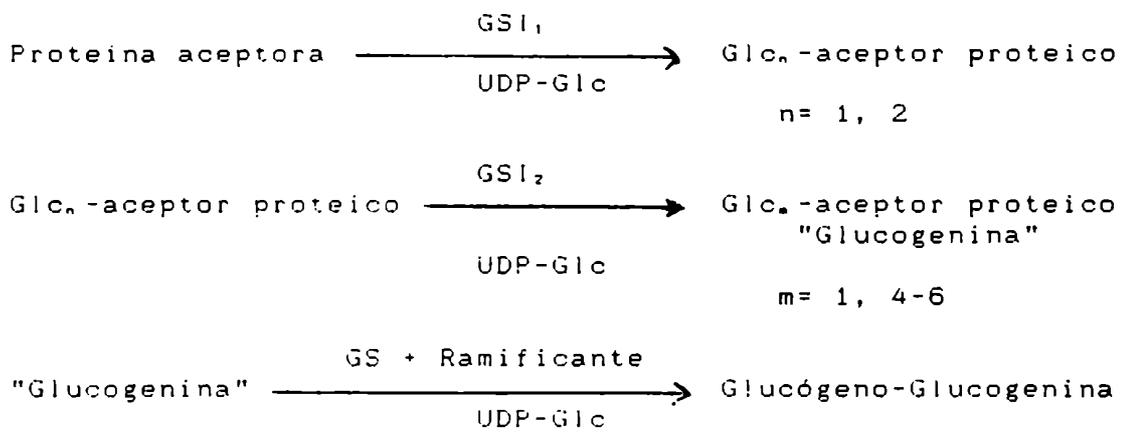
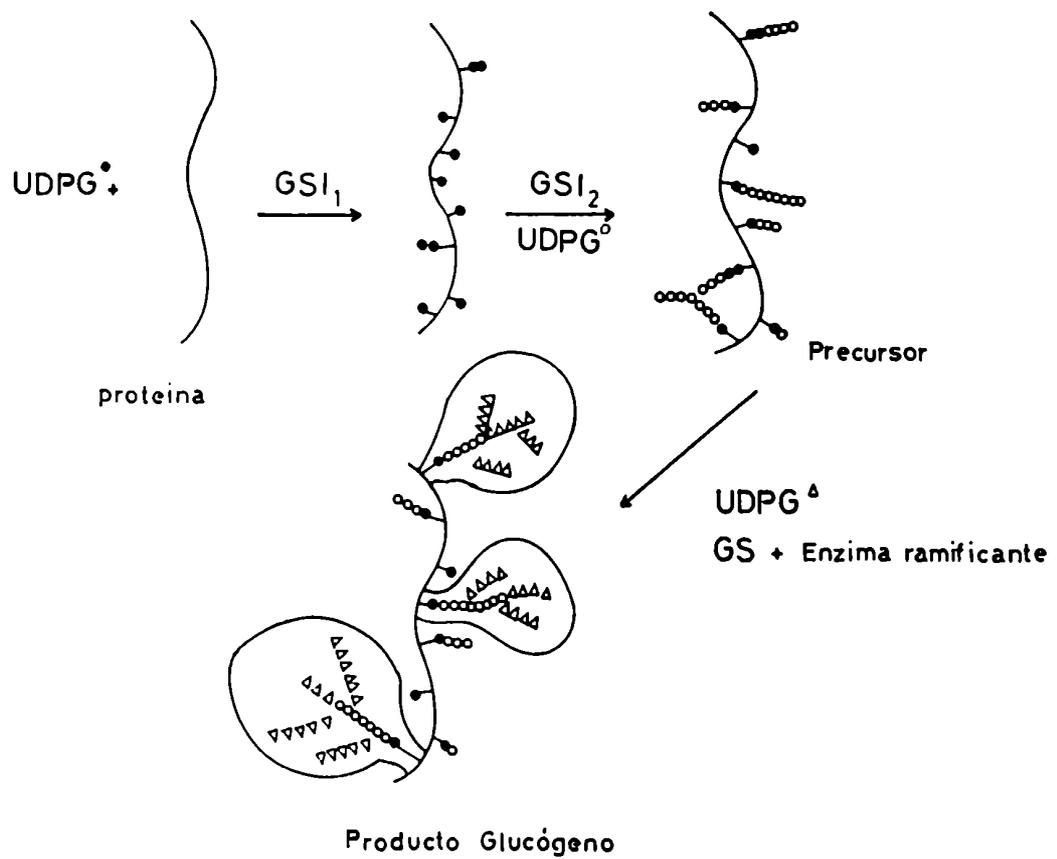


Figura 20- Modelo propuesto en esta Tesis para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno en cerebro de rata.

CONCLUSIONES

PROCESO DE RAMIFICACION

Se desarrolló un método específico, sensible y cuantitativo para medir la actividad ramificante. Este se basa en la determinación específica de las glucosas introducidas, por la enzima ramificante, en los puntos de ramificación.

Se demostró que la estructura final ramificada de un polisacárido depende de la especificidad propia de la enzima ramificante involucrada en su síntesis.

PROCESO DE INICIACION

-Se demostró que el modelo propuesto por Krisman (34) para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno es operativo, también, en el cerebro.

-Se confirmó y demostró la existencia de más de una actividad de glucógeno sintetasa iniciadora, corroborando no sólo lo sugerido por Krisman en año 1975 sino también proponiendo y demostrando la participación de una actividad adicional para el proceso de iniciación.

Olave R. Krisman
115



BIBLIOGRAFIA

- 1- Banks, W. y Muir, D. D. (1980) en "The Biochemistry of Plants" (J. Preiss, Ed.), Vol.3, pp 321-369. Academic Press Inc., N. Y.
- 2- Chen, M. y Whistler, R. L. (1977) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 34, 285.
- 3- Dey, P. M. (1978) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35, 341.
- 4- Ryman, B. E. y Whelan, W. J. (1971) Adv. Enzymol. 34, 285.
- 5- Rothman-Denes, L. B. y Cabbib, E. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 66, 967.
- 6- Smith, A. G. (1982) en "The Biology of Cyanobacteria" (N. G. Carr y B. A. Whilton, eds.), pp 47-86. Blackwell Scientific Publications, Londres.
- 7- Percival, E. (1970) en "The Carbohydrates" (W. Pigman y D. Horton, eds.), Vol. 2B, pp 537-568. Academic Press, Inc., N. Y.
- 8- Ward, K. Jr., Seib, P. A. (1970) en "The Carbohydrates" (W. Pigman y D. Horton, eds.), Vol. 2A, pp 413-445. Academic Press Inc., N. Y.
- 9- Whistler, R. L. y Richards, E. L. (1970) en "The Carbohydrates" (W. Pigman y D. Horton, eds.), Vol. 2A, pp 447-469. Academic Press Inc., N. Y.

- 10- Hook, M., Kjeilén, L., Johanson, y Robinson, J.
(1984) Ann. Rev. Biochem. 53, 847.
- 11- Costerton, J. W., Ingram, J. M. y Cheng, K. J. (1974)
Bacteriol. Rev. 38, 87.
- 12- Shockman, G. D. y Barret, J. F. (1983) Ann. Rev.
Microbiol. 37, 501.
- 13- Nikaido, H. y Vaara, M. (1985) Microbiol. Rev. 49, 1.
- 14- Wekesser, J., Drews, G. y Mayer, H. (1979) Ann. Rev.
Microbiol. 33, 215.
- 15- Peat, S., Whelan, W. J. y Turvey, J. R. (1956) J. Chem.
Soc., 2317.
- 16- Curá, J. A. y Krisman, C. R. (1990) Starch (en
impresión).
- 17- Rickson, F. R. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci. 210, 104.
- 18- French, D. (1975) en M. T. P. Int. Rev. Sci. Biochem.
Ser. One Biochemistry of Carbohydrates (Whelan, W. J. ed.),
Vol. V. pp 267. Butterworths Univ. Park Press, Londres.
- 19- Krisman, C. R. (1962) Anal. Biochem. 4, 17.
- 20- Kjolberg, O. y Manners, D. J. (1963) Biochem. J. 86,
258.
- 21- Beck, E. y Ziegler, P. (1989) Ann. Rev. Plant Physiol.
40, 95.
- 22- Gunja-Smith, Marshall, J. J., Mercier, C., Smith, E. E.
y Whelan, W. J. (1970). "A revision of the Meyer Bernfeld
Model of glycogen and amylopectin". FEBS Lett. 12, 101.

- 23- Parodi, A. J., Mordoh, J., Krisman, C. R. y Leloir, L. F. (1970) Eur. J. Biochem. 16, 466.
- 24- Mordoh, J., Leloir, L. F. y Krisman, C. R. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. 53, 86.
- 25- Drochmans, P. (1962) J. Ultraestruct. Res. 6, 141.
- 26- Calder, P. C. y Geddes, R. (1985) Carbohydr. Res. 135, 245.
- 27- Parodi, A. J., Mordoh, J., Krisman, C. R. y Leloir, L. F. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 132, 111.
- 28- Sutherland, E. W. y Randall, T. W. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1077.
- 29- Linn, T. C., Pettitt, F. H. y Reed, L. T. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. 62, 234.
- 30- Krisman, C. R. (1986) en "Bioquímica y Biología Molecular" (S. Ochoa, J. Oro y A. Sols, eds.) pp 89-91. Salvat Editores, Barcelona-España.
- 31- Leloir, L. F. (1964) en "Control of glycogen metabolism" (Whelan, W. J. y Cameron, M. P., eds.), pp 68-81. J. y A. Churchill Ltd., Londres.
- 32- Krisman, C. K. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1206.
- 33- Krisman, C. R. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci. 210, 81.
- 34- Krisman, C. R. y Barengo, R. (1975) Eur. J. Biochem. 52, 117.

- 36- Barengo, R. y Krisman, C. R. (1976) Acta Physiologica Latinoamer. XVI, 289.
- 37- Takahara, H. y Matsuda, K. (1977) J. Biochem. (Tokyo) 81, 1587.
- 38- Blumenfeld, M. L. y Krisman, C. R. (1986) Eur. J. Biochem. 156, 163.
- 39- Nimmo, H. G., Proud, Ch. G. y Cohen, P. (1976) Eur. J. Biochem. 68, 21.
- 40- Pitcher, J., Smythe, C., Campbell, D. G. y Cohen, P. (1987) Eur. J. Biochem. 169, 497.
- 41- Kennedy, L. D., Kirkman, B. R., Lomako, L., Rodríguez, I. R. y Whelan, W. J. (1985) e. "Membranes and Muscle" (Berman, M. C. Geversw y Opic, L. A., eds.), pp 65-84. ICSU Press/ IRL Press, Oxford.
- 42- Rodríguez, I. R. y Fliesler, S. J. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 260, 623.
- 43- Roach, P. J. (1981) Curr. Top. Cell. Biochem. 20, 45.
- 44- Roach, P. J. y Larner, J. (1977) Mol. Cell. Biochem. 15, 179.
- 45- Stalman, W. y Hers, H. G. (1973) "The Enzymes" 9, 309.
- 46- Smith, E. E. (1967) en "Control of glycogen metabolism" (Whelan, W. J., ed.), pp 203-213. Academic Press, Londres, N. Y.
- 47- Krisman, C. R. (1962) Biochim. Biophys. Acta 65, 307.
- 48- Satoh, K. y Sato, K. (1982) J. Biochem. 91, 1129.

- 49- Caudwell, F. B. y Cohen, P. (1980) Eur. J. Biochem. 109, 391.
- 50- Ponzetto- Zimmerman, C. y Gold, A. M. (1983) Biochem. 22, 3387.
- 51- Lavintman, N. y Krisman, C. R. (1964) Biochem. Biophys. Acta 89, 193.
- 52- Boyer, C. D. y Preiss, J. (1978) Carbohydr. Res. 61, 321.
- 53- Boyer, C. D. (1985) Phytochemistry 24, 15.
- 54- Gunja, Z. H., Manners, D. J. y Maung, K. (1960) Biochem. J. 75 , 441.
- 55- Boyer, C. y Preiss, J. (1977) Biochemistry 16, 3693.
- 56- Smyth, D. (1988) Plant Sci. 57, 1.
- 57- Matsumoto, A., Kamata, T. y Matsuda, K. (1983) J. Biochem. 94, 451.
- 58- Korneeva, G. A., Petrova, A. N., Varkstern, T. V. y Bayer, A. A. (1979) Eur. J. Biochem. 96, 339.
- 59- Borovsky, D., Smith, E. E. y Whelan, W. J. (1975) Eur. J. Biochem. 59, 615.
- 60- Akemi Doi (1969) Biochem. Biophys. Acta 184, 477.
- 61- Boyer, C. y Preiss, J. (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 169.
- 62- Sicher, R. y Kremer, D. (1989) Plant Sci. 57, 9.
- 63- Boyer, C. D. y Preiss, J. (1978) Carbohydr. Res. 61, 321.

- 64- Singh, B. J. y Preiss, J. (1985) *Plant Physiol.* 79, 34.
- 65- Hawker, J. S., Ozbun, J. L., Ozaki, H., Greenburg, E. y Preiss, J. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 530.
- 66- Larner, J. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 491.
- 67- Verhue, W y Hers, H. G. (1966) *Biochem. J* 99, 222.
- 68- Brown, D. H. y Brown, B. I. (1966) *Met. Enzymol.* 8, 395.
- 69- Larner, J. (1955) *Met. Enzymol.* 1, 222.
- 70- Krisman, C. R. (1962) *Biochem. Biophys. Acta* 65, 301.
- 71- Krisman, C. R. y Kopun, M. (1982) *Eur. J. Cell. Biol.* 27, 18.
- 72- Fletterick, R. J. y Madsen, N. B. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 31.
- 73- Hers, H. G. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 167.
- 74- Cohen, P. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* 7, 459.
- 75- Parker, P. J., Caudwell, F. B. y Cohen, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130 227.
- 76- Parker, P. J., Embi, N., Caudwell, F. B. y Cohen, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 124, 47.
- 77- Clarke, D. D., Lajtha, A. L. y Maker, H. S. (1989) en "Basic Neurochemistry" (Siegel, G. J., Wayne Albers, R., Agranoff, W. y Molinoff, P. B. eds.) pp 541.
- 78- Goldberg, N. D. y O'Toole, A. G. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3053.
- 79- Brown, B. I. y Brown, D. H. (1966) *Biochemistry* 56, 725.

- 80- Zimmerman, C. P. y Gold, A. M. (1982) *Biochem. Med.* 28, 83.
- 81- Cowie, J. M. y Greenwood, C. T. (1957) *L. Chem. Soc.* 2862.
- 82- Mordoh, J., Krisman, C. R. y Leloir, L. F. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 265.
- 83- Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 84- Montgomery, R. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 378.
- 85- Ashwell, J. (1957) *Met. Enzymol.* 3, 85.
- 86- Fales, F. W. (1959) *Anai. Chem.* 31, 1898.
- 87- Couso, R.O., Ielpi, L., García, R. y Dankert, M. A. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 434.
- 88- Fisher, H. y Krebs, E. G. (1962) *Met. Enzymol.* 7, 369.
- 89- Brown, D. H. y Brown, B. I. (1966) *Met. Enzymol.* 7, 515.
- 90- Schoch, T. J. (1942) *J. Chem. Soc.* 64, 2957.
- 91- Blumenfeld, M. L. y Krisman, C. R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 11460.
- 92- Bray, G. A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279.
- 93- Krisman, C. R. y Barengo, R. (1975) 66, 584.
- 94- Mendonca, M. H. y Krisman, C. R. (1989) *Ann. Asoc. Quim. Argent.* 77, 15.
- 95- Trevelyan, W. E., Procter, D. P. y Harrison, J. S. (1950) *Nature* 166, 444.

- 96- Laemmli, V. K. (1970) Nature 227, 680.
- 97- Weber, K. y Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406.
- 98- Chamberlain, J. P. (1979) Anal. Biochem. 98, 132.
- 99- Krisman, C. R., Tolmasky, D. S. y Raffo, S. (1985) Anal. Biochem. 147, 491.
- 100- Tolmasky, D. S. y Krisman, C. R. (1987) Eur. J. Biochem. 168, 393.
- 101- Frydman, R. y C. E. (1964) Biochem. Biophys. Res. Comm. 14, 353.
- 102- Lavintman, N. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 116, 1.
- 103- Hodges, H. F., Creech, R. G. y Hoerch, J. D. (1969) Biochim. Biophys. Acta 185, 70.
- 104- Erlander, S. R. (1958) Enzymologia 19, 273.
- 105- Lavintman, N., Tandecarz, J. S., Carceller, M., Mendiara, S. y Cardini, C. E. (1974) Eur. J. Biochem. 50, 145.
- 106- Passoneau, J. V. y Swartz, J. P. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2287.
- 107- Barengo, R. (1980) Tesis Doctoral, U. B. A.
- 108- Moreno, S., Cardini, C. E. y Tandecarz, J. S. (1986) Eur. J. Biochem. 157, 539.
- 109- Rodríguez, I. R. y Whelan, W. J. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 132, 829.
- 110- Aon, M. A. y Curtino, J. A. (1984) Eur. J. Biochem. 140, 557.

- 111- Smythe, Caudwell. B., Ferguson, M. y Cohen, P.
(1988) EMBO J. 7, 2681.
- 112- Pitcher, J., Smythe, C. y Cohen, P. (1988) Eur. J.
Biochem. 176, 391.
- 113- Lomako, J., Lomako, W. y Whelan, W. J. (1988) FASEB J.
2. 3097.

Buenos Aires, 28 de mayo de 1990

Sres. Miembros de la
Subcomisión de Doctorado

De mi mayor consideración:

Por la presente elevo ante ustedes la Tesis Doctoral de la Licenciada Diana S. Tolmasky realizada en mi laboratorio en el tema "Biosíntesis de polisacáridos. Iniciación en la biosíntesis del glucógeno. Enzimas involucradas", en cerebro de rata.

Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

1-Se desarrolló un método específico, sensible y cuantitativo para determinar la actividad ramificante. La metodología propuesta consiste en la determinación específica de las glucosas involucradas en los puntos de ramificación.

2-Se demostró que la estructura final de un polisacárido depende de la especificidad de la enzima ramificante involucrada en su síntesis.

3-Se demostró que en el cerebro, tejido que no acumula glucógeno en condiciones normales, también es operativo el

modelo propuesto por Krisman para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno.

4-Se estudiaron, en particular las actividades involucradas en la formación del glucano unido covalentemente a la proteína. Se demostró que en el proceso de iniciación propiamente dicho participan por lo menos dos actividades enzimáticas (GSI₁ y GSI₂) en la formación del "primer" apropiado para la glucógeno sintetasa.

Los resultados de los ítems 1 y 2 ya han sido publicados en revistas internacionales, y los correspondientes a los ítems 3 y 4 han sido enviados recientemente.

Sin otro particular saludo a
uds. muy atentamente,



Dra. Clara R. Krisman