Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Síntesis de alfa -1,4 glucanos unidos a proteína : Aislamiento de glucosiltransferasas de una fracción particulada de papa

Moreno, Silvia

1984

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

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

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

Cita tipo APA:
Moreno, Silvia. (1984). Síntesis de alfa -1,4 glucanos unidos a proteína : Aislamiento de glucosiltransferasas de una fracción particulada de papa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1864_Moreno.pdf

Cita tipo Chicago:
Moreno, Silvia. "Síntesis de alfa -1,4 glucanos unidos a proteína : Aislamiento de glucosiltransferasas de una fracción particulada de papa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1864_Moreno.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

SINTESIS DE α-1,4 GLUCANOS UNIDOS A PROTEINA: AISLAMIENTO DE GLUCOSILTRANSFERASAS DE UNA FRACCION PARTICULADA DE PAPA

AUTORA

SILVIA MORENO

DIRECTORA DE TESIS: JUANA S. TANDECARZ

LUGAR DE TRABAJO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS

"FUNDACION CAMPOMAR"

PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

1984

1864

A mis padres y hermano,

A mi esposo.

Quiero demostrar mi profundo agradecimiento a quienes de una u otra forma posibilitaron la realización de esta tesis.

A la Dra. Juana Sara Tandecarz, quien dirigió inteligentemente este trabajo, brindándome su intensa dedicación y apoyo en todo momento.

Al Dr. Carlos Eugenio Cardini, por sus importantes sugerencias, su constante ayuda y muy especialmente por haberme aceptado como integrante de su grupo de investigación en los comienzos de mi carrera.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, y muy en especial al Dr. Luis F. Leloir, por haberme brindado los medios necesarios para realizar esta tesis.

A mis amigos y compañeros del I.I.B., cuyas críticas y sugerencias me fueron muy útiles.

Al Dr. Juan Accorinti, Consejero de Estudios, por su valioso apoyo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que contribuyó a la realización de este trabajo.

A la Sra. María Dolores Turró, por la transcripción de esta tesis.

A la Sra. Soledad de Giménez, por su desinteresada colaboración.

Vaya mi especial agradecimiento a mi familia, por su constante apoyo y paciencia en los momentos más críticos.

ABREVIATURAS

Aba:	Acido α-aminobutírico.
ADP:	Adenosina 5'difosfato.
ADP-Glc:	Adenosina 5'difosfato glucosa.
ALa:	Alanina.
Å:	10^{-10}.
Ara:	Arabinosa.
Asn:	Asparagina.
ATP:	Adenosina 5'-trifosfato.
Bicina:	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina.
Con A:	Concanavalina A.
cpm:	Cuentas por minuto.
DEAE-celulosa:	O-(dietilaminoetil)celulosa.
DNA:	Acido desoxirribonucleico.
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético.
f, femto:	10^{-15}.
Gal:	Galactosa.
Glc:	Glucosa.
Glc-1-P: / Glucosa-1-P:	Glucosa-1-fosfato.
Hyl:	Hidroxilisina.
Hyp:	Hidroxiprolina.
K_m:	Constante de Michaelis.

M_2:	Maltosa.
M_2ol:	Maltitol.
Man:	Manosa.
Mes:	Acido 2-(N-morfolino)etansulfónico.
μ, micro:	10^{-6}.
Mops:	Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.
n,nano:	10^{-9}.
NAcGal:	2 deoxi-2-N-acetilamino-D-galactosa.
NAcGlc:	2 deoxi-2-N-acetilamino-D-glucosa.
PAS:	Coloración de Schiff del ácido periódico.
Pi:	Fosfato inorgánico.
p,pico:	10^{-12}.
PPi:	Pirofosfato inorgánico.
PPO:	2,5 difeniloxazol.
RNA:	Acido ribonucleico.
SDS:	Dodecil sulfato de sodio.
Ser:	Serina.
Sol:	Sorbitol.
TCA:	Acido tricloroacético.

Treo:	Treonina.
Tris:	Tris-(hidroximetil)aminometano.
UDP:	Uridina 5'difosfato.
UDP-Glc:	Uridina 5'difosfato glucosa.
UTP:	Uridina 5'trifosfato.
Xil:	Xilosa.

INDICE

Pag.

I. INTRODUCCION 1

I.1. Generalidades. 1

I.2. Almidón. 2

I.2.1. Composición. 5

I.2.2. Estructura física del grano de almidón. 8

I.2.2.1. Naturaleza cristalina. 8

I.2.2.2. Orientación molecular en el gránulo. 12

I.3. Mecanismo de síntesis del almidón. 14

I.3.1. Enzimas involucradas. 16

I.3.2. Vías de síntesis del almidón. 20

I.3.3. Síntesis de un aceptor glucoproteico. 23

I.4. Glicoproteínas. 27

I.4.1. Estructura de las glicoproteínas. 29

I.4.2. Unión N-glicosídica. 32

I.4.3. Unión O-glicosídica. 33

I.4.4. Biosíntesis de glicoproteínas. 37

I.5. Antecedentes recientes y objetivos de esta investigación. 39

II. MATERIALES Y METODOS 45

II.1. Compuestos químicos y enzimas auxiliares. 45

II.1.1. Compuestos radioactivos. 45

II.1.2. Enzimas auxiliares. 45

II.1.3. Drogas y reactivos químicos. 46

II.2. Preparaciones enzimáticas. 46

II.2.1. Preparación particulada. 46

II.2.2. Solubilización de la preparación particulada. 47

II.2.3. Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción solubilizada. 48

II.3. Medición de las actividades enzimáticas. 48

II.3.1. Medición de las actividades de UDP(ADP)-Glc almidón sintetasa y fosforilasa (dependientes de aceptor exógeno). 48

II.3.2. Medición de la actividad de fosforilasa independiente de

aceptor exógeno. 50

II.3.3. Medición de la actividad de la enzima que cataliza la Reacción 1 (UDP-Glc: proteína transglucosilasa I). 50

II.3.4. Medición de las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de un α-glucano unido a proteína (Reacción 1 + Reacción 2). 51

II.3.5. Reconstitución del sistema de síntesis de un α-glucano unido a proteína. 52

II.4. Tratamientos enzimáticos. 53

II.4.1. Obtención de productos radioactivos glucosilados. 53

II.4.2. β-amilasa. 53

II.4.3. α-amilasa. 54

II.4.4. Proteasa. 54

II.5. Determinación de la unión O-glicosídica. 55

II.5.1. Tratamiento con BH_4Na en medio alcalino. 55

II.5.2. Tratamiento con $B(^3H)_4Na$ en medio alcalino. 55

II.6. Métodos cromatográficos. 56

II.6.1. Cromatografía de filtración en gel. 56

II.6.1.1. Determinación del radio de Stokes. 57

II.6.1.2. Determinación del peso molecular. 57

II.6.1.3. Coeficiente friccional. 58

II.6.2. Cromatografía de afinidad en columna de Concanavalina A Sepharosa. 58

II.6.3. Cromatografía en papel. 59

II.6.4. Cromatografía en capa delgada. 59

II.7. Electroforesis. 60

II.7.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida. 60

II.7.1.1. Condiciones no desnaturalizantes. 60

II.7.1.2. Condiciones desnaturalizantes. 61

II.7.1.3. Visualización de la actividad enzimática en geles. 62

II.7.1.4. Determinación de pesos moleculares en condiciones desnaturalizantes. 63

II.7.1.5. Recuperación de compuestos radioactivos de los geles. 63

II.7.2. Electroforesis de alto voltaje en papel. 63

II.8. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. 64

II.8.1. Preparación de los gradientes de sacarosa. 64

II.8.2. Determinación del coeficiente de sedimentación. 65

II.9. Otras técnicas. 65

II.9.1. Dosaje de proteínas. 65

II.9.2. Determinación de proteínas marcadoras en gradientes de sacarosa y en columnas de Sephacryl S-300. 65

II.9.3. Detección de radioactividad. 67

II.9.3.1. Centelleo líquido. 67

II.9.3.2. En radiocromatogramas en papel y en capa delgada. 68

II.9.3.3. En geles de poliacrilamida. 68

III. RESULTADOS 69

III.1. Solubilización de la preparación de membranas. 69

III.1.1. Glucosiltransferasas presentes en la fracción solubilizada. 70

III.1.2. Propiedades del sistema enzimático de síntesis de un α-glucano unido a proteína. 74

III.1.2.1. Propiedades de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. 74

III.1.2.2. Propiedades de las enzimas que catalizan la formación de uniones glucosídicas. 76

III.1.3. Caracterización "in vitro" de los productos de reacción. 82

III.1.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y urea. 87

III.2. Separación de las glucosiltransferasas solubilizadas. 90

III.3. Estudio de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (Pico I). 98

III.3.1. Propiedades cinéticas. 98

III.3.2. Especificidad de dador y de aceptor de glucosa. 98

III.3.3. Presencia de componentes glucosilados en el Pico I no involucrados en la actividad aceptora de la enzima. 102

III.3.4. Determinación del radio de Stokes (a) por filtración en Sephacryl S-300. 104

III.3.5. Determinación del coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}$) por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. 104

III.3.6. Cálculo del peso molecular. 110

III.4. Análisis de las enzimas presentes en el Pico IIa y en el Pico IIb. 112

III.4.1. Fosforilasa: propiedades cinéticas. 112

III.4.2. Almidón sintetasa: propiedades cinéticas. 114

III.4.3 Actividad de fosforilasa en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. 117

III.4.4. Determinación del peso molecular de la subunidad de fosforilasa. 117

III.4.5. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de los picos IIa y IIb. 119

III.5. Reconstitución del sistema original de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína. 122

III.5.1. Experimentos de reconstitución. 122

III.5.2. Análisis de los productos sintetizados en los experimentos de reconstitución por geles de poliacrilamida en condiciones disociantes. 127

III.6. Determinación de la unión O-glicosídica. 136

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES 143

IV.1. Solubilización de la preparación de membranas. 143

IV.2. Caracterización de las glucosiltransferasas y de los productos de reacción. 144

IV.3. Separación de las glucosiltransferasas solubilizadas. 147

IV.3.1. UDP-proteína transglucosilasa I. 147

IV.3.2. Análisis de las enzimas presentes en los picos IIa y IIb. 150

IV.4. Reconstitución del sistema. 151

V. REFERENCIAS 155

I. INTRODUCCION.

I.1. Generalidades.

Los polisacáridos vegetales constituyen un campo de gran significación biológica. Son los compuestos biológicos más abundantes sobre la Tierra y la principal fuente de energía de los seres vivientes. El almidón, un polímero de glucosa, ha sido y sigue siendo motivo de numerosas investigaciones y comprende un extenso campo de investigación. Además del rol fundamental que cumple en el metabolismo celular de los vegetales, fue el primer polímero para el cual se propuso una estructura helicoidal y junto con el glucógeno (polímero de reserva en los tejidos animales), fueron los primeros polímeros naturales sintetizados *in vitro*. De esta forma, se demostró por primera vez cómo la energía que es liberada de reacciones oxidativas se puede usar posteriormente en una secuencia de reacciones concatenadas.

El estudio de la biosíntesis del almidón es el último paso de una cadena de sucesos, el primero de los cuales es descubrir su existencia, su ubicación sistemática y su distribución en las plantas, pasando luego a conocer su composición química y los métodos analíticos para su estudio. Diferentes disciplinas científicas se han orientado para el conocimiento de la

estructura, función y metabolismo del almidón, como la química orgánica y analítica, la fisiología vegetal, la bioquímica y la histoquímica. Así, por ejemplo, para analizar la estructura y función de las organelas celulares en las cuales se sintetiza el almidón, se han combinado técnicas bioquímicas con estudios de microscopía electrónica.

I.2. Almidón.

El almidón es un polímero de D-glucosa de alto peso molecular y el principal polisacárido de reserva en las plantas. Las características físicas del almidón son las ideales para constituir un material de reserva nutricional: es un compuesto insoluble en agua y jugos celulares, en donde puede permanecer inalterado por largo tiempo, no interfiriendo con el metabolismo normal de las células. Puede acumularse en cantidades tales que prácticamente llena casi toda la célula. Se encuentra como gránulos insolubles en agua, semicristalinos, que exhiben birrefringencia en luz polarizada.

Los almidones pueden clasificarse en dos tipos: transitorios, los que tienen una existencia transiente debido a que son metabolizados regularmente y, de reserva, aquellos que tienen una existencia larga, no

sujeta a los aumentos y disminuciones diarias (Banks y Muir, 1980). Los pequeños gránulos de almidón que se desarrollan en los cloroplastos de las hojas verdes durante el período de fotosíntesis activa y se degradan a sacarosa durante el período nocturno, son del tipo transitorio. Durante la fotosíntesis se acumulan en las hojas grandes cantidades de hidratos de carbono, lo que imposibilita su transporte inmediato debido al metabolismo lento y regular de los vegetales. De esta forma, el almidón se va acumulando en su mayor parte, en forma de polisacárido insoluble y en menor cantidad, en sacarosa, que se puede traslocar al resto del vegetal disuelta en la savia, en proporción del 20-30%.

Los almidones de reserva se acumulan en grandes cantidades en semillas, rizomas o tubérculos. En dichos tejidos se produce la transformación reversible entre el almidón y la sacarosa, por caminos metabólicos todavía no dilucidados completamente.

El almidón se sintetiza en los plástidos de las células vegetales, de los cuales hay varios tipos. Los plástidos existen en una variedad de formas y cubren un amplio espectro de estructuras y funciones; intervienen en el metabolismo energético y en el almacenamiento. Consisten en una matriz o estroma limitada por una doble

membrana; contienen DNA que codifica para gran parte de sus polipéptidos, los que son sintetizados por los ribosomas del mismo plástido. El almidón de reserva se sintetiza en amiloplastos, que son plástidos en los que la mayor parte de su volumen interno está ocupado por almidón y su función es sintetizar almidón como material de reserva a partir de los azúcares provenientes de los tejidos fotosintetizantes. El polisacárido puede encontrarse como un único grano o como varios granos pequeños. Su forma está determinada genéticamente, lo mismo que su tamaño, composición química y fuerzas de unión intermoleculares. Estas características parecen estar dictadas por el núcleo y no por el amiloplasto. Por el contrario, el gránulo de almidón depositado transitoriamente en los cloroplastos parece no tener una forma determinada genéticamente, sino por el espacio disponible dentro del plástido (Salema y Badenhuizen, 1967).

En células meristemáticas de tallo y raíz existen pequeños plástidos incoloros denominados proplástidos. En ciertas zonas diferenciadas de la raíz, estos plástidos elaboran granos de almidón y se transforman en amiloplastos durante el desarrollo embrionario.

I.2.1. Composición del almidón.

El almidón está compuesto principalmente por dos polisacáridos, amilosa y amilopectina, ambos polímeros de α-D-glucopiranosa, en proporciones características de cada vegetal. La mayoría de los almidones tienen 15-25% de amilosa (Greenwood, C.T., 1956) y proporciones que van del 75% al 85% del componente ramificado. Además, el grano de almidón puede contener hasta un 0,6% de lípidos complejos, especialmente del tipo lisolecitina y esteroles libres o ésteres glucósidos y pequeñas cantidades de proteínas (algunas de las cuales poseen actividad enzimática), nucleótidos y varias sustancias inorgánicas (French, 1975).

Ambos polisacáridos componentes del almidón tienen diferentes propiedades químicas y físicas; en la Tabla 1 se resumen algunas de las principales.

TABLA 1: Propiedades de los componentes del almidón.

	Amilosa	Amilopectina
Configuración molecular	esencialmente lineal	altamente ramificado
Grado de polimerización (DP)	10^3	10^4-10^5
Longitud promedio de cadena (CL)	10^3	20-25
Peso molecular promedio	10^6	10^8
Difracción de rayos X	cristalina	amorfa
Formación de complejos	ilimitada	limitada
Color con iodo	azul	púrpura
λ_{max} (nm)	660	530-550
Conversión a maltosa (%):		
i) con β-amilasa	70	55
ii) con enzima derramificante y luego con β-amilasa	100	75
iii) con α-amilasa	110	90

La naturaleza lineal de la amilosa le confiere la propiedad de formar complejos con ácidos grasos, con alcoholes de bajo peso molecular y con iodo. La afinidad por el iodo es alta y se forma un complejo amilosa-iodo de color azul, con un máximo de absorción a 660 nm. Puede cristalizar espontáneamente en solución acuosa, fenómeno conocido como retrogradación, debido a la tendencia de las moléculas lineales a alinearse por uniones puentes de hidrógeno y formar agregados. Este fenómeno es irreversible y depende de la concentración, del pH, de la temperatura y del grado de polimerización (French, 1975). También, debido a su estructura lineal, la amilosa es degradada por β-amilasa (French, D., 1960). Esta exoenzima (E.C. 3.2.1.2.) cataliza la hidrólisis gradual de uniones glucosídicas α-(1,4) alternadas, liberando maltosa. Como la hidrólisis con esta enzima es incompleta, la amilosa debe poseer alguna característica estructural extra además de las uniones glucosídicas α-(1,4) normales. Como el tratamiento sucesivo de la amilosa con una enzima derramificante seguido por β-amilolisis resulta en la conversión completa en maltosa, se deduce que la amilosa contiene un número pequeño de uniones intercadena o puntos de ramificación (Kjolberg y Manners, 1963). La enzima derramificante (E.C. 3.2.1.41.) es capaz

de hidrolizar selectivamente las uniones glucosídicas α-(1,4) intercadena presentes en amilopectina.

Por otro lado, el componente ramificado del almidón es estable en solución acuosa y por lo general no forma complejos. La afinidad por el iodo se encuentra disminuída, debido a la estructura ramificada, a valores mínimos y la coloración con iodo es púrpura con un máximo de absorción a 540 nm. La β-amilolisis de la amilopectina es incompleta, ya que la enzima es incapaz de hidrolizar las uniones intercadenas más externas. La acción enzimática está limitada a las cadenas exteriores y se detiene a una distancia de 2-3 residuos de glucosa de una ramificación.

En el almidón de papa se ha hallado una pequeña proporción de fosfato unido covalentemente al C6 y C3 de los residuos de glucosa de la amilopectina (Takeda y Hizukuri, 1982).

I.2.2. Estructura física del grano de almidón.

I.2.2.1. Naturaleza cristalina.

Los granos de almidón en condiciones adecuadas producen patrones característicos de difracción de rayos X, lo que indica que poseen una estructura cristalina altamente ordenada. Los gránulos de almidón intactos exhiben tres diagramas de difracción característicos,

denominados diagramas A, B y C (Fig. 1). Mientras que los dos primeros representan una verdadera estructura cristalina del almidón, el tercero es una combinación de los otros dos. El diagrama A está asociado con los almidones de cereales, el B con almidones de papa y de maíz, y el C es el más raro y se halla en almidones de guisante y haba (Banks y Muir, 1980).

La estructura cristalina del almidón se atribuye, en general, al componente lineal, ya que éste presenta diagramas de difracción idénticos a los obtenidos con almidones naturales. Por otro lado, variedades de almidón que no contienen amilosa muestran también una estructura cristalina que se atribuye a las ramificaciones lineales de la amilopectina (Wu y Sarko, 1978a).

Por muchos años se postuló un modelo de simple hélice de seis residuos de glucosas por giro como modelo estructural para la amilosa. Sin embargo, Kainuma y French (1971) sostienen que un modelo de doble hélice se ajusta más con los diagramas de difracción de la amilosa B. En base a estos estudios, Wu y Sarko (1978a) sostienen que la amilosa B presenta una conformación de múltiples cadenas helicoidales en doble hélice, con una orientación paralela, en la cual los sucesivos pares de cadenas están empaquetados de manera hexagonal formando una cavidad

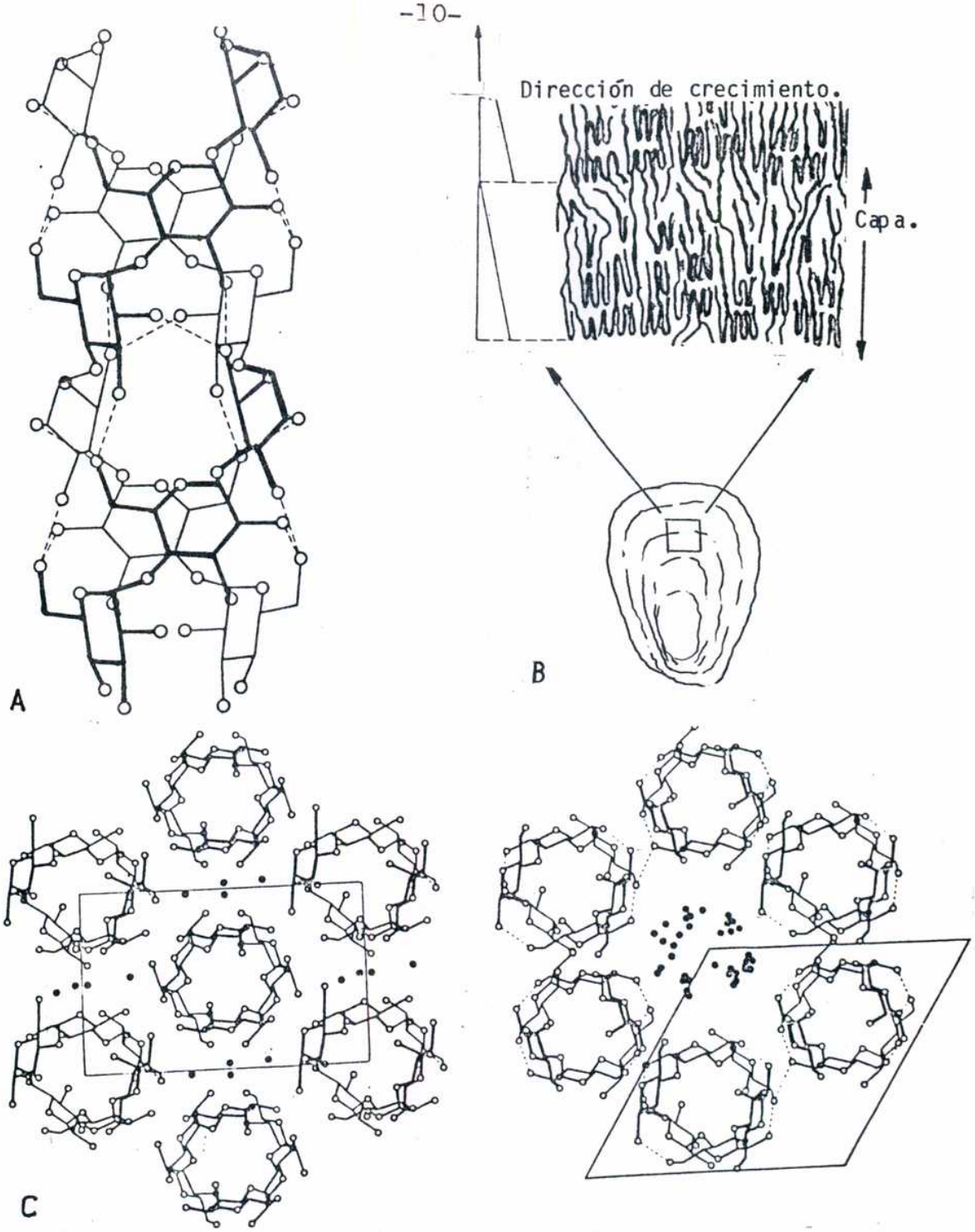


Fig. 1: Estructura de la amilosa. a) doble hélice de la amilosa A y B. Las líneas de puntos representan uniones puente de hidrógeno. b) Comparación de la estructura cristalina de amilosa A (izquierda) y amilosa B (derecha). Los puntos negros representan moléculas de agua. c) Esquema de la probable estructuración de la amilosa en capas en el gránulo de almidón (Wu y Sarko, 1978a,b; Sarko y col., 1983).

central que contiene moléculas de agua. La amilosa A posee una estructura muy similar a la de tipo B, con la diferencia de que la cavidad central contiene otra doble hélice en lugar de las moléculas de agua. En este modelo, las moléculas de agua se encuentran entre las dobles hélices (Fig. 1b).

El mecanismo por el cual el gránulo de almidón absorbe iodo y da el característico color azul podría ocurrir por la inclusión de moléculas de iodo dentro del canal central de la amilosa B, cuyo diámetro es suficientemente grande para ubicar un gran número de átomos de iodo. En la amilosa A, el espacio central es mucho menor y no sería suficiente para acomodar un número grande de moléculas de iodo que son necesarias para producir el intenso color azul observado en mezclas de iodo-almidón (Wu y Sarko, 1978b). Por otro lado, no se ha podido demostrar hasta ahora que la amilosa cristalina tanto A como B formen complejos de inclusión con el iodo. Aparentemente, en las regiones no cristalinas del gránulo de almidón, los polisacáridos en forma amorfa podrían formar complejos con el iodo que dan el característico color azul. En dichos complejos, la amilosa forma una estructura helicoidal de simple hélice (Forma V) de seis residuos por hélice, formando una cavidad central de 5 Å

donde se acomoda la cadena de poliiodo (Hanes, 1937; Rundle y French, 1943). El giro de la hélice es hacia la izquierda y su estructura está estabilizada por puentes H interglucosas (Saenger, 1984).

I.2.2.2. Orientación molecular en el grano.

El mecanismo mediante el cual el gránulo de almidón crece para formar la típica estructura particulada, todavía no se conoce completamente. Se sugirió que el crecimiento podría realizarse por agregado de moléculas de almidón a la periferia o bien a la parte interior del grano. Aunque los hechos experimentales están a favor del primer mecanismo, la pregunta que queda todavía sin contestar es dónde y cómo exactamente se produce el crecimiento del gránulo. Los estudios de microscopía electrónica y con luz polarizada muestran que los polisacáridos constituyentes del almidón se disponen radialmente, con los ejes de las moléculas orientadas perpendicularmente a la superficie del gránulo, especialmente en la zona cercana al hilum (Gallant y Guilbot, 1969; Gallant y col., 1972; Sterling, 1974). Este es el punto donde se inicia el crecimiento del grano por el agregado de finas capas perpendiculares al eje de las hélices (Fig. 1c) (Sarko y col., 1983). Estos y otros estudios sugieren que el grano de almidón se vuelve

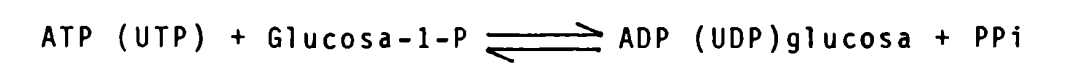
cristalino mientras se va formando en un proceso en el que la polimerización y la cristalización ocurrirían simultáneamente durante el desarrollo del gránulo.

I.3. Mecanismo de síntesis del almidón.

La síntesis de un polímero biológico como el almidón es un proceso celular de fundamental importancia. Este proceso permite distinguir las siguientes etapas: a) activación de las unidades monoméricas, b) transferencia de las unidades monoméricas a aceptores apropiados.

a) Activación de las unidades monoméricas: Ningún azúcar se incorpora directamente a una unión glicosídica. Es necesaria una "activación" previa, que requiere energía. El mecanismo universal de activación en las células parece ser la unión glicosídica entre el azúcar y un nucleósido difosfato. Estos pueden definirse como una clase de compuestos que contienen algún azúcar o derivado unido en el hidróxilo hemiacetálico con el fosfato terminal de un nucleósido difosfato en unión semiéster (Cardini, 1966). Las formas activadas de las unidades de D-glucosa que intervienen en la síntesis del almidón son uridina difosfato D-glucosa, adenosina difosfato D-glucosa y α-D-glucosa-1-fosfato. En los tejidos vegetales, la α-D-Glucosa-1-P se forma a partir de los productos de fotosíntesis a través de la reacción de fosfoglucomutasa. El éster fosfórico puede ser usado directamente para la formación del polisacárido durante el proceso de polimerización si las enzimas y los aceptores

están presentes, o puede ser convertido en los nucleósi - dos difosfato azúcar por la pirofosforilasa (Espada, 1962):



ATP (UTP) + Glucosa-1-P $\rightleftharpoons$ ADP (UDP)glucosa + PPi

Esta última enzima ha sido encontrada en una amplia variedad de tejidos vegetales: en hojas de espinaca (Ghosh y Preiss, 1966), en sorgo (Sanwal y col., 1968) y en endosperma y embrión de maíz (Dickinson y Preiss, 1969a) y su presencia está asociada con una síntesis activa de almidón en esos tejidos (Turner y Turner, 1975).

Los nucleósidos difosfato azúcar pueden sintetizarse también por la reversión de la reacción de la sacarosa sintetasa (Cardini y col., 1955; de Fekete y Cardini, 1964):

Sacarosa + ADP (UDP) $\rightleftharpoons$ Fructosa + ADP (UDP)glucosa

b) <u>Transferencia de las unidades monoméricas a aceptores apropiados</u>: La transferencia de las unidades monoméricas a aceptores apropiados requiere la unión de las formas activadas de D-glucosa y del aceptor sobre sitios diferentes de la molécula enzimática que cataliza la transferencia. La enzima reconoce al aceptor y al dador de glucosa por el resto del nucleósido que tiene fijado el azúcar. Las interacciones iónicas entre el

dador y el aceptor dan lugar a una reacción de desplazamiento en la cual el aceptor reemplaza el grupo activante y la unidad de D-glucosa se une a la molécula aceptora y, a través de múltiples desplazamientos similares, se va formando la cadena de oligosacáridos (Pazur, J.H., 1965). De esta manera el proceso general de síntesis es una transglucosilación,

$$Glc\text{-}O\text{-}R_1 + R_2OH \rightleftharpoons Glc\text{-}O\text{-}R_2 + R_1OH \qquad (i)$$

donde $Glc\text{-}O\text{-}R_1$ es el dador de glucosas y R_2OH es el aceptor.

I.3.1. Enzimas involucradas en la síntesis de almidón.

Las primeras enzimas descriptas involucradas en la síntesis del almidón son aquellas en las cuales el aceptor R_2OH de la reacción (i) es un polisacárido o un fragmento de éste. La fosforilasa (α-D-(1,4)glucan: ortofosfato glucosiltransferasa (E.C.2.4.1.1.) fue la primera enzima que se encontró relacionada con la síntesis de las uniones glucosídicas α-1,4 del almidón (Hanes, 1940). Esta enzima cataliza una reacción reversible entre la Glucosa-1-P y el almidón:

$$(\text{glucano } \alpha\text{-}1,4)_n + Glc\text{-}1\text{-}P \rightleftharpoons (\text{glucano } \alpha\text{-}1,4)_{n+1} + Pi \qquad (ii)$$

La ubicuidad de la enzima en plantas, a veces en concentraciones altas, llevó a asignarle un rol en la síntesis del almidón. Más tarde, el hecho de encontrar

una relación Pi/Glucosa-1-P alta en los medios biológicos sugirió que su papel principal sería el de intervenir en la reacción de degradación del almidón y no en su síntesis. Esto estimuló la búsqueda de otros mecanismos de síntesis del almidón.

El descubrimiento en el año 1950 de los nucleótido azúcares, el primero de los cuales fue el uridin-difosfato-glucosa (UDP-Glc) (Caputto y col., 1950) y de su rol en la síntesis del glucógeno (Leloir y Cardini, 1962) unido al hecho de que la enzima que sintetiza glucógeno está fuertemente adsorbida a éste, llevó a buscar una enzima similar en gránulos de almidón. Se encontró que granos aislados de tejidos vegetales, como tubérculos de papa, arvejas y granos de maíz, eran capaces de actuar como aceptores de glucosa a partir del UDP-Glc, alargando las cadenas de amilosa y amilopectina. De esta forma, se demostró que los granos de almidón contenían una enzima que cataliza la transferencia de glucosa a partir del UDP-Glc al almidón (de Fekete, Leloir y Cardini, 1960). Si la reacción se llevaba a cabo con UDP-(^{14}C)Glc y posteriormente se separaban amilosa y amilopectina, la radioactividad se hallaba en ambas fracciones (Leloir y col., 1961). La constante de Michaelis para el UDP-Glc calculada fue de 0,06 M, un valor relati-

vamente alto comparado con las concentraciones fisiológicas de ese nucleótido azúcar. Por ello se consideró la probabilidad que el UDP-Glc no fuera el sustrato correcto.

Se ensayó entonces, como dadores de azúcares, nucleósidos difosfato azúcares sintéticos y se halló que el ADP-Glc reaccionaba con la enzima 10 veces más rápido que el UDP-Glc. De esta forma, se descubrió que el ADP-Glc era mejor sustrato, tanto por la velocidad de la reacción como por su afinidad por la enzima (Recondo y Leloir, 1961). Esta actividad enzimática recibió el nombre de ADP-Glc: α-1,4 glucan-α-4-glucosiltransferasa (E.C.2.4.1.21.), (almidón sintetasa) y cataliza la siguiente reacción:

$$(\text{glucano}\ \alpha\text{-}1,4)_n + \text{ADP(UDP)-Glc} \rightleftharpoons \text{ADP(UDP)} + (\text{glucano}\ \alpha\text{-}1,4)_{n+1} \qquad \text{(iii)}$$

El uso de ADP-Glc como dador de glucosa permitió también demostrar la presencia al estado soluble de una enzima similar a la incluída en el grano. La misma fue hallada en una gran variedad de vegetales como: endosperma de maíz dulce (Frydman y Cardini, 1967), tubérculos de papa (Frydman y Cardini, 1966) y endosperma de arroz (Murata y col., 1965). La enzima soluble, independientemente de la fuente, presentaba como propiedad esencial

una total especificidad hacia el ADP-Glc como sustrato, ya que aparentemente no usaba el UDP-Glc (Cardini y Frydman, 1966; Ghosh y Preiss, 1965). Así, solamente la almidón sintetasa asociada al grano de almidón en tejidos de reserva, puede usar tanto ADP-Glc como UDP-Glc como dador de glucosa.

Sin embargo, Tandecarz y col. (1975) encontraron almidón sintetasas solubles en tejidos de reserva que utilizan UDP-Glc como sustrato. Otra enzima que interviene en la síntesis del almidón es la enzima Q o enzima ramificante (α-1,4 glucan: α-1,4 glucan-6-glucosiltransferasa). La enzima separa un trozo de la cadena del extremo no reductor y lo transfiere, ya sea al resto de la cadena o a otra cadena, creando una ramificación sobre el hidroxilo en posición 6 de la glucosa. El polisacárido ramificado que se va formando va alargando sus cadenas exteriores, que a su vez vuelven a ramificarse. Las ramificaciones no se colocan al azar, sino que su distribución es específica para cada tipo de amilopectina, del orden de una unión α-1,6 por cada veinte α-1,4 dando un porcentaje de ramificaciones del 4,5% para la papa. La enzima de tubérculo de papa fue estudiada en detalle por Drummond y col. (1972) y por Borovsky y col. (1975a). Se ha demostrado en endosperma de maíz dulce que no sola-

mente actúa sobre la amilosa (con un largo del orden de 100 unidades) sino también sobre las cadenas externas de la amilopectina (con un largo del orden de 13-14 unidades) para formar moléculas semejantes al fitoglucógeno (Lavintman y col., 1964; Lavintman, 1966; Manners y col., 1968).

I.3.2. Vías de síntesis del almidón.

La vía de síntesis del almidón en las plantas superiores permite diferenciar, como vimos en la sección I.3.1., entre el almidón transitorio de las hojas y el que se sintetiza en tejidos de reserva. La vía de síntesis en el primero es vía ADP-Glc, que es el único sustrato *in vivo* para las almidón sintetasas. En cambio, en los tejidos de reserva, tanto el UDP-Glc como el ADP-Glc son dadores de glucosas (Preiss y Levi, 1980). Mientras que se conocen parcialmente los mecanismos de regulación del almidón transitorio de las hojas, se desconocen los correspondientes al almidón de los tejidos de reserva (Nomura y col., 1967).

Heldt y col. (1977) sugieren la siguiente secuencia de reacciones para la síntesis del almidón fotosintético, que se llevaría a cabo en el estroma de los cloroplastos:

Fructosa-6-P $\longrightarrow$ Glc-6-P $\longrightarrow$ Glc-1-P $\longrightarrow$ ADP-Glc $\longrightarrow$ Almidón

Como se indicó en la sección I.3., el ADP-Glc se puede sintetizar a partir de glucosa-1-P en una reacción catalizada por ADP-Glc pirofosforilasa, que se desplaza en la dirección de síntesis por la hidrólisis del PPi. Preiss y Kosuge (1970) mostraron que dicha enzima puede ser activada por compuestos tales como 3-fosfoglicerato e inhibida por Pi, sugiriendo que podría cumplir un importante rol en la regulación de la síntesis del almidón transitorio.

Estudios realizados sobre la ADP-Glc pirofosforilasa en tejidos no fotosintéticos, como endosperma de maíz y embriones, muestran una menor sensibilidad de la enzima a los efectores alostéricos comparados con la enzima de los tejidos fotosintetizantes. Se postuló que en tejidos no fotosintéticos donde los procesos de síntesis y degradación son fenómenos menos dinámicos, el factor más importante que controla la síntesis del almidón sería a través de la regulación de las enzimas mismas (Ozbun y col., 1973; Somokinos, 1976; Baxter y Duffus, 1971).

En tejidos de reserva la almidón sintetasa unida al gránulo puede utilizar como sustrato tanto el UDP-Glc como el ADP-Glc. La velocidad de transferencia a partir del primero es generalmente 1/3 a 1/10 de la observada a

partir del segundo (Leloir y col., 1961; Cardini y Frydman, 1966). Además, el K_m para el ADP-Glc es de 2 a 4 mM y alrededor de 60 mM para el UDP-Glc. Por estos valores de K_m se consideró probable que la sintetasa unida al gránulo podría ser menos activa in vivo que la sintetasa soluble, que tiene un K_m para ADP-Glc de 0,1-0,3 mM (Frydman y Cardini, 1966; Lavintman y Cardini, 1968; Ozbun y col., 1971b, 1972). Es muy probable que las diferentes especificidades de la sintetasa unida al gránulo y de la soluble pueda ser debido a cambios de conformación de la misma enzima; de esta forma cuando la enzima soluble se asocia al grano, la afinidad hacia UDP-Glc aumentaría y bajaría hacia el ADP-Glc. La pérdida de capacidad para usar UDP-Glc observada luego del tratamiento del grano con urea están a favor de esta hipótesis (Frydman y Cardini, 1967). No se conoce aún si las dos formas de almidón sintetasas son diferentes formas de una misma enzima o diferentes enzimas.

El rol de la fosforilasa en el metabolismo del almidón es aún incierto (I.3.1.). Algunas observaciones sugieren que la fosforilasa podría no ser operativa en la vía biosintética y que la vía predominante sería la de la almidón sintetasa. La relación de Pi/Glucosa-1-P hallada en en algas y hojas fue de 30-300 (Bassham y Krause,

1969; Heber y Santarius, 1965); la reacción de la fosforilasa *in vitro* tiene una constante de equilibrio de 2,4 a pH 7,3 (Cohn, 1961), lo cual indica que la formación de uniones α-1,4 glucosídicas podría no ocurrir.

El hallazgo de Schneider y col. (1981), por métodos inmunológicos, de la presencia de esta enzima en las membranas de los amiloplastos de tubérculos de papa en los períodos de rápida formación de almidón y su paso al citoplasma en forma modificada durante la senescencia del tubérculo abre nuevas perspectivas respecto de un rol biosintético. Además, no se puede descartar que la enzima funcione en un sitio celular con alta concentración de Pi considerando la compartimentalización que ocurre dentro de la célula.

I.3.3. Síntesis de un aceptor glucoproteico.

La biosíntesis de polisacáridos requiere un aceptor cuya naturaleza ha sido materia de controversia por mucho tiempo y es todavía tema de discusión. Como se mostró en la Sección I.3.1., las enzimas descriptas requieren un aceptor, un polisacárido análogo α-1,4 glucano, dextrinas o los maltooligosacáridos correspondientes y este requerimiento parece ser absoluto (Cardini y Frydman, 1966; Lee, 1960a). Sin embargo, dicho mecanismo no aclaraba la naturaleza del aceptor inicial involucrado

en la síntesis de novo, ni su origen in vivo.

Feingold y col. (1958), con la callosa sintetasa, Markovitz y Dorfman (1962) con la hialuronato sintetasa, Marechal y Goldemberg (1964) con la paramilon sintetasa encontraron síntesis de los respectivos polisacáridos en ausencia de un polisacárido como aceptor. Tomos y Northcote (1978) encontraron que en Euglena gracilis, el paramilon, β-1,3 glucano, se sintetizaría sobre un aceptor proteico. Otros autores describieron la síntesis del almidón en ausencia de un aceptor α-1,4 glucano a partir de Glucosa-1-P en tubérculos de papa (Illingworth y col., 1961; Kamogawa y col., 1968; Slabnik y Frydman, 1970), en granos de cebada (Baxter y Duffus, 1973) y en semillas de arveja (Matheson y Richardson, 1976), aunque algunos de estos resultados fueron atribuídos a trazas contaminantes de aceptor en la preparación enzimática o en la Glucosa-1-P (Kamogawa y col., 1968). Tandecarz y col., 1975; 1978 y Sivak y col., 1981 describieron, en una fracción no sedimentable de tubérculos de papa, la síntesis de un α-1,4 glucano en ausencia de aceptor agregado. Esta actividad enzimática presenta un período de "lag" cuya magnitud es dependiente de la concentración de enzima y no se afecta por tratamiento con glucoamilasa. Ozbun y col. (1971a,b; 1972), y Pisigan y Del Rosario

(1976) aislaron múltiples formas de ADP-Glc: α-1,4 glucan-α-4-glucosiltransferasas. En la mayoría de los casos, las isoenzimas fueron separadas por cromatografía en DEAE-celulosa y solamente una de las formas enzimáticas era capaz de catalizar la síntesis de glucano en ausencia de aceptor exógeno en condiciones de alta concentración de sales (0,5 M de buffer citrato) y albúmina. La formación de una glucoproteína como intermediaria en la iniciación de la biosíntesis del glucógeno en hígado de rata a partir de UDP-Glc fue sugerida por Krisman (1972, 1973); Krisman y Barengo (1975); Berthillier y col. (1975); en E. coli por Barengo y col. (1978) y en Neurospora crassa por Takahara y col. (1977). También se ha postulado la intervención de glucoproteínas como intermediarios en la síntesis de celulosa (Herth y col., 1972). Kjosbakken y Colvin (1975) observaron la presencia de un complejo poliglucano-proteína en la bacteria Acetobacter xylinum, el que tendría funciones de intermediario en la síntesis de celulosa. Al incubar UDP-(^{14}C)Glc con membranas del alga Prototheca zopfii, Hopp (1977) observó la formación de un polímero β-1,4 glucano ligado a proteína.

Con respecto a la síntesis del almidón, un importante avance fue el hallazgo de la formación de una glu-

coproteína, a partir de UDP-Glc. Esta glucoproteína, que se forma por transferencia de glucosas, específicamente del UDP-Glc a una proteína aceptora endógena, y que se encuentra asociada a la estructura membranosa del proplástido, estaría involucrada en el primer paso de la síntesis de almidón en células vegetales (Lavintman y Cardini, 1972; Lavintman y Cardini, 1973; Lavintman y col., 1974).

I.4. Glicoproteínas.

Como se mostró en la sección anterior, la formación de un intermediario glucoproteico parece ser un mecanismo general para la síntesis "de novo" de α y β-glucanos. Las glicoproteínas se definen como proteínas que poseen mono u oligosacáridos unidos covalentemente. Las investigaciones desarrolladas durante las últimas dos décadas indican que las glicoproteínas se encuentran ampliamente distribuídas filogenética y anatómicamente en plantas. En la Sección I.2.1. se señaló que el grano de almidón contiene pequeñas cantidades de proteínas, y al estar unidas covalentemente al almidón, pueden ser consideradas como glicoproteínas (Sharon y Lis, 1979).

Al igual que las glicoproteínas halladas en tejidos animales, las de tejidos vegetales incluyen enzimas, lectinas y proteínas estructurales así como proteínas sin actividad biológica conocida. Aunque las glicoproteínas contienen unos pocos monosacáridos diferentes (Tabla 2), varían marcadamente en el contenido de carbohidratos, en el número y grado de ramificación de éstos y en su distribución a lo largo de la cadena polipeptídica.

Estudios recientes muestran que los carbohidratos pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de las glicoproteínas como solubilidad, carga, masa, estabiliza-

TABLA 2: Monosacáridos constituyentes de glicoproteínas.
(Sharon y Lis, 1979)

	Animales	Vegetales
Hexosas.		
Galactosa	+	+
Glucosa	+	+
Manosa	+	+
Deoxihexosas.		
L-fucosa	+	+
Hexosaminas.		
N-acetilgalactosamina	+	(+)
N-acetilglucosamina	+	+
Pentosas.		
L-arabinosa	?	+
Xilosa	+	+
Acido siálico.		
Acidos urónicos.		
Acido glucurónico	+	
Acido L-idurónico	+	

ción de determinadas conformaciones, protección contra proteólisis, así como participar también en interacciones entre las subunidades de proteínas (Sharon, 1984).

I.4.1. Estructura de las glicoproteínas.

La característica estructural más importante de las glicoproteínas es el enlace covalente entre la porción glicosídica y la proteína. El mismo involucra el C_1 del azúcar más interno del oligosacárido y el grupo funcional del aminoácido al que se encuentra unido. La mayoría de las glicoproteínas presentan unos pocos tipos diferentes de uniones glicopeptídicas. Las uniones más frecuentes son las N-glicosídicas y las O-glicosídicas (Fig. 2). La demostración y caracterización de las diferentes uniones depende de sus propiedades químicas y, en particular, de su estabilidad al ácido y al álcali (Tabla 3).

TABLA 3: Uniones glicopeptídicas en orden creciente de labilidad al álcali.

Resistente:

Gal-Hyl Gal-Hyp Ara Hyp

Labilidad al álcali fuerte caliente (N-glicosídicas):

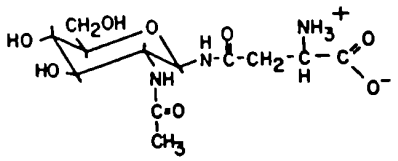
NAcGlc-Asn

Labilidad al álcali diluído frío (O-glicosídicas, unión al carbono β de hidroxiaminoácidos:

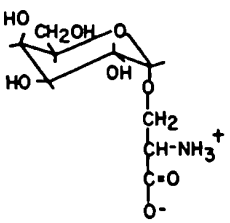
Xil-Ser Gal-Ser (o Treo) NAcGal-Ser (o Treo)

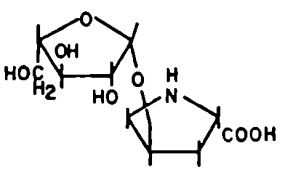
Las uniones estables al álcali se reconocen fácilmente luego del tratamiento alcalino. Por el contrario, la unión lábil al álcali requiere el aislamiento de un glicopéptido pequeño para la identificación inequívoca, aunque las propiedades químicas de algunas uniones son suficientes para su identificación (Lamport, 1980).

N-glicosídica:



O-glicosídica:





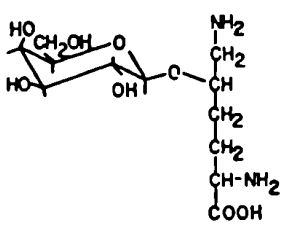


Fig. 2: Uniones glicopeptídicas más comunes (Lamport, 1980).

1.4.2. Unión N-glicosídica.

El único ejemplo de este tipo de unión es el que se establece entre el C_1 de la N-acetilglucosamina y el grupo amino ubicado en el carbono γ de la asparagina, como se ilustra en la Fig. 2. Esta unión es relativamente estable a hidrólisis ácida suave (HCl 2 N, 100°C) y es estable a la hidrólisis alcalina suave, pero se hidroliza rápidamente en condiciones enérgicas (1 M $NaOH/NaBH_4$, 100°C) convirtiendo al azúcar en N-acetil-glucosaminitol (Lee y Scocca, 1972).

La cadena de oligosacárido unida a la proteína posee una secuencia de azúcares común consistente en un "core" o región proximal al enlace glicopeptídico constituido por un pentasacárido ramificado ($Man_3NAcGlc_2$) (Montreuil, 1975). Los residuos de manosa periféricos están siempre sustituídos por residuos de manosa adicionales en la forma de oligosacáridos cortos o largos que están usualmente ramificados por dos a cuatro unidades del disacárido de ß-1,4 galactosil-N-acetilglucosamina (conocido como N-acetil lactosamina) en el cual, a menudo, se une un residuo de ácido siálico.

Hay así diferentes tipos de oligosacáridos, los denominados A) alta manosa, B) alta acetil glucosamina,

C) tipo complejo, y D) otros (Staneloni y Leloir, 1982). Los primeros tienen un número variable de manosas unidas al disacárido de NAcGlc; los segundos, además de un alto número de manosas, contienen más de dos residuos de NAcGlc. La característica fundamental del oligosacárido de tipo complejo es la secuencia de ácido siálico-galactosa-NAcGlc unido al "core" central.

I.4.3. Unión O-glicosídica.

La unión O-glicosídica se establece entre el C_1 del azúcar y el grupo hidroxilo de hidroxiaminoácidos. Las uniones O-glicosídicas se clasifican en base a su labilidad al álcali (Tabla 4) que indica si el azúcar sustituyente se halla o no en posición β a un grupo carbonilo activado. De las once diferentes uniones glicopeptídicas que involucran la β-glicosilación de hidroxiaminoácidos (Tabla 4), en un sentido estricto, solamente se han encontrado dos en plantas. Estas son: Gal-Ser en extensina (Lamport y col., 1973) y Xil-Treo (Green y Northcote, 1978).

Kuhn y Löw (1941) e Isbell (1943) describieron por primera vez una reacción de β-eliminación que explica la liberación de azúcares y la formación de ácidos no saturados cuando se somete glicoproteínas que tienen azúcares unidos en posición β a un grupo carboxilo, a

TABLA 4: Uniones glicosídicas (Lamport, 1980).

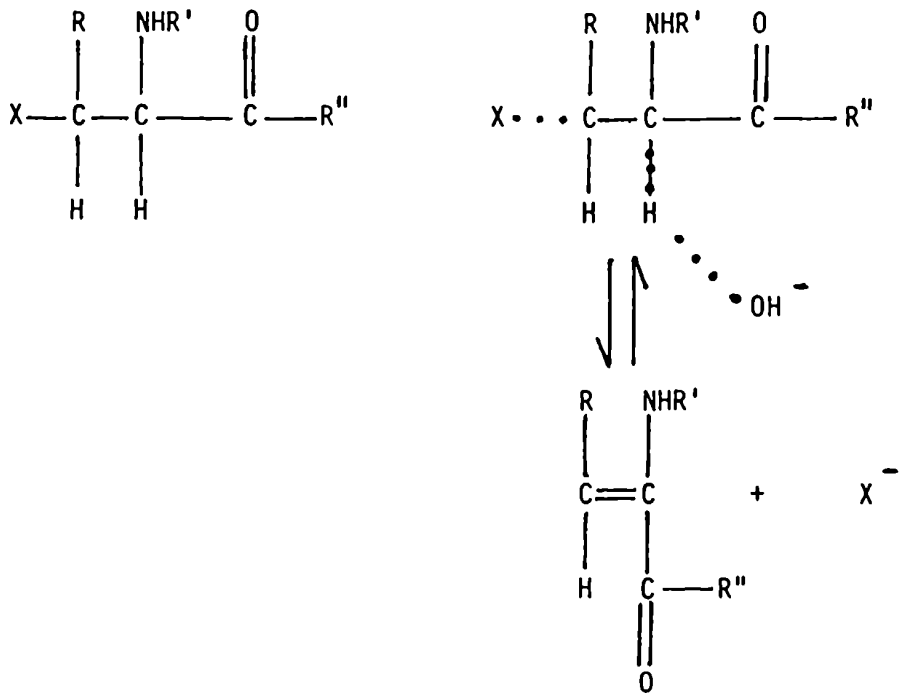
Unión		Eucariotas			
	Procariota	Protista	Hongos	Plantas	Animales
N-glicosídica:					
β-D-NAcGlc-Asn	+	+	+	+	+
O-glicosídica:					
A. Lábil al álcali.					
β-D-xilosa-SER		+			+
α-D-galactosa-SER				+	+
Manosa-SER			+		
α-D-NAcGal-SER					+
xilosa-TREO		+		+	
galactosa-TREO	+				+
manosa-TREO			+		
fucosa-TREO					+
α-D-NAcGal-TREO					+
β-OH-PHE			+		
β-OH-TYR			+		
B. Estable al álcali.					
β-D-galactosa-HYL					+
galactosa-HYP		+		+	
β-L-arabinosa-HYP		+		+	
glucosa-HYP				?+	
Otras:					
Aminas N-terminal (Gly-glucurónico)			+		

tratamiento alcalino suave (Fig. 3). Durante esta reacción los hidroxiaminoácidos β-sustituídos se convierten en sus correspondientes derivados α-β no saturados, por ejemplo, serina y treonina en ácido 2-aminoacrílico (dehidroalanina) y 2-aminocrotónico, respectivamente.

La reacción de β-eliminación en presencia de borohidruro de sodio como agente reductor protege al azúcar de la oxidación alcalina, convirtiendo al monosacárido unido a la proteína en su correspondiente azúcar-alcohol. La función alcohol estabiliza el azúcar, ya que las condiciones de alta alcalinidad favorecen la formación de derivados carboxílicos conocidos como ácidos sacarínicos y productos más pequeños como gliceraldehido (Sharon, 1975).

Por otro lado, la reacción en presencia de borohidruro de Na convierte los aminoácidos no saturados, por ejemplo, los derivados de serina y treonina en DL-alanina y ácido DL-2-amino butírico, respectivamente, que son más estables.

Los factores que influyen en la reacción de β-eliminación son la temperatura a la cual se desarrolla la reacción, la naturaleza de la base usada, la concentración de borohidruro, la posición del amino ácido sustituído en la cadena polipeptídica y el entorno de



X = azúcar.

R = H para L-serina.

R = CH_3 para L-treonina.

R' y R" = otros aminoácidos de la cadena polipeptídica.

Fig. 3: Reacción de β-eliminación.

aminoácidos de éste (Neuberger y col., 1972). Se encontró que la reacción ocurre en pequeño grado cuando el hidroxiaminoácido ocupa la posición terminal en el polipéptido; el mismo resultado se halló en el caso de existir un campo electrostático con carga negativa circundante al aminoácido sustituído (Lamport, 1980).

I.4.4. Biosíntesis de glicoproteínas.

El estudio de glicosilación de proteínas comenzó un corto tiempo después del descubrimiento del rol de los nucleótido-azúcares como dadores de monosacáridos. La transferencia de azúcar a residuos de serina, treonina e hidroxilisina en polipéptidos se obtuvo *in vitro*, pero la glicosilación de asparagina no se pudo lograr tan fácilmente. El descubrimiento de Behrens y Leloir (1970), en tejidos animales, de que los oligosacáridos se sintetizan unidos a lípidos identificados como dolicol fosfato, (poliprenoles fosforilados entre 17 y 21 unidades de isopreno), dieron la pauta de que esos compuestos sirven como intermediarios en la biosíntesis de glicoproteínas. Sobre estos lípido-azúcares se sintetiza un oligosacárido ($Glc_3Man_9NAcGlc_2$) que luego es transferido a un residuo asparagina de la proteína en un evento cotraduccional (Sharon y Lis, 1981). De esta manera, la glicosilación de residuos asparagina de las proteínas,

además de la transferencia directa de los residuos de azúcares de los nucleótidos, se realiza a través de dolicol fosfato como intermediario. Por otro lado, los oligosacáridos unidos a hidroxiaminoácidos a través de la unión O-glicosídica parecen ensamblarse de una manera más simple que los N-glicosídicos. Estudios realizados sobre glicoproteínas del tipo O-glicosídicas en tejidos animales mostraron que su conformación espacial juega un rol importante en la accesibilidad de los residuos de hidroxiaminoácidos a la acción de las transferasas (Aubert y col., 1976). Además, la O-glicosilación es generalmente un evento tardío en la modificación post traduccional y ocurre luego de que las proteínas han adquirido una estructura altamente ordenada (Hanover y Lennarz, 1981). De esta manera, la accesibilidad de residuos de hidroxiaminoácidos específicos a la acción de la transferasa, así como también un alto orden estructural, serían los determinantes de la localización específica de los oligosacáridos del tipo O-glicosídico sobre la cadena polipeptídica más que la presencia de una secuencia de aminoácidos característicos, Asn-X-Ser/Treo, como en el tipo N-glicosídico (Mellis y Baenziger, 1983). La regulación de la síntesis de oligosacáridos de glicoproteínas, aunque todavía se desconoce, debe involucrar la disponi-

bilidad de aceptores apropiados, transferasas y nucleótido azúcares en los sitios celulares donde se sintetizan (Schachter, 1981).

I.5. Antecedentes recientes sobre la síntesis "de novo" del almidón y objetivos de esta investigación.

Tandecarz y Cardini (1978) indican que la síntesis de un α-1,4 glucano unido a proteína en los proplástidos de tubérculo de papa podría ocurrir a través de una secuencia de por lo menos dos reacciones:

Reacción 1:

$$\text{UDP-Glc} + \text{proteína aceptora} \longrightarrow \text{proteína aceptora-Glc} + \text{UDP}$$

Reacción 2:

$$\text{Proteína aceptora-Glc} + \text{UDP-Glc (ADP-Glc ó Glc-1-P)} \longrightarrow \text{proteína aceptora-Glc-(Glc)}_n + \text{UDP(ADP ó Pi)}$$

La enzima que cataliza la Reacción 1, denominada UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (Lavintman y col., 1974) es específica para UDP-Glc con un K_m de 4×10^{-6} M para el nucleótido azúcar. Transfiere un solo residuo de glucosa del UDP-Glc al aminoácido de la proteína aceptora endógena, probablemente a través de una unión O-glicosídica. En la Reacción 2, la proteína glucosilada serviría de aceptor para diferentes transferasas contenidas en la

fracción enzimática, que catalizarían las uniones glucosídicas α-1,4 cuando en las mezclas de reacción están presentes UDP-Glc, ADP-Glc o Glc-1-P en concentraciones milimolares (Tandecarz y Cardini, 1978).

Para establecer que las cadenas glucosídicas que se sintetizan durante la segunda reacción provienen del agregado secuencial de residuos de glucosa a la glucoproteína formada durante la Reacción 1, Tandecarz y Cardini (1978) llevaron a cabo un experimento de doble marcación en el que se usó UDP-(^{3}H)Glc 4 μM durante la primera etapa y los diferentes dadores de glucosa marcados con (^{14}C) para la segunda etapa. Posteriormente, se caracterizaron los productos obtenidos después de cada etapa mediante degradación de Smith. La Fig. 4 muestra la aparición de un solo compuesto radioactivo después de la primera etapa, con la movilidad del glicerol, mientras que para el producto de la Reacción 2 se encontró (^{14}C)eritritol y (^{14}C)glicerol y (^{3}H)eritritol y (^{3}H)glicerol. Estos resultados indicaron que: a) la glucosa tritiada está unida directamente a la proteína aceptora; b) algunos residuos terminales de glucosa tritiada fueron usados durante la Reacción 2; c) la presencia de (^{14}C)eritritol implica la existencia de uniones glucosídicas α-1,4 ; y d) la presencia de (^{14}C)glicerol

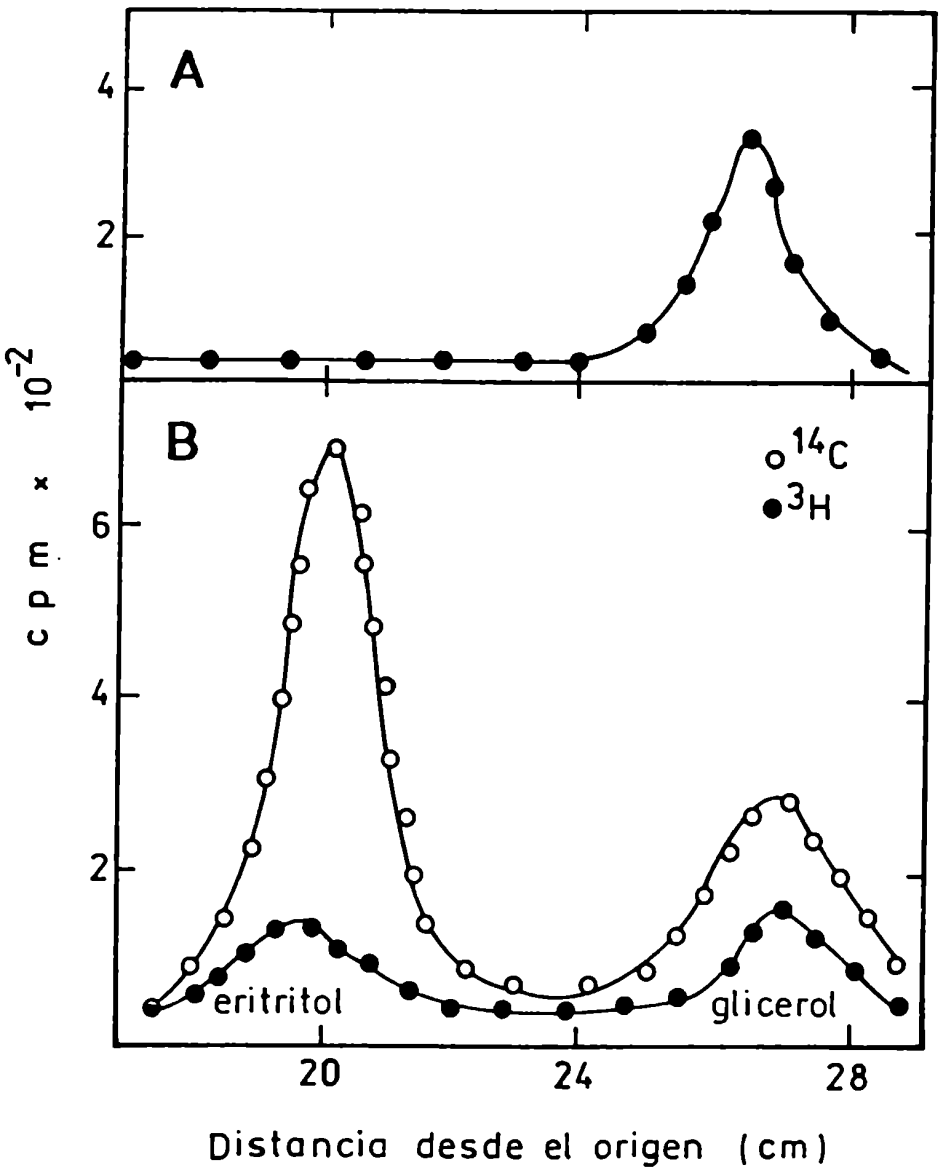


Fig. 4: Distribución de radioactividad luego de la cromatografía en papel de los productos obtenidos por degradación de Smith de las glucoproteínas marcadas. A) Glucoproteína tritiada obtenida luego de incubar la fracción de membranas de tubérculo de papa con UDP-(^{14}C)Glc 6 μM. B) Glucoproteína doblemente marcada, sintetizada luego de incubar en la fracción de membranas con UDP-(^{14}C)Glc 6 μM en una primera etapa y UDP-(^{14}C)Glc 4 mM en la segunda etapa de la incubación (Tandecarz y Cardini, 1979).

indica nuevos extremos no reductores de las cadenas glucosídicas formadas durante la Reacción 2.

Los resultados basados en el comportamiento diferencial de la Reacción 1 y de la Reacción 2 frente a la 1,5-D-gluconolactona (inhibidor de fosforilasa y de glucógeno sintetasa de hígado de rata y de E. coli), confirmaron la existencia del mecanismo de transferencia de glucosas en dos etapas (Tandecarz y Cardini, 1979). En la Tabla 5 se observa que la incorporación de radioactividad al material precipitable por TCA a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 μM (Reacción 1), no se afecta por la lactona. En cambio, la elongación de la glucoproteína con UDP-(^{14}C)Glc 4 mM es fuertemente inhibida por 8 mM 1,5-D-gluconolactona, una concentración similar a la que inhibe la elongación de cadenas glucosídicas α-1,4 mediada por almidón sintetasa o fosforilasa en presencia de un polisacárido exógeno como aceptor.

TABLA 5: Efecto de 1,5-D-gluconolactona sobre las enzimas asociadas a membranas de tubérculo de papa que sintetizan un glucano unido a proteína en ausencia de aceptor exógeno.

Dador de (^{14}C) glucosa	Tiempo de incubación (min)	Incorporación de Glc en la proteína (nmol)	
		- 1,5-D-gluconolactona	+ 1,5-D-gluconolactona
UDP-(^{14}C)Glc (6 μM)	45	0,024	0,025
UDP-(^{14}C)Glc (4 mM)	45	68	0,320
UDP-(^{14}C)Glc (4 mM)	120	97	0,430

Estos resultados refuerzan la hipótesis de un mecanismo común para la elongación de las cadenas de glucanos precursoras del almidón, independientemente del origen del aceptor, polisacárido exógeno o glucoproteína endógena (producto de la Reacción 1). En cambio, la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I no debe ser incluída en esta categoría, ya que opera en una forma diferente: a) transfiere solamente el primer residuo de glucosa; b) no es inhibida por 1,5-D-gluconolactona.

En base a estos resultados y para tratar de esclarecer el mecanismo de síntesis del almidón en ausen-

cia de aceptor exógeno (síntesis de novo), se emprendió el estudio de las glucosiltransferasas que catalizan la síntesis del glucano unido a proteína en tubérculo de papa. El hecho de tener este sistema enzimático asociado a membranas complicaba el estudio en detalle de las diferentes enzimas y aceptores involucrados. Se trató de liberar las actividades enzimáticas con el objeto de: a) caracterizar las glucosiltransferasas que catalizan las diferentes etapas de síntesis; b) determinar la especificidad de aceptor; c) confirmar la formación de una glucoproteína intermediaria en la síntesis de novo del almidón, d) identificar el tipo de unión glicopeptídica, e) determinar si alguna de las enzimas que alargan cadenas de glucanos exógenos pueden también utilizar como aceptor el producto de la Reacción 1.

II. MATERIALES Y METODOS.

II.1. Compuestos químicos y enzimas auxiliares.

II.1.1. Compuestos radioactivos.

En el Instituto de Investigaciones Bioquímicas se obtuvieron los siguientes compuestos, preparados por las Licenciadas S. Raffo y M. Eirin, según el método de Wright y Robbins (1965) con ligeras modificaciones:

UDP-(^{14}C)Glc	196 y 284,5 Ci/mol
ADP-(^{14}C)Glc	262 Ci/mol

De fuente comercial se utilizó:

(^{14}C)Glucosa-1-P	156 Ci/mol (New England Nuclear)
B(^{3}H)$_4$Na	884 Ci/mol (New England Nuclear)

II.1.2. Enzimas auxiliares.

Las enzimas β-amilasa de batata (type I-B suspensión en $SO_4(NH_4)_2$ 2,5 M; α-amilasa bacteriana (Type II-A cristalizada); proteasa de *S. griseus* (Type VI, 5 U/mg); proteasa de *B. amyloliquefaciens* cristalizada, 12,2 U/mg; catalasa de hígado bovino; lactato deshidrogenasa de músculo de conejo y fosfatasa alcalina (*E. coli*, Type III-S, 11 U/mg, suspensión en $SO_4(NH_4)_2$ 2,5 M) fueron obtenidas de Sigma.

II.1.3. Drogas y reactivos químicos.

Concanavalina A-Sepharosa 4B y α-D-glucosa-1-P (sal dipotásica, grado I) fueron obtenidas de Sigma; Sephadex G-15 y Sephacryl S-300, de Pharmacia y acrilamida y bisacrilamida, de Bio Rad.

Las drogas y reactivos empleados, del mayor grado de pureza disponibles, fueron obtenidos de fuente comercial.

II.2. Preparaciones enzimáticas.

II.2.1. Preparación particulada.

Se usó como fuente de enzima tubérculos de papa obtenidos en el mercado. Se siguió el método descripto por Lavintman y col (1974). Se pelaron 500 gramos de tubérculos y se rallaron en rallador de vidrio en presencia de 2-mercaptoetanol 5 mM. Todas las operaciones fueron realizadas entre 0 y 4°C. El homogenato se filtró a través de dos capas de muselina y se eliminó el almidón por centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada Sorvall RC 2B con un rotor SS-34. El sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 25.000 x g durante 20 minutos. Se descartó el precipitado que contenía restos celulares y el sobrenadante fue centrifugado a 140.000 x g (ultracentrífuga Beckman L8 80, rotor 50 Ti) durante 2 horas. El precipitado obtenido

se resuspendió en buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,4, conteniendo 2-mercaptoetanol 5 mM. Esta fracción de membranas, denominada preparación particulada o P_{140} está constituída principalmente por proplástidos libres de almidón (Lavintman y Cardini, 1972).

II.2.2. Solubilización de la preparación particulada.

Se ensayaron diversos detergentes, por ejemplo Nonidet P-40 y Tritón X-100, para solubilizar la fracción de membranas, pero el uso de los mismos fue descartado debido a que presentaban el inconveniente de solubilizar glucosiltransferasas que tenían lípidos como aceptores. Se encontró que el aumento de la fuerza iónica del medio liberaba las actividades enzimáticas de las membranas; en consecuencia fue éste el método que se adoptó para la solubililización de la preparación particulada.

La preparación particulada resuspendida en buffer Tris-ClH 100 mM pH 7,4, conteniendo 2-mercaptoetanol 5 mM (buffer A) y mantenida durante 48 à 72 horas a 0°C, se sometió a ultracentrifugación a 140.000 x g durante 2 horas. El sobrenadante obtenido fue utilizado como fuente de enzimas solubilizadas (preparación solubilizada).

II.2.3. Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción solubilizada.

Se empleó DEAE-celulosa marca Serva o Whatman D 52, capacidad entre 0,5 y 0,7 m Eq/mg, tratada con ClH e HONa, según Peterson y Sorber (1962). Se sembró una alícuota de la fracción solubilizada que contenía entre 20 y 60 mg de proteínas en una columna de 1,8 x 15 cm equilibrada con buffer A. Se lavó la columna con 60 ml del mismo buffer y se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,5 M ClK (300 ml de volumen total). Se recogieron fracciones de 3 ml a una velocidad de 30 a 40 ml/h. Se reunieron las fracciones con actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (Pico I), las fracciones con actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno y de almidón sintetasa (Pico IIa) y las fracciones con actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno y de almidón sintetasa (Pico IIb). Cada una de estas fracciones fue concentrada por ultrafiltración a través de membranas UM-10 (Amicon Co.) a 4°C.

II.3. Medición de las actividades enzimáticas.

II.3.1. Medición de actividades de UDP(ADP)-Glc:almidón sintetasa y fosforilasa (dependientes de aceptor exógeno).

Para la medición de las actividades dependientes

de aceptor exógeno, la mezcla de reacción contiene: 400 μg de glucógeno de ostra (Sigma) ó 1 mg de amilopectina de papa (cedido gentilmente por el Dr. C.E. Cardini), enzima (60-300 μg de proteínas) y ADP-(^{14}C)Glc 0,18 nmol (87.000 cpm) ó UDP-(^{14}C)Glc 0,24 nmol (80.000 cpm) como sustrato dador para almidón sintetasa y (^{14}C)glucosa-1-P 0,23 nmol (45.000 cpm) para fosforilasa, en un volumen de incubación de 50 μl. Al término del período de incubación, que se realizó a 30°C durante los tiempos indicados en cada caso, se detuvo la reacción por el agregado de 1 ml de TCA 10%.

Se centrifugó y se midió la radioactividad en el precipitado como se describe en II.3.3. Al sobrenadante ácido se le agregan 2 ml de metanol 70% - ClK 1%, previo agregado de 1 mg de glucógeno para facilitar la precipitación. Se centrifugó, se resuspendió el precipitado en agua y se volvió a precipitar nuevamente. Este procedimiento se repitió tres veces más. Se determinó así la radioactividad incorporada a material insoluble en metanol, soluble en TCA, según la Sección II.9.3.

En los casos en los cuales se sabe que no hay material radioactivo precipitable por TCA, se detuvo la reacción por el agregado de 1 ml de metanol 70% -ClK 1%. Se colectó el precipitado por centrifugación, se redi-

solvió el mismo en 0.05 ml de agua y se reprecipitó nuevamente. Este procedimiento se repitió tres veces más. Se midió la radioactividad como se describe en la Sección II.9.3.

II.3.2. Medición de la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno.

Para la medición de la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno, se utilizó una mezcla de incubación que contenía buffer Mes, 100 mM, pH 5,7; 250 μg de albúmina bovina y (^{14}C)Glucosa-1-P 20 mM (40.000 cpm) en un volumen final de 0,05 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante los tiempos indicados en cada caso. Luego de la incubación, la reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA 10% frío y se midió la incorporación de (^{14}C)glucosa al material insoluble en TCA. Se filtró por membranas de nitrocelulosa y se contó la radioactividad como en II.3.3.

II.3.3. Medición de la actividad de la enzima que cataliza la Reacción 1 (UDP-Glc: proteína transglucosilasa I).

La mezcla de incubación, salvo agregados específicos, contenía: Cl_2Mn 6 mM; UDP-(^{14}C)Glc 4 μM 0,175 nmol (75.000 cpm) y enzima (50 a 300 μg de proteínas) en un volumen final de 0,05 ml. En reiteradas oportunidades,

con fines preparativos, se utilizó la mezcla en una escala mayor en cuyo caso se indica en las leyendas respectivas. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 minutos a 30°C. Se detuvo la reacción por el agregado de 1 ml de TCA 10% frío. Se filtró por membranas de nitrocelulosa (Millipore, H.A.). Se lavaron los filtros con 15 ml de TCA, se secaron y se determinó la radioactividad según se describe en la Sección II.9.3.

II.3.4. Medición de las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de un α-glucano unido a proteína (Reacción 1 + Reacción 2).

Ensayo a (en una sola etapa). La mezcla de incubación de la reacción completa (Reacción 1 + Reacción 2) contenía: enzima (50-300 μg de proteína), Cl_2Mn 10 mM, UDP-(^{14}C)Glc 4 μM (75.000 cpm) + UDP-Glc 4 mM ó ADP-Glc 4 mM ó Glucosa-1-P 4 mM. Se incubó por los tiempos indicados en cada caso; se detuvo la reacción por el agregado de 1 ml de TCA y se trató como en II.3.3.

Ensayo b (en dos etapas). En la primera etapa se incubaron los componentes de la Reacción 1 a 30°C durante 30 minutos (II.3.3.). Al término de este período se agregó UDP-Glc 4 mM, ó ADP-Glc 4 mM ó Glucosa-1-P 4 mM y se prosiguió la incubación por los tiempos indicados en cada caso. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml

de TCA 10% y se procedió como en II.3.3. Este ensayo permite, además, determinar la Reacción 2 (que usa como aceptor glucosilado el producto de la Reacción 1) restando de la incorporación de radioactividad total la incorporación obtenida en la primera etapa.

II.3.5. Reconstitución del sistema de síntesis de un α-glucano unido a proteína.

La reconstitución del sistema original de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína se llevó a cabo con enzimas parcialmente purificadas por DEAE-celulosa mediante un experimento en dos etapas. La mezcla de incubación de la primera etapa contenía: Cl_2Mn 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 4 μM y el Pico I (5-20 μg de proteínas). Se incubó durante 30 minutos a 30°C y al término de este período se agregó, a la mezcla de incubación (2da. etapa), el Pico IIa o el Pico IIb (10-50 μg de proteínas) y los dadores de glucosa correspondientes, que se indican en cada caso. Se continuó la incubación por los tiempos indicados (1 a 4 horas) y se detuvo la reacción como en II.3.3.

II.4. Tratamientos enzimáticos.

II.4.1. Obtención de productos radioactivos glucosilados.

Para obtener los productos radioactivos de la Reacción 1 y de la reacción completa (Reacción 1 + Reacción 2), se incubaron las preparaciones enzimáticas que catalizan estas reacciones con los dadores de glucosa correspondientes en cada caso (ver II.3.3. y II.3.4.). Al término de las incubaciones, se detuvieron las reacciones con 1 ml de TCA 10%. Los precipitados respectivos se lavaron varias veces con TCA, se resuspendieron en agua y se eliminó el resto de ácido con eter etílico.

II.4.2. β-amilasa.

El producto respectivo, obtenido como se describe en II.4.1., se resuspendió en buffer acetato 10 mM pH 5,0 y se agregó 0,5 mg de β-amilasa en un volumen final de 0,2 ml. Se incubó por períodos de 24-48 horas a 37°C, bajo vapores de tolueno. En un ensayo control se incubó el producto en condiciones similares, pero en ausencia de enzima amilolítica. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de metanol 70% - ClK 1% previo agregado de 1 mg de albúmina bovina para favorecer la precipitación de proteínas. Se lavó el precipitado y se determinó la radioactividad insoluble remanente. El sobrenadante metanólico se deionizó por filtración en columnas de Amberlite MB3

(forma acetato) y se sometió a cromatografía en papel para identificar los productos de hidrólisis.

II.4.3. α-amilasa.

El producto respectivo obtenido como se describe en II.4.1. se resuspendió en buffer acetato 50 mM pH 5,0, ClNa 10 mM y se agregó α-amilasa cristalizada. Se incubó durante 24 horas a 37°C, bajo vapores de tolueno, y se siguió el mismo procedimiento que en II.4.2.

II.4.4. Proteasa.

El producto respectivo, obtenido como en II.4.1., se resuspendió en una mezcla que contenía: buffer Tris ClH 100 mM pH 8; ClK 100 mM; Cl_2Ca 10 mM y 2 mg de proteasa de *S. griseus* en un volumen final de 0,3 ml y se incubó a temperatura ambiente bajo vapores de tolueno. A las 24 horas se agregó nuevamente proteasa y se controló el pH. Se continuó la incubación a temperatura ambiente por 48 horas más. Como control se incubó un producto en las mismas condiciones, pero en ausencia de proteasa.

Se detuvo la reacción por el agregado de 1 ml de TCA 10%. Se determinó la radioactividad insoluble remanente, y el sobrenadante se sometió a cromatografía en columna de Sephadex G-15, seguida de electroforesis en papel en ácido fórmico 5% para identificar los productos de proteólisis.

II.5. Determinación de la unión O-glicosídica.

II.5.1. Tratamiento con BH_4Na en medio alcalino.

El tratamiento de β-eliminación se realizó sobre el producto radioactivo de la Reacción 1 obtenido como se describió en II.4.1., en las siguientes condiciones: HONa 0,2 N y 0,3 mg de BH_4Na durante 5 horas a 50°C. Al cabo del tiempo indicado se neutralizó con ácido acético glacial. Se agregó 1 ml de metanol 70%-ClK 1%, se lavó el precipitado y se determinó la radioactividad insoluble remanente. El sobrenadante metanólico se deionizó por resina Dowex 50 WX 8. Se secó el material bajo lámpara y se agregó metanol. Este procedimiento se repitió varias veces para remover el exceso de borato como metiléster derivado y se sometió a electroforesis en buffer 3 (sección II.7.2.).

II.5.2. Tratamiento con $B(^3H)_4Na$ en medio alcalino.

El tratamiento con $B(^3H)_4Na$ en medio alcalino se realizó sobre los (^{14}C)glicopéptidos obtenidos por proteólisis del producto radioactivo de la Reacción 1, como se describe en II.4.4.), en las siguientes condiciones: HONa 0,5 N durante 5 horas a 50°C en un medio conteniendo $B(^3H)_4Na$ 7 mM (884 mCi/mmol) y Cl_2Pd 3 mM (Tanaka y Pigman, 1965). Finalizado el tratamiento se llevó la mezcla de reacción a pH 5 con ácido acético para descom-

poner el exceso de borohidruro de sodio. Se secó el material, se agregó metanol y se evaporó el mismo en evaporador rotatorio. Este procedimiento se repitió varias veces para eliminar el exceso de borato como metiléster derivado. También se realizaron lavados acuosos para eliminar el tritio (Aminoff, D. y col., 1980).

Luego de neutralizar la solución, se deionizó en columnas de Dowex 50 WX 8 (forma H^+) 20-50 mesh. Se sometió a electroforesis en papel en ácido fórmico 5% a 1.200 V durante 3 horas con standards externos de alanina y α-aminobutírico.

Los picos de radioactividad de los radiocromatogramas fueron eluídos del papel y la identidad de alanina y α-aminobutírico fue confirmada por cromatografía en capa delgada, como se describe en II.6.3.

II.6. Métodos cromatográficos.

II.6.1. Cromatografía de filtración molecular.

Se usó filtración en gel de Sephacryl S-300. El volumen de exclusión de la columna se determinó con azul dextrano y el de inclusión con cloruro de cobalto. La filtración en Sephacryl S-300 se realizó en una columna de 1,1 x 116 cm, equilibrada con buffer A. Se sembró el Pico I (0,5-0,8 mg de proteínas) y se eluyó con el mismo buffer, a una velocidad de 8 ml/h. La temperatura se man-

tuvo a 4°C y las fracciones fueron de 1,5 ml. Para la calibración de la columna se utilizaron como proteínas marcadoras (cromatografiadas en forma individual en la misma columna): β-galactosidasa de *Escherichia coli* (radio de Stokes (a) = 6,84 nm), catalasa de hígado bovino (a = 5,22 nm), fosfatasa alcalina (a = 4,6 nm), citocromo c (a = 1,87 nm).

II.6.1.1. Determinación del radio de Stokes.

El valor del radio de Stokes (a) fue obtenido a partir del perfil de filtración en gel en Sephacryl S-300. El valor fue estimado de un gráfico de $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$ en función del radio de Stokes obtenido con las proteínas marcadoras de parámetros moleculares conocidos.

V_e = volumen de elución de la proteína.

V_o = volumen de exclusión de la columna.

V_t = volumen total de la resina.

II.6.1.2. Determinación del peso molecular.

El peso molecular de las proteínas fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación (Siegel y Monty, 1966):

$$PM = \frac{6\pi . N . \eta_{20,W}}{1 - \bar{v}\rho_{20,W}} a . s_{20,W}$$

siendo N el número de Avogadro; $\eta_{20,W}$, viscosidad del

agua a 20°C ($1,1 \times 10^{-2}$ g/cm.seg); a, radio de Stokes; $s_{20,W}$, coeficiente de sedimentación a 20°C en agua; $\bar{v}$, volumen específico parcial (se consideró $\bar{v}$ = 0,74 cm^3/g); $\rho_{20,W}$, densidad del agua a 20°C (0,9888 cm^3/seg).

II.6.1.3. Coeficiente friccional.

El coeficiente friccional fue calculado utilizando los parámetros moleculares previamente obtenidos (a, PM) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$f/f_0 = a\left(\frac{4\pi . N}{3\ PM}\right)^{1/3}$$

siendo f el coeficiente de fricción de la proteína y f_0, el coeficiente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

II.6.2. Cromatografía de afinidad en columna de Concanavalina A Sepharosa.

Se utilizó Concanavalina A inmovilizada en Sepharosa 4B en columnas de 0,6 x 10 cm. Las mismas se equilibraron con buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,4, β-mercaptoetanol 5 mM; ClNa 100 mM; Cl_2Mn 1mM, Cl_2Ca 1 mM y Cl_2Mg 1 mM (buffer B). Se sembró la muestra (1-2 mg de proteínas) en el buffer B, se lavó con 10 ml del mismo buffer y se eluyó con 10 ml de α-metilglucósido (Sigma) 0,3 M en buffer B. Se recogieron fracciones de 1 ml.

II.6.3. Cromatografía en papel.

Las cromatografías fueron realizadas en forma descendente, utilizando papel Whatman N°1. Los solventes empleados fueron:

A: butanol-piridina-agua (6:4:3 v/v)

B: butanol-piridina-agua (4:3:4 v/v)

II.6.4. Cromatografía en capa delgada.

Se utilizaron placas con base de vidrio de 5 x 20 cm ó de 20 x 20 cm con soporte de Silicagel 60, espesor de capa 0,25 mm (Merck).

Los solventes utilizados fueron:

C: n-propanol-amoníaco 34% (v/v).

D: n-butanol-acetona-amoníaco-agua: (10:10:5:2) (v/v).

E: isopropanol-ácido acético-agua (20:1:5) (v/v).

Las muestras fueron sembradas con capilares a 2 cm del borde inferior y los desarrollos fueron interrumpidos a igual distancia del borde superior. En algunos casos se efectuaron recromatografías con el fin de lograr separaciones más eficientes.

Los standards externos fueron revelados con una solución de fluorescamina en cloruro de etileno (Whatman) y posteriormente visualizadas bajo luz ultravioleta.

La radioactividad en placas de 5 x 20 cm fue

determinada como se describe en la sección II.9.3.2.

Las corridas realizadas en las placas de 20 x 20 cm fueron sometidas a tratamiento de fluorografía con una solución de PPO 7% (w/v) en dietiléter según Randerath, K. (1970).

II.7. Electroforesis.

II.7.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

II.7.1.1. Condiciones no desnaturalizantes.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes se realizó en tubos cilíndricos (0,5 x 12 cm), siguiendo el procedimiento de Ornstein (1964) y Davis (1964) modificado por Tandecarz y col. (1973). El tamaño de poro corresponde a geles preparados con una concentración de 7% de acrilamida. El volumen de las muestras sembradas varió entre 50 y 150 μl y el contenido total de proteínas entre 50 y 150 μg. El buffer de corrida fue Tris 0,042 M; $EDTANa_2$ 0,0017 M y ácido bórico 0,05 M, pH 8,2. El desarrollo electroforético se realizó a una intensidad de corriente constante de 3 mA por gel durante 2 a 3 horas. Se usó azul de bromofenol como indicador interno.

II.7.1.2. Condiciones desnaturalizantes.

Se utilizaron geles planos armados en una celda marca Bio Rad modelo 220. Las dimensiones del gel fueron de 10 cm de alto, 14 cm de ancho y 1,5 mm de espesor. Las corridas se realizaron en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,1% y urea 3 M en los geles, a pH 8.3 según indican Ziegler y col. (1974). Los geles más comúnmente empleados fueron de 10% y 12.5% de acrilamida.

Antes de someter las muestras a electroforesis, se precipitaron las proteínas con TCA 10%, se centrifugó y se eliminó el exceso de ácido del precipitado por lavados con acetona. Se solubilizaron los precipitados en una mezcla desnaturalizante de SDS 2% (p/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v); sacarosa 20% (p/v); Tris 0,1 M; bicina [N,N-bis(2-hidroxietil)glicina] 0,1 M y azul de bromofenol 0,05% (p/v) a 100°C durante 1-2 minutos. Los canales utilizados fueron de 8 mm de ancho y el volumen de las muestras sembradas en cada canal varió entre 40 y 50 µl y el contenido de proteínas entre 10 y 100 µg, según el caso. El buffer de corrida fue Tris 0,1 M, bicina 0,1 M y SDS 0,1 % (p/v). La electroforesis se desarrolló a una intensidad de corriente constante de 25 mA por gel durante 4 horas, aproximadamente. Los geles fueron fijados y teñidos en una solución acuosa que contenía meta-

nol 5% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) y Coomasie Blue R250 0,25% (p/v). La decoloración del fondo fue realizada por sucesivos lavados con una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético glacial 7,5% (v/v).

II.7.1.3. Visualización de la actividad enzimática en geles.

Luego de la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, se incubó cada gel durante 12 horas con una mezcla cuya composición varió de acuerdo con la actividad enzimática medida. Las actividades enzimáticas determinadas fueron:

Actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno: Se usó una mezcla que contenía Glucosa-1-P 20 mM en buffer citrato 50 mM, pH 5,0.

Actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno: Se usó una mezcla que contenía Glucosa-1-P 20 mM y glucógeno 0,8% en buffer citrato 50 mM, pH 5,0.

La actividad de fosforilasa se evidenció por la aparición de una banda azul con el reactivo de Iodo, luego de sumergir los mismos en una solución de IK 0,2% y I_2 0,02% en buffer acetato 0,2 M, pH 4,8 (Stegemann, H., 1968).

II.7.1.4. Determinación de pesos moleculares por electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Como marcadores de peso molecular en condiciones desnaturalizantes se utilizaron: fosforilasa b (músculo de conejo, PM = 94.000), seroalbúmina bovina (PM = 67.000); ovoalbúmina (PM = 43.000); anhidrasa carbónica (eritrocitos bovinos, PM = 30.000); inhibidor de tripsina de soja (PM = 20.100) y α-lactoalbúmina (PM = 14.000). Los pesos moleculares en estudio se determinaron por interpolación en la curva de calibración obtenida cuando se representa la migración de las proteínas marcadoras en función de sus pesos moleculares (escala logarítmica).

II.7.1.5. Recuperación de compuestos radioactivos de los geles.

Con el fin de recuperar compuestos radioactivos luego de la corrida electroforética, se cortó la banda del gel, se homogeneizó con buffer Tris ClH 100 mM pH 7,4, se dejó 24 a 48 horas a 4°C y se eliminaron las partículas de gel por centrifugación.

II.7.2. Electroforesis de alto voltaje en papel.

Se realizó utilizando papel Whatman N°1 con enfriamiento por inmersión en tetracloruro de carbono. Se utilizaron voltajes de 1.000-1.500 volts (20 volts/cm) en desarrollos que duraron entre 3 y 4 horas. Los buffers

utilizados fueron:

1) Acido fórmico 5% pH 2,5.

2) Carbonato-bicarbonato 0,25 M, pH 9,2.

3) Molibdato de sodio 0,1 M, pH 5.

4) Acetato de piridina 1,2 M, pH 6,5.

Para la ubicación de los azúcares reductores se utilizó el método del nitrato de plata alcalino (Trevelyan y col., 1950). El mismo se basa en revelar las sustancias reductoras con una solución acetónica de NO_3Ag al 1% (p/v) en medio alcalino (HONa 0,5 N en solución etanólica). Las sales de plata remanentes fueron eliminadas por inmersión en solución de tiosulfato de sodio al 5%.

II.8. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

II.8.1. Preparación de los gradientes de sacarosa.

Se utilizaron gradientes lineales de 5-20% (p/v) de sacarosa que se prepararon en buffer A. Los gradientes (4 ml) se prepararon en tubos de acetato de celulosa (6 x 1,1 cm) y se sembraron con 0,2 ml de muestra que incluyó una mezcla de proteínas marcadoras que se indica en II.8.2. Se centrifugó a 40.000 rpm en un rotor SW 60.1 de Beckman durante 16 horas a 4°C. Al terminar la centrifugación se recogieron fracciones de 0,2 ml por succión desde el fondo del tubo con una cánula conectada a una

bomba peristáltica.

II.8.2. Determinación del coeficiente de sedimentación.

Las proteínas marcadoras utilizadas fueron las siguientes: catalasa de hígado bovino (0,1 mg/ml), lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (0,03 mg/ml), fosfatasa alcalina tipo III-S de *E. coli* (0,15 mg/ml) y citocromo c de corazón de caballo (2 mg/ml).

Los coeficientes de sedimentación se determinaron por interpolación en la curva de calibración obtenida cuando se representa el coeficiente de sedimentación de las proteínas marcadoras en función del número de fracción (desde el fondo del gradiente).

II.9. Otras técnicas.

II.9.1. Dosaje de proteínas.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (1951), utilizando albúmina bovina como patrón. Las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro Beckman D.U.

II.9.2. Determinación de proteínas marcadoras en gradientes de sacarosa y en columna de Sephacryl S-300.

CATALASA: La catalasa cataliza la siguiente reacción:

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

La actividad enzimática se ensayó incu-

bando la enzima en presencia de un exceso de H_2O_2 y valorando el sustrato no consumido (H_2O_2) con solución de IK La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 0,1 ml: buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4, H_2O_2 (Merck 100% p/v) y enzima. Después de 5 minutos a 30°C se detuvo la reacción con 2 ml de IK 10% (p/v). Se leyó la absorbancia a 425 nm.

LACTATO DESHIDROGENASA: La lactato deshidrogenasa cataliza la siguiente reacción:

Piruvato + $NADH_2 \longrightarrow$ Lactato + NAD^+

La actividad enzimática se ensayó midiendo la velocidad de oxidación del $NADH_2$, por medio de la medición de la velocidad de decrecimiento en absorbancia a 340 mm según la técnica descripta en el manual de Worthington (1972).

FOSFATASA ALCALINA: La fosfatasa alcalina cataliza la siguiente reacción:

Monoéster ortofosfórico + $H_2O \longrightarrow$

alcohol + H_3PO_3

La actividad enzimática se dosó midiendo a 410 el p-nitro fenol liberado al tratar p-nitro fenilfosfato con la enzima según la técnica descripta en el manual de Worthington (1972).

CITOCROMO C: Se valoró espectrofotómetricamente en el visible, midiendo la absorbancia a 410 nm.

II.9.3. Detección de radioactividad.

II.9.3.1. Centelleo líquido.

Los compuestos radioactivos se midieron con las mezclas de Bray (1960) o con una mezcla que contenía 4 gramos de omnifluor (New England Nuclear) en un litro de tolueno. La mezcla de omnifluor-tolueno se utilizó para medir (^{14}C) en filtros de nitrocelulosa secados bajo lámpara infrarroja y colocados en viales de plástico chicos con 3 ml de solución centelleadora. Las muestras fueron leídas en contadores de centelleo líquido marca Packard (modelo 2002 y 3003) o Beckman modelo L5 8100.

II.9.3.2. En radiocromatogramas en papel y en capa delgada.

Los radiocromatogramas fueron obtenidos empleando un aparato Packard (Radiocromatogram Scanner, modelo 7002). En el caso de cromatografías en capa delgada, la radioactividad se determinó también por centelleo líquido. Para ello se raspó la zona radioactiva de la capa de sílicagel, se resuspendió en agua y se eliminaron las partículas de sílicagel por centrifugación.

II.9.3.3. En geles de poliacrilamida.

Los geles corridos con muestras radioactivas fueron secados sobre papel Whatman N°3 en un secador de geles marca Bio Rad modelo 224. Se utilizó el método de sensibilización de Chamberlain et al. (1979). El mismo consiste en embeber al gel en una solución de salicilato de sodio 1 M. Las placas (Kodak X-OMAT S) fueron expuestas a -70°C por períodos variables. Luego se procedió al revelado de las placas utilizando reveladores y drogas comerciales.

III. RESULTADOS.

III.1. Solubilización de la preparación de membranas.

Como se describió en la sección I.5. de la Introducción, el sistema enzimático capaz de sintetizar un α-1,4 glucano unido a proteína, a partir de un aceptor endógeno de naturaleza proteica, está asociado a una fracción de membranas de tubérculo de papa. Este hecho complicaba el estudio de cada una de las enzimas que constituyen este complejo sistema enzimático, lo que indujo a buscar un método de solubilización como primer paso obligatorio en la purificación.

Con este propósito, se resuspendió en buffer A la fracción de membranas de tubérculo de papa, constituída principalmente por proplástidos libres de almidón; se dejó 48-72 horas a 0°C y se volvió a centrifugar a 140.000 x g. En el sobrenadante de esta centrifugación, que constituye la fracción solubilizada, están presentes entre un 30-40% de las proteínas de la preparación de membranas. Un incremento adicional de la fuerza iónica del medio no aumentó el porcentaje de las proteínas extraídas.

III.1.1. Glucosiltransferasas presentes en la fracción solubilizada.

Se midieron las actividades de glucosiltransferasa en la fracción solubilizada, en ausencia (Tabla 6) y en presencia (Tabla 7) de aceptor exógeno, como se indica en la sección II.3. de Materiales y Métodos. Se observó que esta preparación enzimática era capaz de catalizar la transferencia de glucosas a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 μM a material precipitable por TCA, en ausencia de aceptor agregado (Tabla 6), lo que indica la solubilización de la enzima que cataliza la Reacción 1, o sea de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. La Tabla 6 muestra también que en la fracción solubilizada están presentes las enzimas que catalizan la reacción completa (Reacción 1 + Reacción 2), ya que por incubación con UDP-(^{14}C)Glc 4 mM, o UDP-(^{14}C)Glc 4 μM + ADP-(^{14}C)Glc 4 mM ó UDP-(^{14}C)Glc 4 μM + Glucosa-1-P 4 mM, como se describe en el ensayo a de la sección II.3.4. de Materiales y Métodos, se encuentra un marcado aumento de la radioactividad incorporada en material insoluble en TCA, por sobre la observada en la Reacción 1.

La Tabla 7 muestra los resultados que se obtienen cuando se incuba la fracción solubilizada con UDP-Glc, ADP-Glc ó Glucosa-1-P y glucógeno como aceptor

exógeno. La radioactividad que se encuentra en el precipitado de metanol indica la presencia de UDP(ADP)-Glc: almidón sintetasa y de fosforilasa. Se observó además radioactividad en el precipitado de TCA en ausencia de aceptor exógeno con (^{14}C)Glucosa-1-P como dador de glucosa. Esta actividad de fosforilasa, independiente del aceptor exógeno, fue descripta por Tandecarz y col. (1975 y 1978) y por Sivak y col. (1981) en una fracción soluble de 140.000 x g de tubérculo de papa. Schneider y col. (1981) también detectaron la presencia de fosforilasa asociada a las membranas de los amiloplastos de tubérculos de papa en los períodos de rápida formación de almidón.

La incorporación de radioactividad en el precipitado de TCA no se altera por el agregado de glucógeno a la mezcla de incubación en presencia de UDP-(^{14}C)Glc 4 μM (Tablas 6 y 7). Este resultado sugiere que el aceptor exógeno no compite con el endógeno. En consecuencia, es probable que la enzima que cataliza la Reacción 1 sea específica para el aceptor endógeno presente en la preparación enzimática.

TABLA 6: Incorporación de glucosa a partir de UDP-(^{14}C)Glc a material precipitable por TCA, en ausencia de aceptor exógeno.

Dador de glucosa	Radioactividad precipitable por TCA (cpm)
UDP-(^{14}C)Glc 4 μM	1.799
UDP-(^{14}C)Glc 4 mM	1.900
UDP-(^{14}C)Glc 4 μM + ADP-Glc 4 mM	2.277
UDP-(^{14}C)Glc 4 μM + Glucosa-1-P 4 mM	5.636

La fracción solubilizada (250 μg de proteínas) fue incubada con los dadores de glucosa que se indican, durante 4 horas. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos (Sección II.3.3. y II.3.4., ensayo a).

TABLA 7: Fosforilasas y sintetasas presentes en la fracción solubilizada.

Dador de glucosa radioactiva		Radioactividad incorporada	
		Pp do TCA	Pp do metanol
		(cpm)	
UDP-(^{14}C)Glc	4 μM	2.203	1.203
ADP-(^{14}C)Glc	4 μM	200	10.703
(^{14}C)Glucosa-1-P	4 μM	208	4.008
(^{14}C)Glucosa-1-P	4 mM	2.815[a]	99

La fracción solubilizada (250 μg de proteínas) fue incubada con 400 μg de glucógeno como aceptor exógeno y los dadores de glucosa que se indican, durante 180 minutos a 30°C. Se midió la radioactividad en el material precipitable por TCA o en el material precipitable por metanol del sobrenadante de TCA. Las demás condiciones se indican en la sección II.3.1. y II.3.2. de Materiales y Métodos.

[a]: En ausencia de aceptor exógeno.

III.1.2. Propiedades del sistema enzimático de síntesis de un α-glucano unido a proteína.

III.1.2.1. Propiedades de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I.

El efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima que cataliza la Reacción 1 se ilustra en la figura 5A. La reacción es muy rápida, llegando a un 70% del máximo de incorporación de glucosa radioactiva en aproximadamente 5 minutos. Se alcanzó un plateau entre los 20 a 30 minutos de incubación. La detención de la síntesis no fue debido al agotamiento del sustrato, ya que el agregado de una cantidad extra de UDP-(^{14}C)Glc no produjo ningún efecto. Por consiguiente, podría deberse al agotamiento del aceptor endógeno o a la inactivación de la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. Esto último es poco probable, ya que se encontró que la actividad de la enzima no exhibió variación en un amplio rango de temperaturas (datos no mostrados). Por otro lado, el agregado de una cantidad extra de fracción solubilizada reinicia la incorporación de glucosa, llegando a un nuevo plateau con la misma cinética. Estos resultados sugieren la existencia de un número reducido de moléculas de aceptor en la preparación enzimática que explicaría la detención de la síntesis al cabo de un corto período de

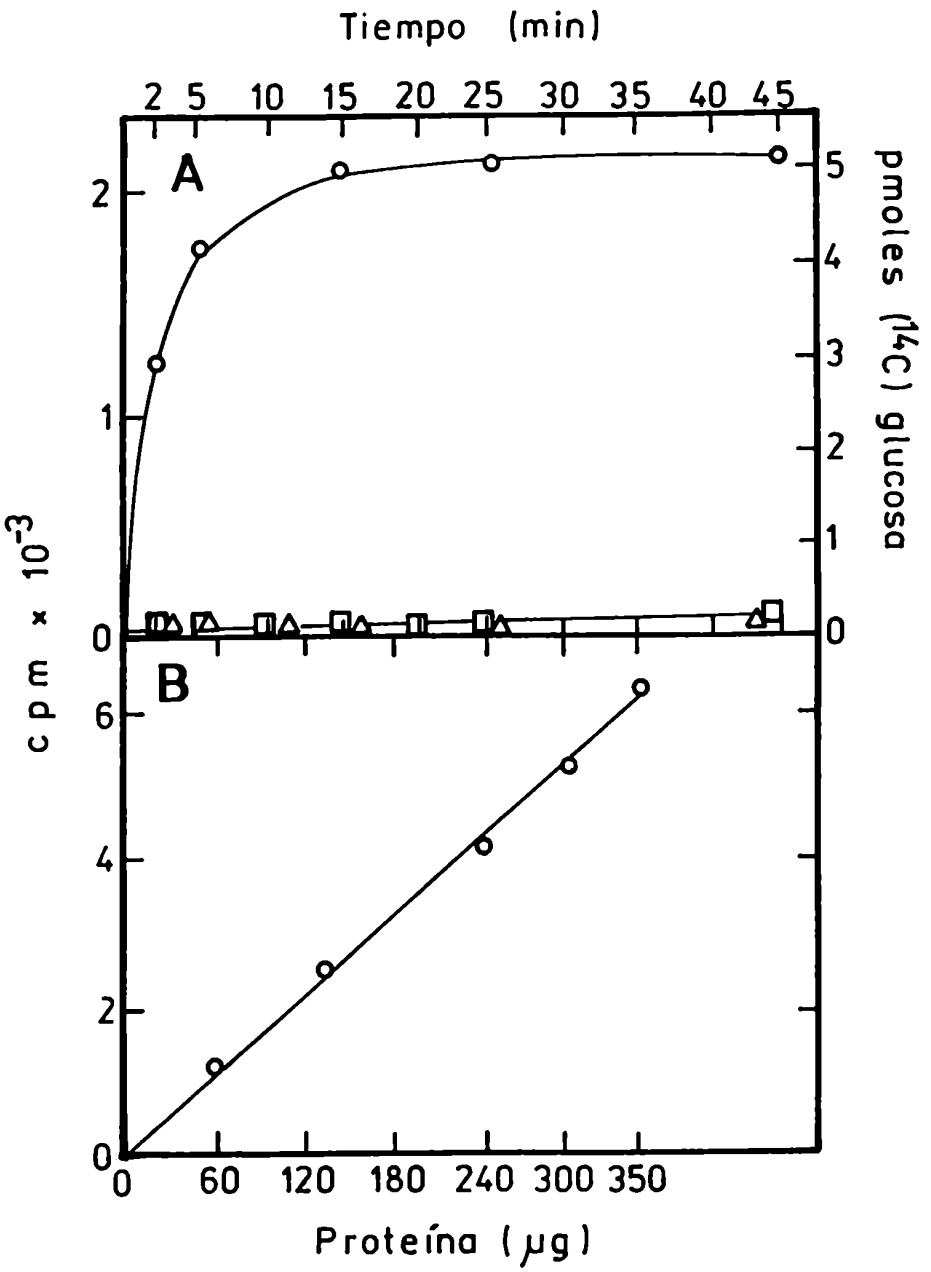


Fig. 5: Actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I en función del tiempo de reacción (A) y de la concentración de proteínas (B). Se incubó 60 µg de proteínas de la fracción solubilizada con UDP-(^{14}C)Glc 4 µM (—o—o—o—) ó ADP-(^{14}C)Glc 4 µM (—□—□—□—) ó (^{14}C)Glucosa-1-P 4 µM (—△—△—△—) (A). En (B) el tiempo de incubación fue de 5 minutos. Las demás condiciones se indican en Materiales y Métodos.

reacción.

La enzima que cataliza la Reacción 1 tiene especificidad de dador de glucosa: solo transfiere glucosa del UDP-Glc al aceptor endógeno (Fig. 5A). Este resultado coincide con el descripto para la enzima asociada a membranas (Lavintman y Cardini, 1973). La figura 5B muestra la actividad de la enzima que cataliza la Reacción 1 en función de la cantidad de proteínas en la mezcla de reacción. Se encontró que, hasta 350 μg de proteínas, la reacción era lineal.

La actividad de la enzima no varió significativamente entre pH 5,5 a 9, encontrándose una leve inhibición a valores menores de 5,5 (Fig. 6A). Además, mostró requerimiento de iones manganeso con una concentración óptima de 6 mM (Fig. 6B).

III.1.2.2. Propiedades de las enzimas que catalizan la formación de uniones glucosídicas.

El efecto de diferentes dadores de glucosa en concentración milimolar sobre la cinética de incorporación de radioactividad a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 μM se muestra en la figura 7. Para ello se realizó una incubación en dos etapas (ensayo b, Sección II.3.4. de Materiales y Métodos). En la primera etapa se incubó la fracción solubilizada con UDP-(^{14}C)Glc 4 μM hasta llegar

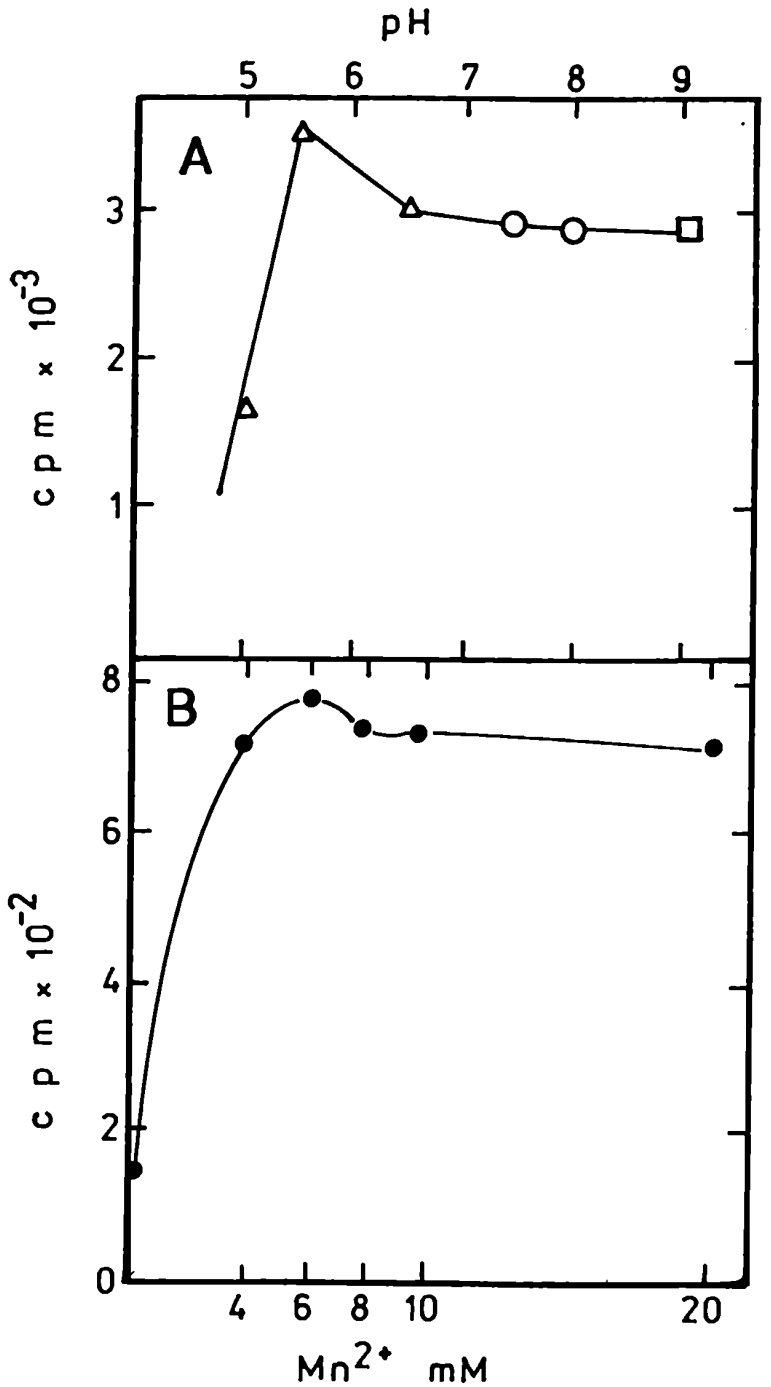


Fig. 6: Efecto del pH (A) y del Mn^{2+} (B) sobre la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. La fracción solubilizada (30 µg de proteína) se incubó en presencia de buffer Mes 200 mM (—△—△—△—) o buffer Tris-ClH 100 mM (—○—○—○—) o buffer glicina-HONa 200 mM (—□—□—□—)(A) o en presencia de concentraciones variables de Mn (B):(—●—●—●—).

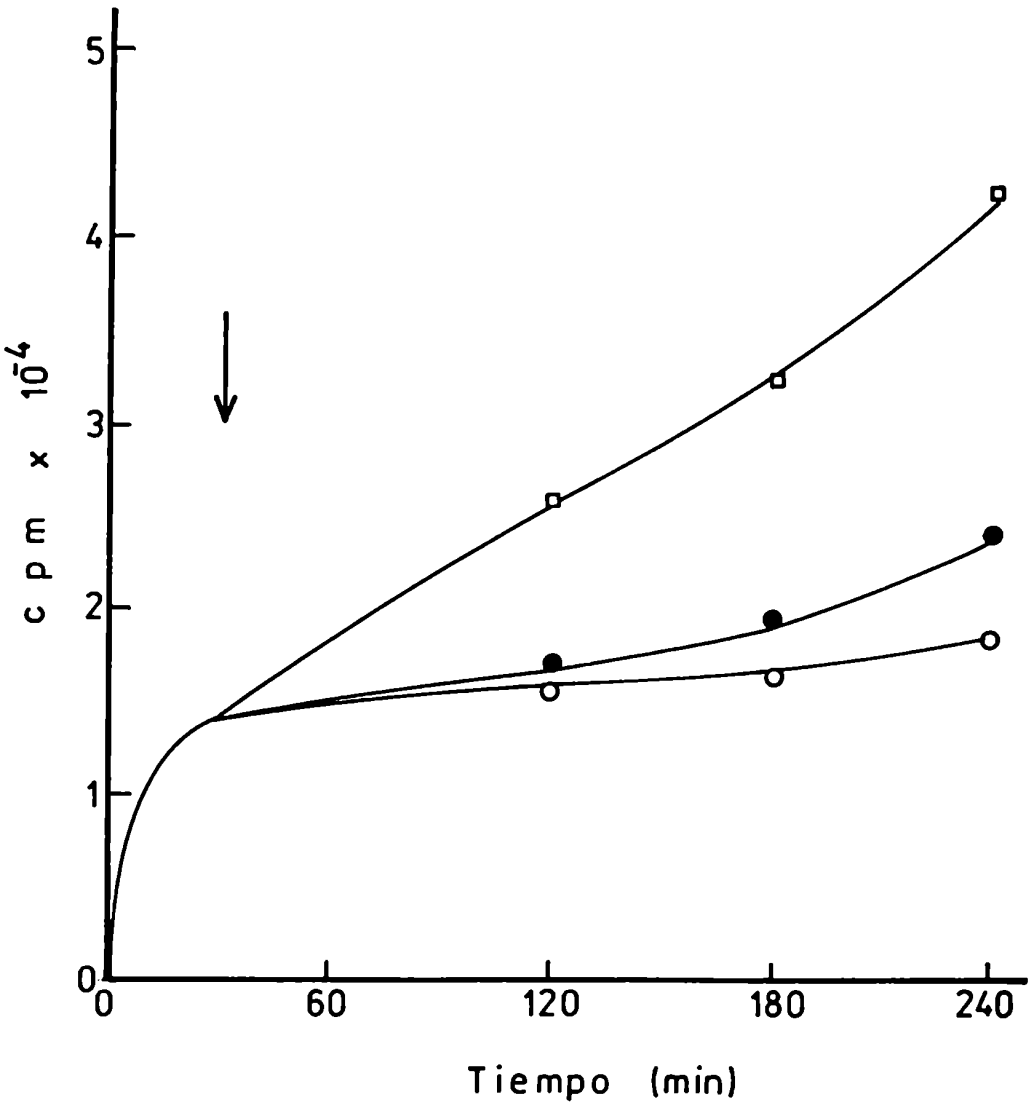


Fig. 7: Efecto del agregado de diferentes dadores de glucosa sobre la cinética de incorporación de radioactividad a partir de UDP-Glc 4 µM. La fracción solubilizada (240 µg de proteína) se incubó con UDP-(^{14}C)Glc 4 µM a 30°C durante 30 minutos; al término de este período (indicado por la flecha) se agregó UDP-Glc 4 mM (—○—○—○—) ó ADP-Glc 4 mM (—●—●—●—) ó Glucosa-1-P 4 mM (—□—□—□—) y se prosiguió la incubación por los tiempos indicados en la figura. Las demás condiciones se indican en la Sección II.3.4. (ensayo b) de Materiales y Métodos.

al plateau (30 minutos) y en la segunda etapa se agregaron los diferentes dadores de glucosa marcados en concentración 4 mM. El agregado de estos últimos reinició la incorporación de glucosa radioactiva, luego de un período de lag, probablemente se están incorporando glucosas a partir de los dadores de glucosa en concentración milimolar.

Cuando se miden las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de un α-glucano unido a proteína, mediante el ensayo a (Sección II.3.4., en una sola etapa), incubando la fracción solubilizada con UDP-(^{14}C)Glc 4 mM, a diferencia del experimento anterior, no se observa incorporación de radioactividad a tiempos cortos, catalizado por la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I, ya que el K_m para dicho sustrato es de 4×10^{-6} M. Además, la incorporación de radioactividad fue prácticamente lineal después de un período de "lag" (1-2 horas) (Fig. 8A). La figura 8B muestra la dependencia con la cantidad de proteínas de la incorporación de radioactividad a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 mM. La marca incorporada al material precipitable por TCA 10% mostró una relación lineal con la cantidad de enzima utilizada en el rango de proteínas en la cual se trabajó (hasta 300 μg).

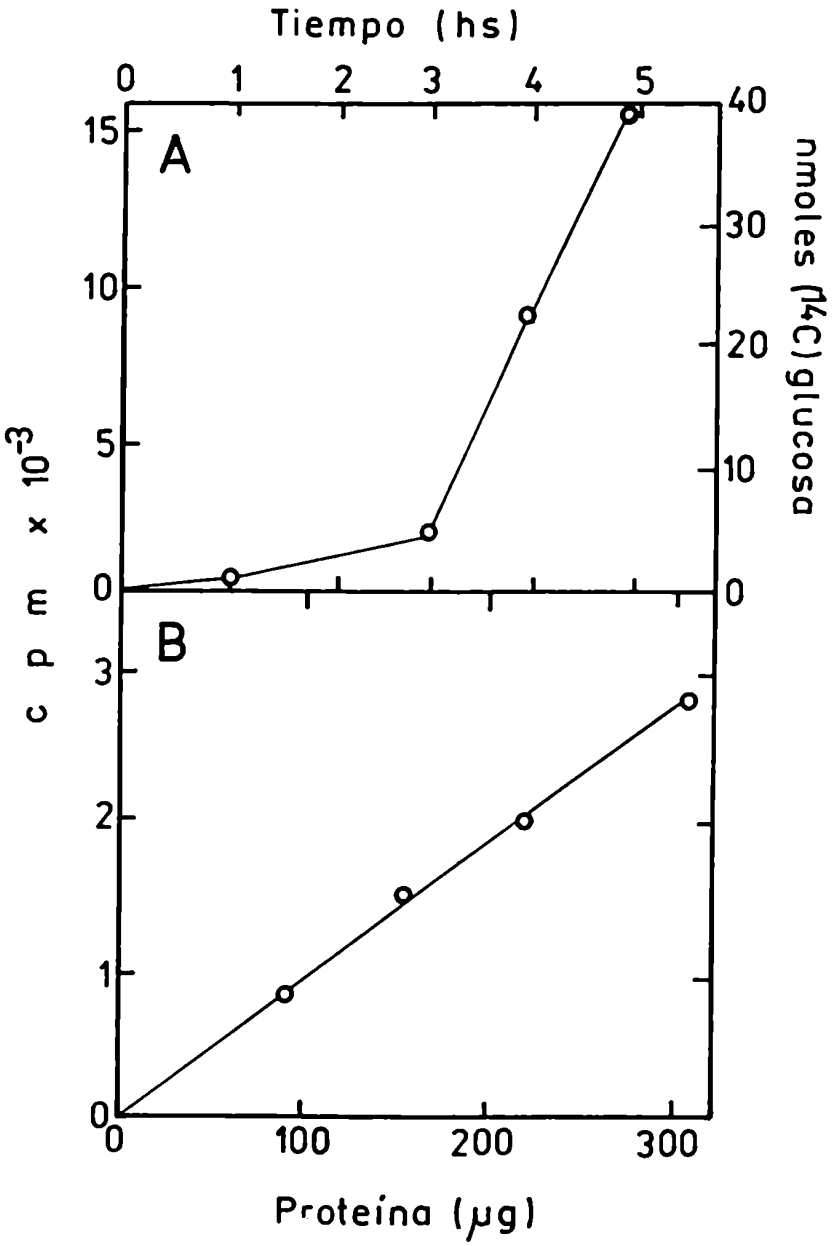


Fig. 8: Cinética de incorporación de glucosa radioactiva a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 mM (medición de la reacción completa) en función del tiempo (A) y en función de la concentración de proteínas (B). En (A) la mezcla de incubación contiene 240 µg de proteínas. En (B) el tiempo de reacción fue de 180 minutos. Las demás condiciones se indican en Materiales y Métodos (Sección II.3.4., ensayo a).

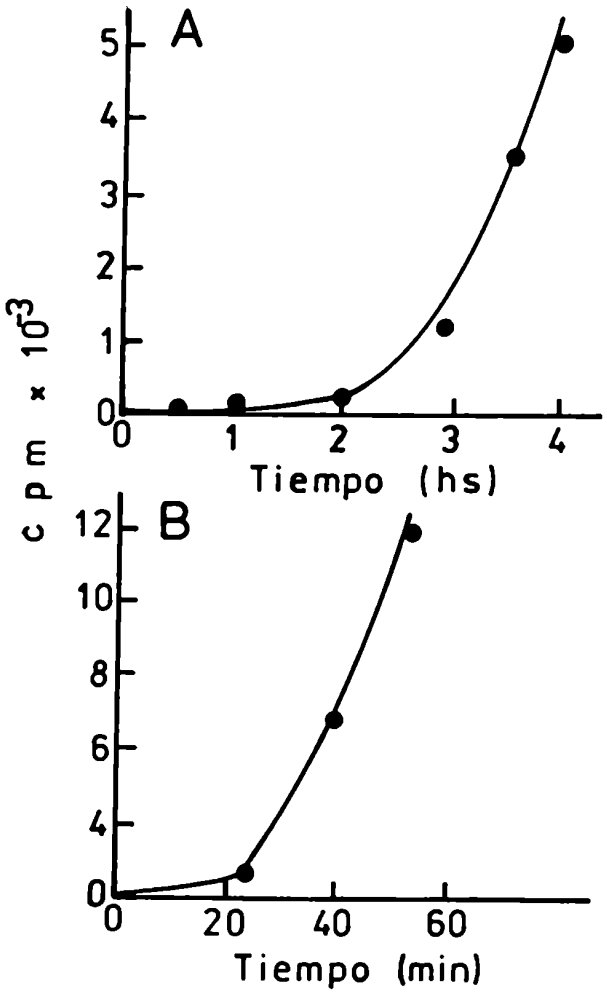


Fig. 9: Efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de radioactividad a partir de diferentes dadores de glucosa a material precipitable por TCA 10%. A: La mezcla de reacción que contiene 240 µg de proteínas se incubó durante los tiempos indicados con: UDP-Glc 1 µM + ADP-(^{14}C)Glc 4 mM (A) y UDP-Glc 1 µM + (^{14}C)Glucosa-1-P 4 mM (B). A los tiempos indicados, se determinó la radioactividad en el precipitado de TCA 10% como se describe en la Sección II.9.3. de Materiales y Métodos.

Para demostrar que los dadores de glucosa a concentración milimolar no tienen solamente un efecto activador sobre la enzima que cataliza la Reacción 1, sino que se incorporan al material precipitable por TCA 10%, se realizaron experimentos con los distintos dadores de glucosa radioactivos en concentración milimolar. Cuando se incuba la fracción solubilizada con UDP-Glc 1 μM + ADP-(^{14}C)Glc 4 mM (Fig. 9A) o con UDP-Glc 1 μM + (^{14}C)Glucosa-1-P 4 mM (Fig. 9B), se encontró que la incorporación de radioactividad era prácticamente lineal luego de aproximadamente 60-120 minutos y 20 minutos respectivamente. Los resultados mostrados en este apartado muestran que las enzimas solubilizadas presentan los mismos requerimientos y cinéticas similares a las de las enzimas asociadas a membranas (Lavintman y col., 1974; Tandecarz y Cardini, 1978).

III.1.3. Caracterización "in vitro" de los productos de reacción.

Los productos radioactivos sintetizados por la fracción solubilizada fueron sometidos a una serie de tratamientos con el objeto de determinar si son los mismos que los sintetizados por la fracción de membranas, y los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 8. El producto radioactivo formado en la Reacción 1, obtenido

como se describió en la sección II.4.1. de Materiales y Métodos, se sometió a tratamiento con α ó β-amilasa. Se encontró que el producto formado en la Reacción 1 no es atacado por α ó β-amilasa. En cambio, estas enzimas producen una liberación del 80 al 87% de la radioactividad del producto sintetizado en presencia de UDP-(^{14}C)Glc 4 mM (obtenido como se describió en la sección II.4.1. de Materiales y Métodos) (Tabla 8). La radioactividad liberada al sobrenadante de TCA, por acción de las enzimas glucolíticas, se analizó por cromatografía en papel. La cromatografía en solvente A del producto de la digestión con β-amilasa mostró que toda la radioactividad estaba asociada con maltosa. Como producto de digestión de α-amilasa se encontró (^{14}C)maltosa y (^{14}C)glucosa.

El 80% de la radioactividad del producto formado en la Reacción 1 se recupera en el sobrenadante de TCA luego del ataque enzimático con proteasa. Dicho producto, previo al tratamiento proteolítico, se excluye en una columna de Sephadex G-15, pero luego de éste, la radioactividad se incluye. El material radioactivo incluído migró hacia el cátodo en el solvente 1 y hacia el ánodo en el solvente 2, cuando se lo sometió a electroforesis en papel (Fig. 10, a y b).

TABLA 8: Efecto de algunos tratamientos sobre los productos de la Reacción 1 y de la Reacción 1 + Reacción 2.

Tratamiento	Condiciones	Radioactividad precipitable por TCA (%)
A:		
α-amilasa	37°C, 24 horas	80
β-amilasa	37°C, 48 horas	85
Pronasa	T. amb, 8 días	8
NaOH (0,2N) + BH_4Na (0.2N)	50°C, 5 horas	34
B:		
α-amilasa	37°C, 24 horas	20
β-amilasa	37°C, 48 horas	13

El producto radioactivo de la Reacción 1 (A) y el producto radioactivo de la Reacción 1 + Reacción 2 (ensayo a, sección II.3.4.) (B), se sometieron a una serie de tratamientos. Los productos se obtuvieron como se describió en la sección II.4.1. de Materiales y Métodos.

El efecto del tratamiento alcalino en condiciones reductoras sobre el producto radioactivo catalizado por la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I, se muestra también en la Tabla 8A. El producto de la Reacción 1 es sensible a este tratamiento, ya que como consecuencia de mismo se liberó un 66% de la radioactividad al sobrenadante de TCA. Las proteínas que son sensibles a este tratamiento son las que poseen unión O-glicosídica, en la que el azúcar está unido al oxhidrilo de residuos de serina/treonina de la proteína (ver sección I.4.3. de Introducción). Por este tratamiento el monosacárido unido a la proteína se convierte en su correspondiente azúcar-alcohol, que fue identificado como sorbitol(^{14}C) por electroforesis en papel en el solvente 3 (Fig. 10C). Este resultado indica que el azúcar involucrado en la unión es glucosa. Por otro lado había sido descripto para la fracción de membranas (Tandecarz y Cardini, 1978) que el producto de la reacción completa era resistente al tratamiento alcalino bajo condiciones reductoras. Sin embargo, si se lo sometía a una β-amilolisis exhaustiva, previa al tratamiento alcalino, se volvía sensible a éste; la resistencia fue atribuída a la existencia de

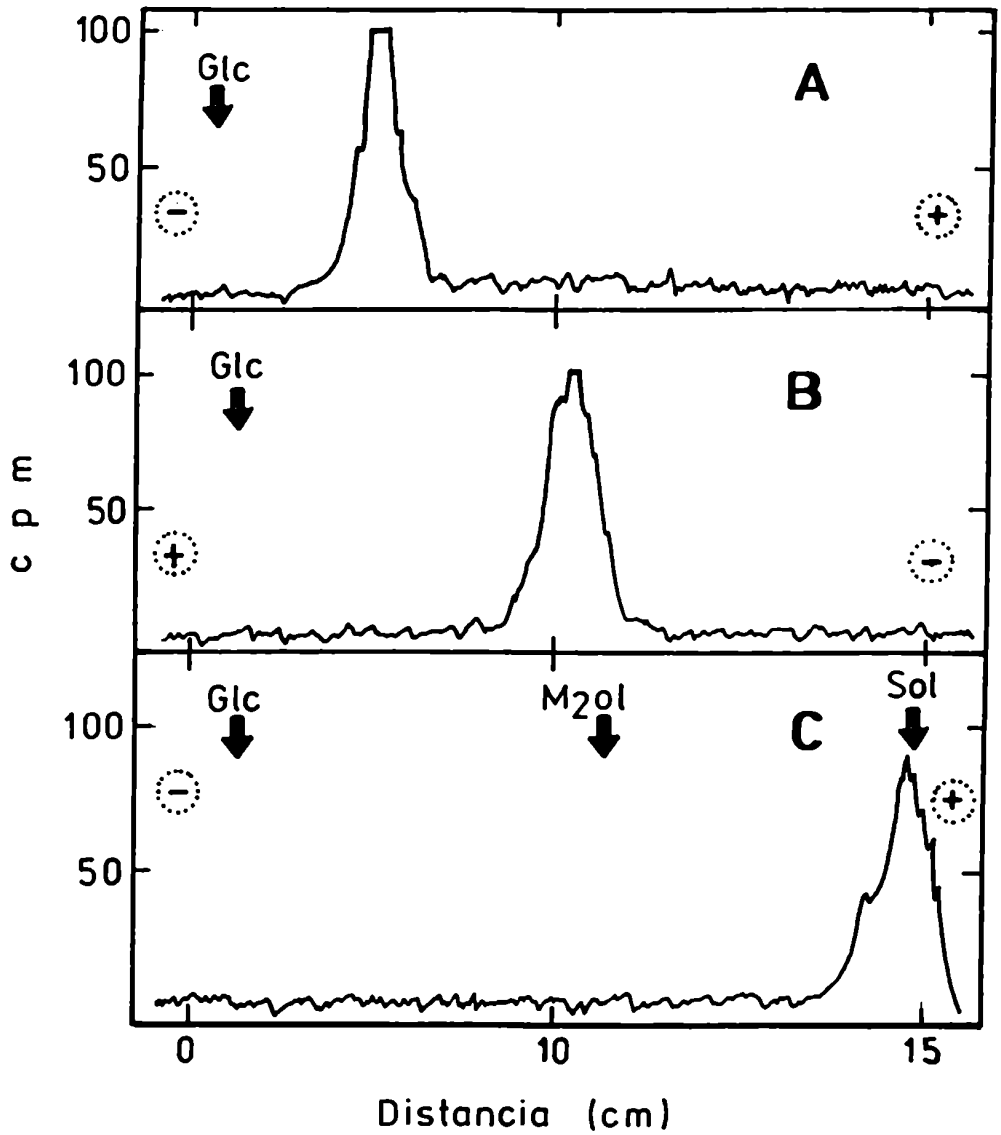


Fig. 10: Electroforesis en alto voltaje. Los glucopéptidos obtenidos por digestión con proteasa del producto radioactivo de la Reacción 1 obtenido como se describe en la Sección II.4.4., parcialmente purificados por Sephadex G-15, se someten a electroforesis en buffer carbonato-bicarbonato 0,25 M, pH 9,2 (A) y en ácido fórmico 5% pH 2,5 (B). C: Electroforesis en molibdato de sodio 0,1 M, pH 5, del producto de la Reacción 1 luego del tratamiento alcalino en condiciones reductoras. Las demás condiciones de la electroforesis se indican en la Sección II.7.2. de Materiales y Métodos.

impedimento estérico debido a la presencia de cadenas α-1,4 glucosídicas. El producto de la reacción completa forma un complejo azul con el reactivo de iodo; el espectro de absorción de este complejo con un máximo a 600 nm es típico de glucanos lineales de más de 60 unidades de glucosas (Bailey y Whelan, 1961). Por otro lado, el producto de la Reacción 1 no da coloración con iodo.

Esta serie de tratamientos sugiere que el producto de la Reacción 1 es una glucoproteína en la cual un solo residuo de glucosa está unido a la proteína aceptora endógena, presumiblemente a través de una unión O-glicosídica a residuos de serina/treonina. Por otra parte, los datos obtenidos con el producto de la reacción completa indican que la porción de hidratos de carbono presenta una estructura prácticamente lineal de uniones glucosídicas α-1,4 semejante a la de amilosa.

III.1.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y urea.

Los resultados de la sección precedente muestran que el aceptor endógeno de la Reacción 1 es de naturaleza proteica y que la glucosa está presumiblemente unida a la proteína por una unión covalente. Con el fin de confirmar estos resultados, se sometió el producto radioactivo de la Reacción 1, obtenido como se indicó en

la sección II.4.1. de Materiales y Métodos, a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y urea, a dos concentraciones de acrilamida: 10% y 12,5%. La muestra, antes de la electroforesis, se calentó a 100°C con urea, SDS y 2-mercaptoetanol con el objeto de asegurar la ruptura de uniones débiles del tipo no covalente. La migración del producto radioactivo en gel se determinó por autorradiografía, como se describe en la sección II.9.3.3. de Materiales y Métodos. La figura 11 muestra las fluorografías correspondientes al producto radioactivo de la Reacción 1. Se encontró una banda de peso molecular de 38.000 dalton tanto a 10% como a 12,5% de acrilamida en el gel. El peso molecular fue calculado por interpolación de la movilidad de la banda radioactiva en una curva de calibración realizada con una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos, sometidas a electroforesis en condiciones similares.

Segrest y col. (1971) mostraron que el peso molecular aparente de las glicoproteínas, con más del 10% de carbohidratos, calculado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, disminuye al aumentar la concentración de acrilamida. La igualdad de peso molecular hallado en las dos concentraciones de acrilamida en el gel indica que la banda de 38.000 es una proteína que

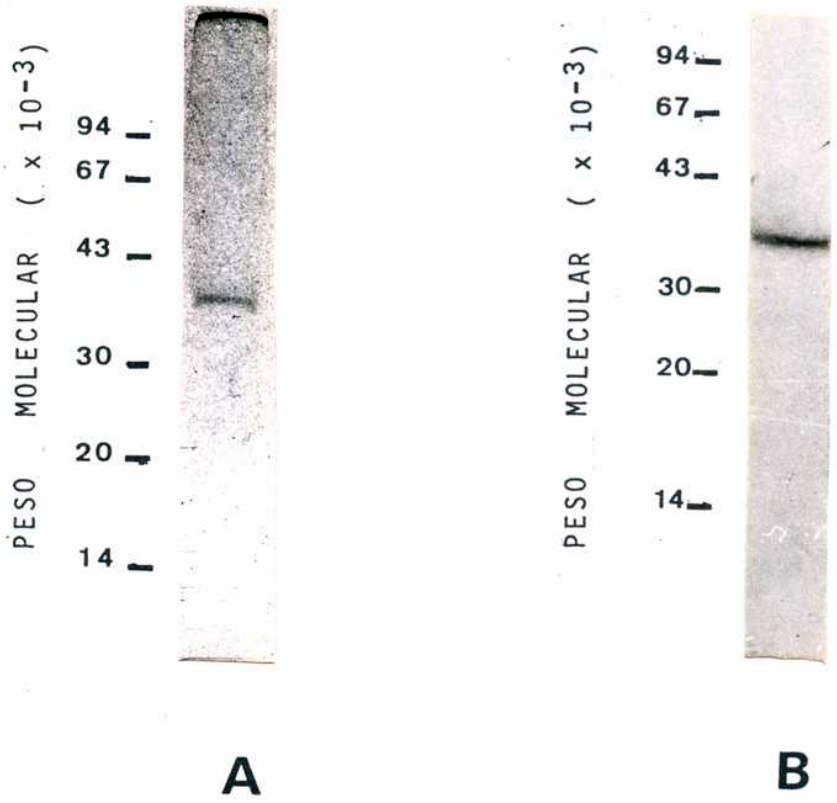


Fig. 11: Fluorografía luego de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y urea. El producto radioactivo de la Reacción I (100 µg de proteínas de la fracción solubilizada, 2.000 cpm) obtenido por precipitación con TCA, fue sometido a electroforesis en 10% de acrilamida (A) y 12,5% de acrilamida (B). La escala de la izquierda muestra los pesos moleculares estimados, determinados con una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos (Sección II.7.1.2.).

no posee carbohidratos endógenos o, que si los posee, su contenido es menos del 10%.

III.2. Separación de las glucosiltransferasas solubilizadas.

Con el fin de estudiar cada una de las enzimas que catalizan la síntesis de un α-1,4 glucano unido a proteína en la fracción solubilizada, se intentó la separación de éstas. Se sometió una alícuota de la fracción solubilizada (30-50 mg de proteínas) a cromatografía en columna de DEAE-celulosa; la elución de las proteínas de la columna se realizó con un gradiente continuo de cloruro de potasio de 0-0,5 M. Cuando se midió la actividad de UDP-glucosa: proteína transglucosilasa I en alícuotas de cada una de las fracciones de la columna, se observó que esta actividad enzimática eluye en un pico agudo y simétrico que eluye a 0,21 M de ClK (Fig. 12). Se reunieron las fracciones (67-76) con actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I denominándose Pico I a esta fracción enzimática. La cromatografía en DEAE-celulosa resultó en una purificación de la actividad anteriormente mencionada de unas 15 veces con respecto de la actividad en la preparación particulada, como se muestra en la Tabla 9.

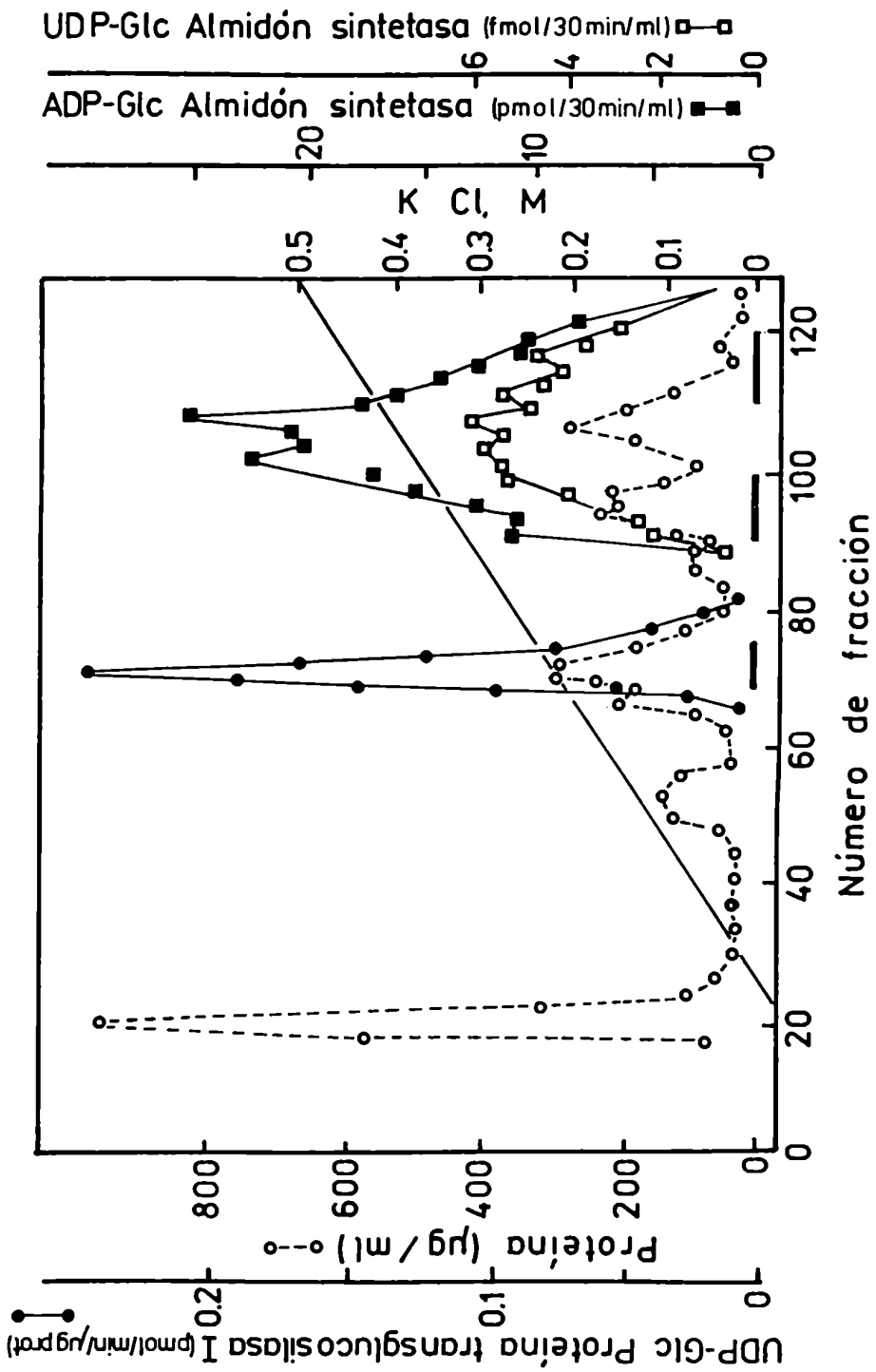


Fig. 12: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la fracción solubilizada. Se midió actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (—●—●—●—) en alícuotas de 100 µl y UDP-Glc almidón sintetasa (—□—□—□—) ADP-Glc: almidón sintetasa (—■—■—■—) en alícuotas de 150 µl. El tiempo de incubación de las almidón sintetasas fue de 180 minutos. Las barras indican las fracciones reunidas.

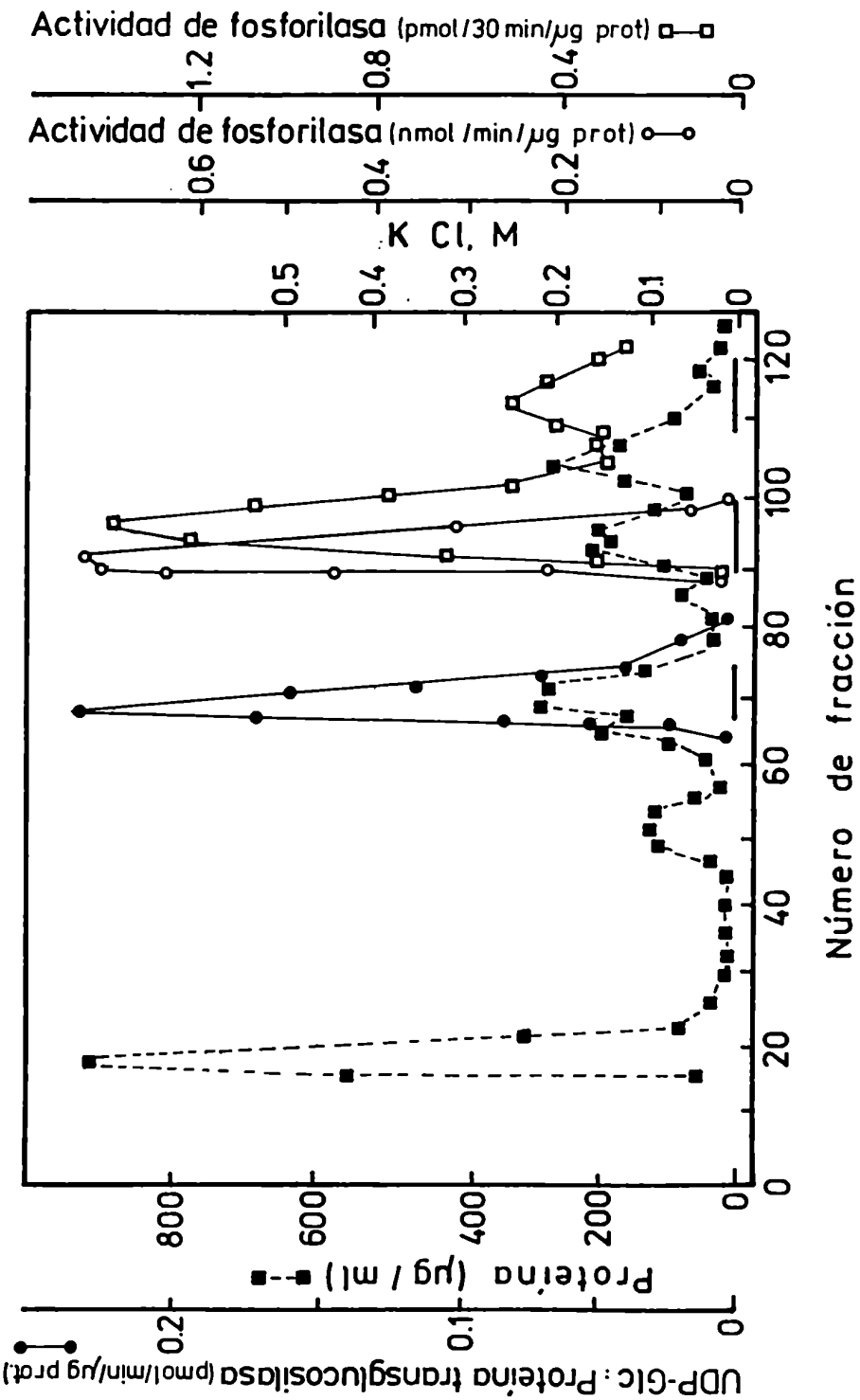


Fig. 13: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la fracción solubilizada. Se midió actividad de fosforilasa dependiente (□—□) e independiente (-○—○-) de aceptor exógeno en alícuotas de 100 y 50 µl respectivamente. Los tiempos de incubación fueron de 150 min para el ensayo de la actividad dependiente y de 30 min para la independiente de aceptor exógeno. Las demás condiciones se describen en Materiales y Métodos. Las barras indican las fracciones reunidas.

Tabla 9: Purificación de UDP-glucosa: proteína transglucosilasa I.

Fracción	Actividad específica (cpm/mg de proteínas)	Unidades totales
Preparación particulada	11.000	189.000
Fracción solubilizada	20.000	70.000
Pico I (DEAE)	166.670	10.000

Cuando se midió la actividad de las enzimas que sintetizan el producto de la reacción completa en cada fracción de la columna, por incubación de una alícuota de éstas con UDP-(^{14}C)Glc 4 μM en presencia de UDP-Glc, ADP-Glc o Glucosa-1-P en concentración milimolar (ensayo a Sección II.3.4. de Materiales y Métodos), no se halló actividad en ninguna de las fracciones. Tampoco se halló actividad de estas enzimas en el Pico I. Dicho resultado es bastante predecible, ya que las enzimas que sintetizan el α-1,4 glucano requieren el producto de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I como aceptor. Por consiguiente, las enzimas que catalizan la síntesis de uniones glu-

cosídicas α-1,4 se encuentran en una zona de elución diferente a la de la enzima que cataliza la Reacción 1 y no se pueden medir según el ensayo a ó b (Sección II.3.4. de Materiales y Métodos) por falta del aceptor glucosilado sintetizado por la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. Por otro lado, se mostró anteriormente (Tabla 7) que en la fracción solubilizada estaban presentes las actividades de almidón sintetasa y fosforilasa dependientes de aceptor exógeno. Con el fin de estudiar la posible relación de éstas con las enzimas que alargan el producto de la Reacción 1, se buscaron estas actividades en la columna de DEAE-celulosa. Se halló que las actividades de UDP(ADP)-Glc almidón sintetasas eluyen en un rango amplio de concentración salina (0,25-0,35 M de cloruro de potasio) y sus zonas de elución se superponen dando picos anchos (Fig. 12). La actividad relativa de estas enzimas depende de la preparación.

La figura 13 ilustra el perfil de las actividades de fosforilasa. La actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno muestra un pico ancho de actividad con un hombro hacia concentraciones mayores de cloruro de potasio, que eluye entre 0.25-0.35 M de éste. Por el contrario, el perfil de actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno mostró un pico de actividad

agudo y simétrico que eluyó a 0,25-0,26 M de cloruro de potasio (Fig. 13). Dada la superposición entre sí de las actividades de sintetasa y fosforilasa en la columna de DEAE (Figs. 12 y 13), se decidió reunir las fracciones (92-98) con actividad de fosforilasa independiente y dependiente de aceptor (Pico IIa) y, por otro lado, reunir las fracciones (103-112) que poseen solamente actividad de fosforilasa dependiente de aceptor (Pico IIb). Cada una de estas fracciones activas se concentraron por ultrafiltración a través de membranas UM-10 (Amicon Corporation) que retienen proteínas de peso molecular mayor de 10.000 dalton.

Las actividades enzimáticas presentes en los picos IIa y IIb se muestran en la tabla 10. La incorporación de radioactividad a material precipitable por TCA en el Pico IIa, en ausencia de polisacárido agregado, sólo fue observada en presencia de (^{14}C)Glucosa-1-P 4 mM. Esta actividad independiente de aceptor exógeno se activa por buffer Mes y albúmina. Sivak y col. (1981) encontraron resultados similares con una fosforilasa independiente de aceptor exógeno de una fracción soluble de 140.000 x g de tubérculos de papa. En presencia de (^{14}C)Glucosa-1-P 4 μM y glucógeno como polisacárido aceptor, se mide solamente la actividad de fosforilasa dependiente de aceptor

exógeno (Sivak y col., 1981).

Como se mostró anteriormente (Figs. 12 y 13), las actividades de UDP(ADP)-Glc almidón sintetasa dependientes de aceptor exógeno cocromatografiaban en DEAE-celulosa con las actividades de fosforilasa, por consiguiente también están presentes en los picos IIa y IIb.

La cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la fracción solubilizada no permitió resolver las diferentes actividades de fosforilasa y almidón sintetasa presentes en la preparación. Sin embargo, este tipo de cromatografía fue eficiente para separar la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (Moreno y Tandecarz, 1982).

TABLA 10: Glucosiltransferasas presentes en los Picos IIa y IIb.

Dador de glucosa	Aceptor exógeno	Radioactividad en Ppdo TCA (cpm)	Radioactividad en Ppdo Metanol (cpm)
A) Pico IIa:			
(^{14}C)Glucosa-1-P 4 mM	_____	3465	86
(^{14}C)Glucosa-1-P 4 μM	_____	85	76
(^{14}C)Glucosa-1-P 4 μM	glucógeno	118	4442
UDP-(^{14}C)Glc 4 μM	amilopectina	98	1482
ADP-(^{14}C)Glc 4 μM	amilopectina	42	2501
B) Pico IIb:			
(^{14}C)Glucosa-1-P 4 mM	_____	94	84
(^{14}C)Glucosa-1-P 4 μM	_____	65	83
(^{14}C)Glucosa-1-P 4 μM	glucógeno	67	2189
UDP-(^{14}C)Glc 4 μM	amilopectina	84	1834
ADP-(^{14}C)Glc 4 μM	amilopectina	66	2758

La mezcla de incubación contiene: 3,2 μg de proteínas del Pico IIa ó 3 μg de proteínas del Pico IIb. Luego de incubar durante 45 minutos a 30°C, se midió el material radioactivo precipitable por TCA 10% o precipitable por metanol en el sobrenadante de TCA. Se utilizó como aceptor exógeno glucógeno (2,6 mg/ml) o amilopectina (0,6 mg/ml).

III.3. Estudio de la UDP-Glc-proteína transglucosilasa I (Pico I).

III.3.1. Propiedades cinéticas.

La figura 14 muestra el efecto del tiempo de reacción (A) y de la cantidad de proteínas (B) sobre la actividad de UDP-glc: proteína transglucosilasa I. Se encontró que la reacción era lineal hasta 18 μg de proteínas. La actividad enzimática no experimentó ninguna variación entre pH 6 a 9, encontrándose una leve inhibición a valores de pH menores de 6.

III.3.2. Especificidad de dador y de aceptor de glucosa.

Se investigó la especificidad del dador y del aceptor de glucosa y los resultados se muestran en la Tabla 11. Se observó que el UDP-Glc es el dador específico de glucosas al igual que en la preparación particulada (Lavintman y col. 1974).

En la sección III.1.1. se consideró la probabilidad de que la enzima fuera también específica para el aceptor endógeno (Tablas 6 y 7). La Tabla 11 muestra claramente que la enzima que cataliza la Reacción 1 es específica para el aceptor endógeno, ya que no es capaz de transferir (^{14}C)Glucosa del UDP-(^{14}C)Glc al polisacárido agregado (no hay radioactividad en el precipitado de metanol del sobrenadante de TCA). Además, el

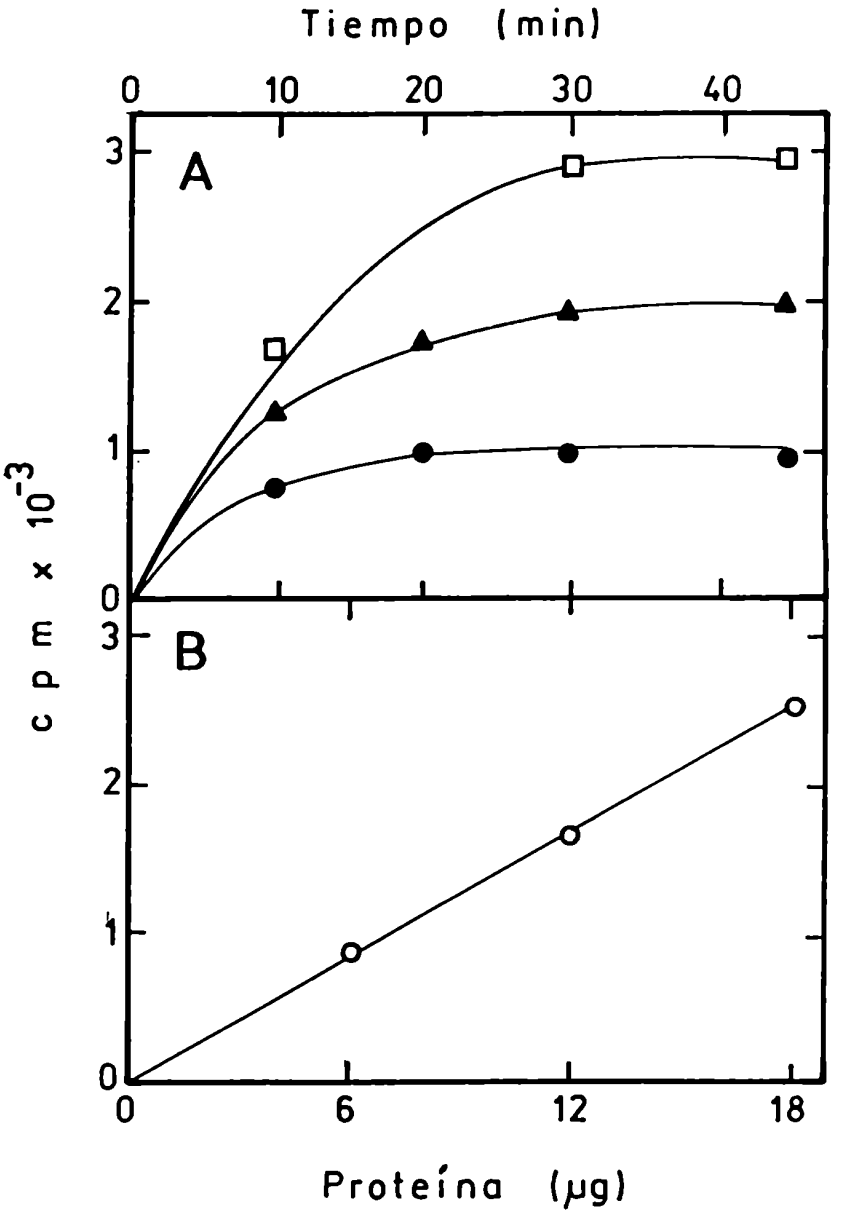


Fig. 14: Efecto del tiempo de incubación (A) y de la concentración de proteínas (B) sobre la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (Pico I). A: (-●-●-) 6 µg de proteínas, (-▲-▲-) 12 µg de proteínas, (-□-□-) 18 µg de proteínas. B: Tiempo de incubación, 10 minutos. Las demás condiciones experimentales se detallan en la Sección II.3.3. de Materiales y Métodos.

agregado de glucógeno no tiene ningún efecto sobre la incorporación de radioactividad a material precipitable por TCA. De estos resultados se deduce que el Pico I solo presenta actividad de la enzima que cataliza la Reacción 1 y no tiene actividad de almidón sintetasa dependiente de aceptor exógeno.

TABLA 11: Actividades de glucosiltransferasa en Pico I.

Dador de glucosa	Radioactividad precipitable por TCA cpm	por metanol cpm
Sin aceptor exógeno:		
UDP-(^{14}C)Glc 4 μM	2.803	35
ADP-(^{14}C)Glc 4 μM	50	30
(^{14}C)Glucosa-1-P 6 μM	65	29
Con aceptor exógeno:		
UDP-(^{14}C)Glc 4 μM	3.062	42
ADP-(^{14}C)Glc 4 μM	55	33
(^{14}C)Glucosa-1-P 6 μM	60	40

La mezcla de reacción (18 μg de proteínas de Pico I) fue incubada con los dadores de glucosa que se indican durante 60 minutos a 30°C. Como polisacárido aceptor exógeno se agregó 200 μg de glucógeno. El material radioactivo precipitable por TCA o por metanol luego de la precipitación con TCA fue medido como se describe en la sección II.9.3.1. de Materiales y Métodos.

III.3.3. Presencia de componentes glucosilados en el Pico I no involucrados en la actividad aceptora de la enzima.

Algunos autores (Frederick, 1971; Kamogawa y col., 1968) sugirieron que la síntesis *de novo* de uniones glucosídicas se llevaba a cabo porque la enzima que catalizaba dicha síntesis podría ser una glicoproteína, o tener un componente glucosídico contaminante como aceptor. Para descartar tal posibilidad, se sometió el Pico I de DEAE a cromatografía en columna de Concanavalina A Sepharosa. La figura 15 muestra el perfil de elución hallado. Se encontró que en el buffer de lavado se halla la actividad catalítica, en consecuencia, ni el aceptor ni la enzima presentan afinidad por la lectina inmovilizada. Ello indica que la enzima y el aceptor no poseen carbohidratos que sean reconocidos por la lectina (glucosa o manosa) o que, si están presentes, su configuración estérica impide la unión a la misma. Se analizaron alícuotas de las fracciones unidas y no unidas a la lectina (Fig. 15) mediante electroforesis en gel de acrilamida (10%) en presencia de SDS y urea. En la fracción que tiene afinidad por la lectina, se halló una banda mayoritaria PAS positiva (Fig. 15). Esta banda está ausente en los geles correspondientes a la fracción que

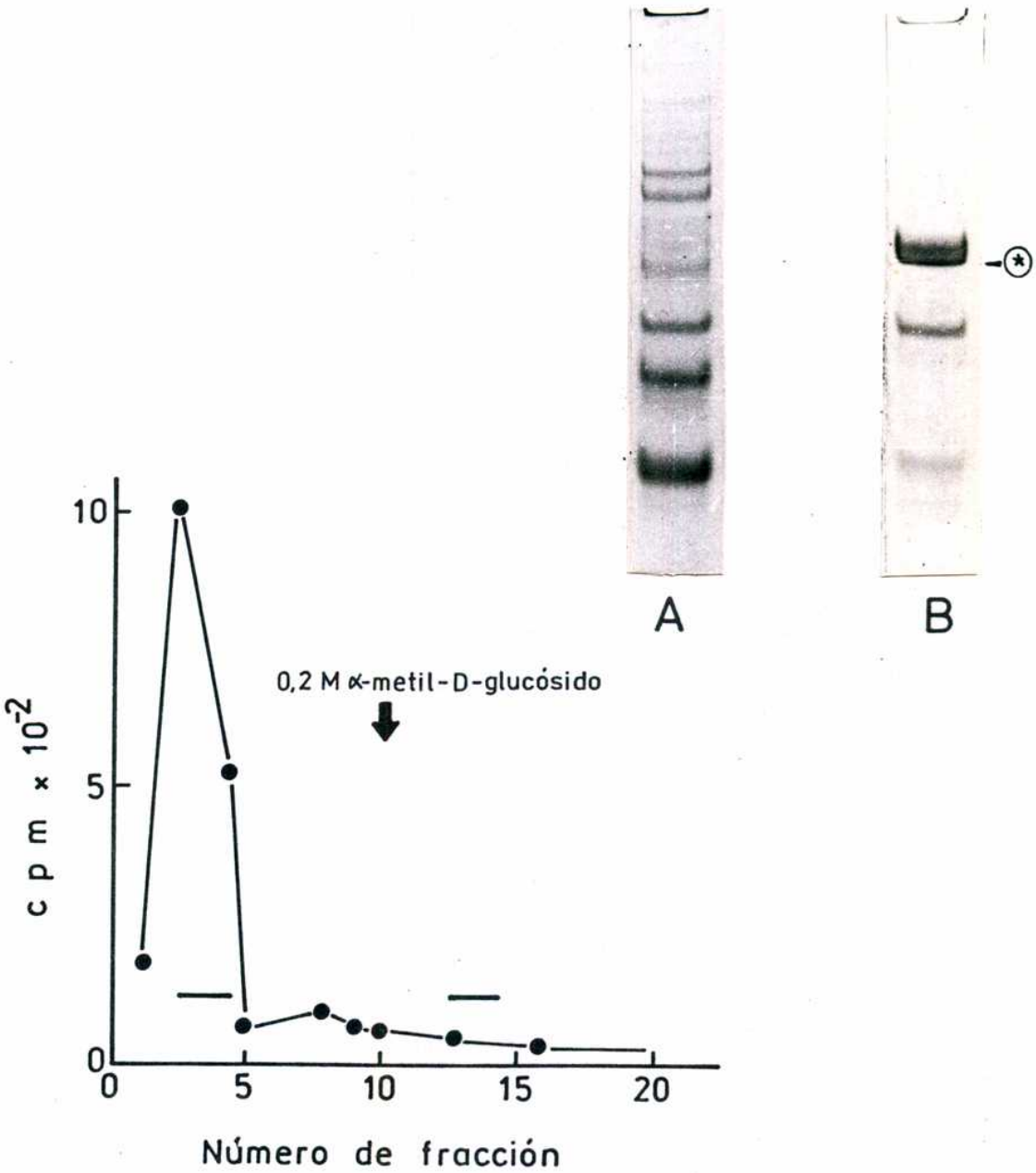


Fig. 15: Cromatografía de afinidad en columna de Concanavalina A Sepharosa. Se midió la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I en alícuotas de 150 µl. Las demás condiciones experimentales se indican en la Sección II.3.3. Fracciones 1-10: lavado de la columna con buffer A. Fracciones 11-20: eluídas por el agregado de 0,2 M α-metil-D-glucósido. Las fracciones indicadas por las barras fueron analizadas por electroforesis en gel de 10% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes y se muestran en el inserto superior. A: Fracciones no unidas; B: Fracciones unidas a la columna. Luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos con Coomasie brilliant blue.
(*) Banda PAS positiva.

no se une a la Con A-Sepharosa (y que tiene actividad enzimática); por consiguiente, la banda PAS positiva no está relacionada con la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I.

III.3.4. Determinación del radio de Stokes (a) por filtración en Sephacryl S-300.

La figura 16 muestra el perfil de elución del Pico I, cromatografiado en una columna de Sephacryl S-300. La actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I eluyó como un único pico con una constante K_{av} = 0,24 correspondiente a un radio de Stokes de 6,1. Las flechas indican la posición de los picos de elución de las proteínas marcadoras. En el pico con actividad catalítica, cocromatografían la enzima y el aceptor endógeno.

III.3.5. Determinación del coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}$) por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

Los estudios realizados hasta ahora (cromatografía en DEAE-celulosa, cromatografía de afinidad en Con A-Sepharosa y filtración en gel de Sephacryl S-300) mostraron que la actividad de la enzima que cataliza la Reacción 1 no se separa del aceptor endógeno. Con el objeto de estudiar: a) la posibilidad de separar el aceptor endógeno de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I, y

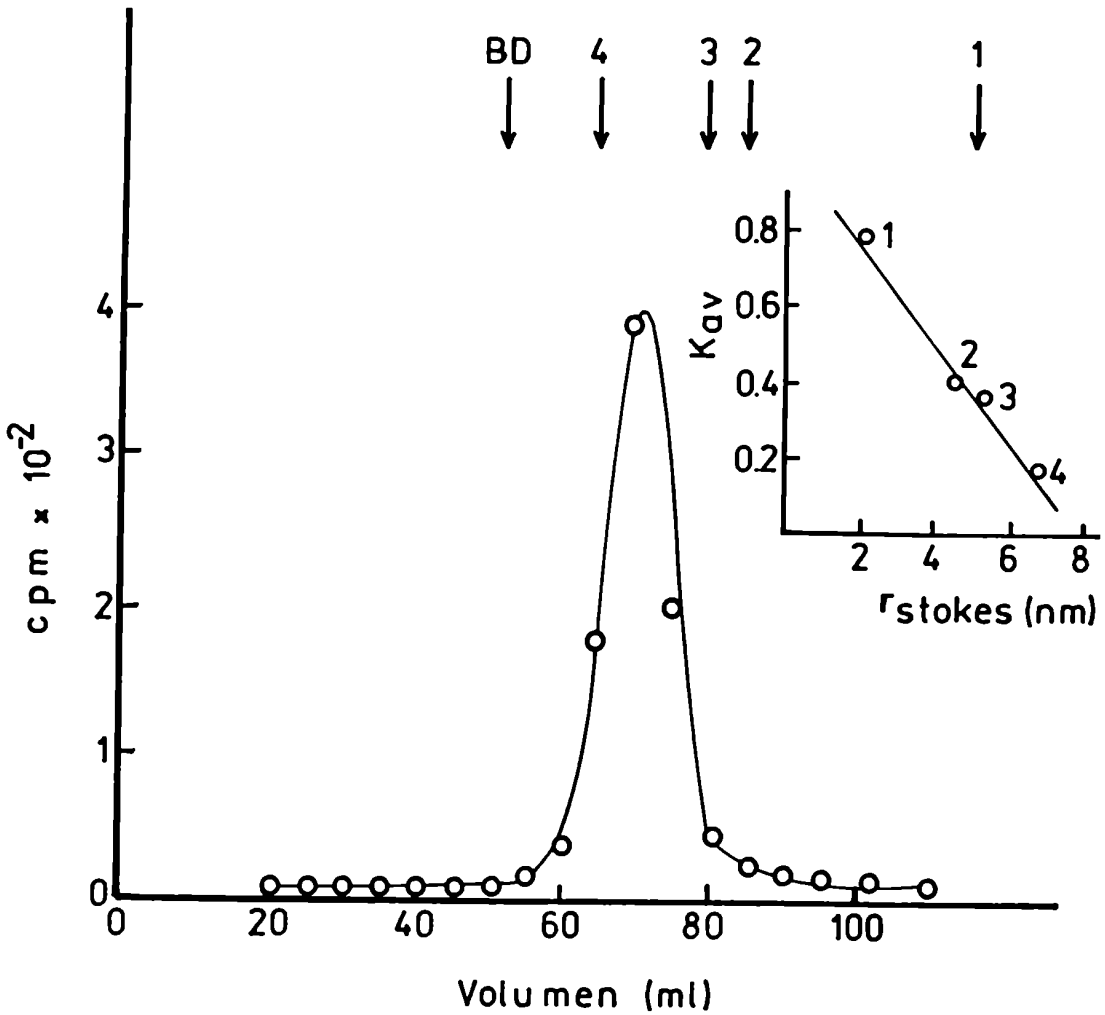


Fig. 16: Filtración en gel de Sephacryl S-300. El Pico I (0,5 mg de proteínas) se sometió a cromatografía en columna de Sephacryl S-300 como se describe en Materiales y Métodos. Se midió la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I en una alícuota de 200 µl de cada fracción. Las flechas indican las posiciones en que eluyen cada uno de los elementos marcadores usados: azul dextrano (BD); ß-galactosidasa (4), catalasa (3), fosfatasa (2) y citocromo C (1).

b) determinar si existe alguna relación entre el producto de la Reacción 1, la enzima y el aceptor, se sometieron el Pico I y la mezcla de reacción luego de incubar el Pico I con UDP-(^{14}C)Glc 4 μM a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

La figura 17 muestra el perfil de sedimentación de la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I y el perfil de radioactividad correspondiente al producto de la Reacción 1. En la misma figura se incluyen las curvas de calibración obtenidas con marcadores de coeficiente de sedimentación conocidos. Por interpolación en dicha curva de calibración se obtuvo un coeficiente de sedimentación $s_{20,w}$ = 10,3 S para la enzima que cataliza la Reacción 1.

Por otro lado, el producto radioactivo de la reacción 1 sedimenta en una zona del gradiente correspondiente a $s_{20,w}$ = 8.6 a 8.8 S. En este gradiente no se halló actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. Con el fin de analizar el perfil de proteínas de la zona del gradiente de 10,3 S y de 8,6-8,8 S, se sometieron a electroforesis en gel de 12,5% de acrilamida y los resultados se muestran en la figura 18. El perfil de proteínas que se obtuvo cuando se sometió la zona de 10.3 S del gradiente de sacarosa a electroforesis en las mismas

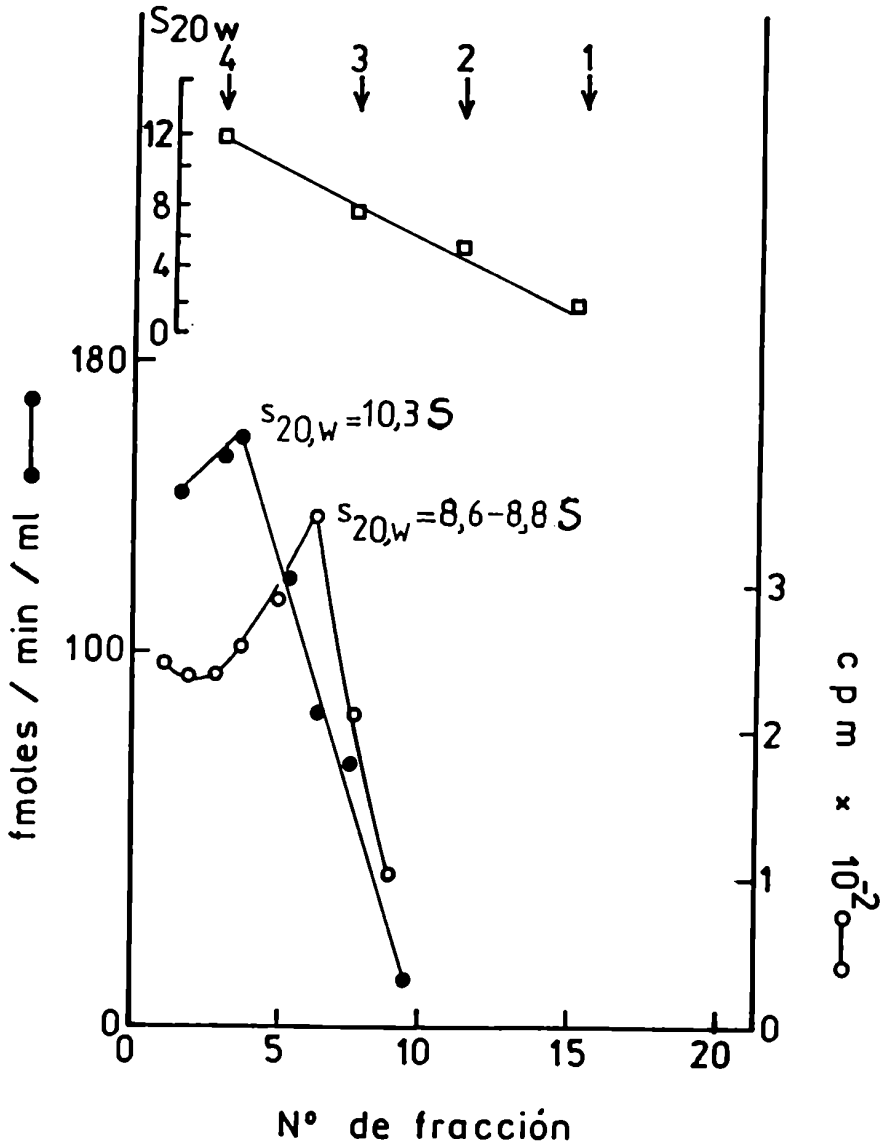


Fig. 17: Ultracentrifugación en gradientes de 5-20% de sacarosa. El Pico I, 200 µg de proteínas, y el producto de la Reacción 1 (2.000 cpm, mezcla de reacción luego de incubar 200 µg de proteínas del Pico I con UDP-(^{14}C)Glc 4 µM) fueron sometidos a ultracentrifugación en sendos gradientes de sacarosa. En cada una de las fracciones de los respectivos gradientes se midió la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (-•-•-) o la radioactividad en el material precipitable por TCA 10% (producto de la Reacción 1) (-o-o-). Las proteínas marcadoras son: 1, citocromo c; 2, fosfatasa alcalina; 3, lactato deshidrogenasa y 4, catalasa. Las demás condiciones se describen en la Sección II.8. de Materiales y Métodos.

condiciones se ilustra en la figura 18B. Se observan 4 bandas correspondientes a polipéptidos con pesos moleculares de: 96.000, 66.000, 58.000 y 38.000 dalton. Este último polipéptido no forma parte de la proteína nativa con actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I, como se vio en la figura 15 de la sección III.3.3. (banda PAS positiva). Además, cuando se sometió la fracción que no tiene afinidad por la Con A-Sepharosa (ver Fig. 15) a ultracentrifugación, se encontró que la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I sedimenta en la misma zona del gradiente de sacarosa (10,3 S) y presenta 3 bandas mayoritarias de 96.000, 66.000 y 58.000 dalton en gel de acrilamida. El perfil de proteínas que se obtiene cuando se somete la zona de 8,6-8,8 S del gradiente de sacarosa a electroforesis en gel de acrilamida (12,5%) se ilustra en la figura 18C. Se observan 3 bandas mayoritarias correspondientes a polipéptidos de 66.000, 58.000 y 38.000 dalton. La autorradiografía del gel mostró una banda de radioactividad de 38.000 dalton (Fig. 18D).

Los resultados expuestos en este apartado muestran que:

a) el aceptor endógeno no se separa de la enzima que cataliza la Reacción 1 por ultrafiltración en gradiente

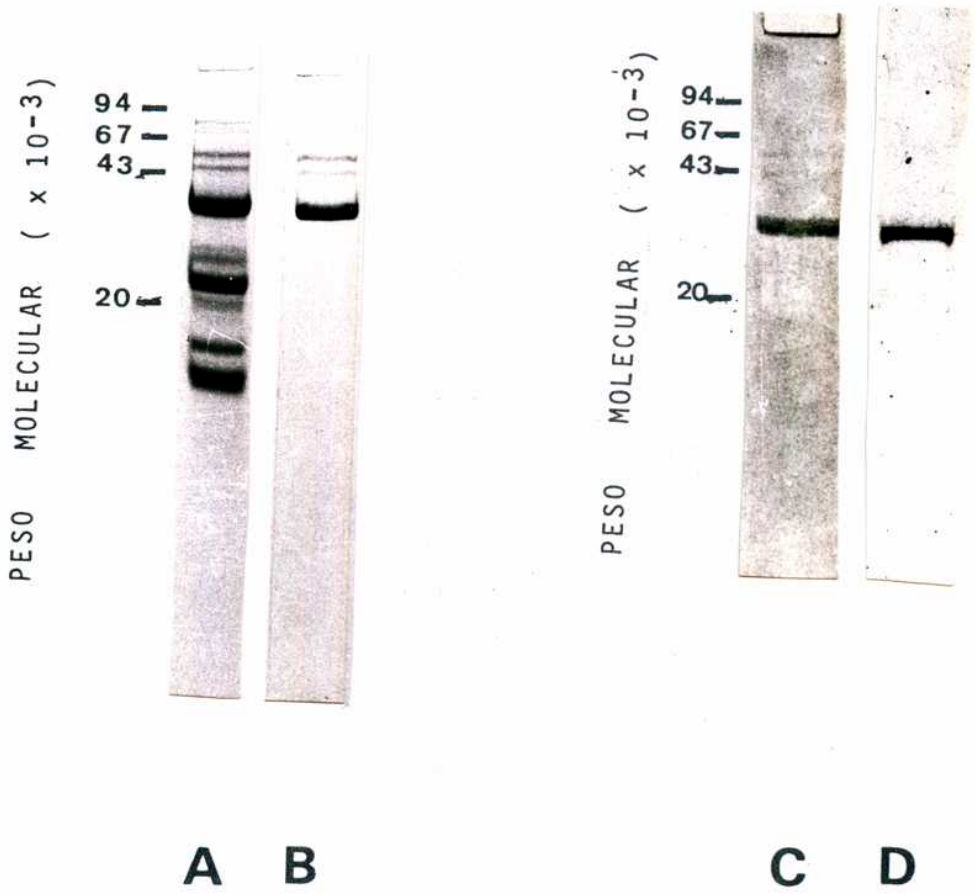


Fig. 18: Electroforesis en gel de 12,5% de acrilamida en condiciones disociantes. A, B y C: perfil de proteínas; D: fluorografía. A: Pico I (100 µg de proteínas), B: zona de 10,3 S del gradiente de sacarosa con actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I, C y D: zona de 8,6-8,8 S del gradiente de sacarosa correspondiente al producto radioactivo de la Reacción 1. Los demás detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos (Sección II.7.1.2.).

de sacarosa;

b) se hallan polipéptidos comunes a la zona del gradiente correspondiente a la actividad enzimática y a la del producto. Por otro lado, la banda de 38.000 está relacionada con el producto de la Reacción 1.

III.3.6. Cálculo del peso molecular.

Conociendo el valor del radio de Stokes y el coeficiente de sedimentación de la proteína enzimática, es posible estimar el peso molecular de ésta. El valor hallado calculado como se describió en Materiales y Métodos fue de 300.000 dalton. Además, se calculó un coeficiente friccional (f/fo) de 1,4 basándose en las fórmulas expuestas en la sección II.6.1.3. de Materiales y Métodos. En la Tabla 12 se resumen los parámetros hidrodinámicos de la enzima y peso molecular calculado.

TABLA 12: Propiedades físicas de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I.

Propiedades físicas	
Coeficiente de sedimentación $s_{20,w}$ (S)	10,3
Radio de Stokes, a (nm)	6,1
Volumen parcial específico, $\bar{v}$ (ml/g)	N.D. [a]
Peso molecular, PM (dalton)	300×10^3
Coeficiente friccional, f/f_0	1,4

[a]: N.D., no determinado. Se consideró un valor de $\bar{v}$: 0,74 ml/g para calcular el peso molecular.

III.4. Análisis de las enzimas presentes en los picos IIa y IIb.

La cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción solubilizada (Sección III.2.) mostró la existencia de más de una forma molecular de sintetasa y de fosforilasa medidas en presencia de aceptor exógeno. Este hecho sugería la posibilidad de que alguna de las formas de esas enzimas fueron capaces de utilizar como aceptor el producto de la Reacción 1 y catalizar la formación del α-1,4 glucano unido a proteína. Se estudiaron, entonces, las propiedades de las enzimas presentes en los picos IIa y IIb (almidón sintetasas y fosforilasas) para investigar posteriormente si alguna de las enzimas presentes en el Pico IIa o en Pico IIb tiene especificidad por el producto de la Reacción 1.

III.4.1. Fosforilasa: propiedades cinéticas.

La dependencia con el tiempo de incubación de la reacción catalizada por fosforilasa presente en los picos IIa y IIb se ilustra en la figura 19. La reacción de fosforilasa del Pico IIa, medida en ausencia de aceptor exógeno, presenta un período de latencia inicial (Fig. 19A). Dicho período podría corresponder al tiempo necesario para que se forme un aceptor más eficiente para que la reacción tenga lugar. Este resultado está de acuerdo

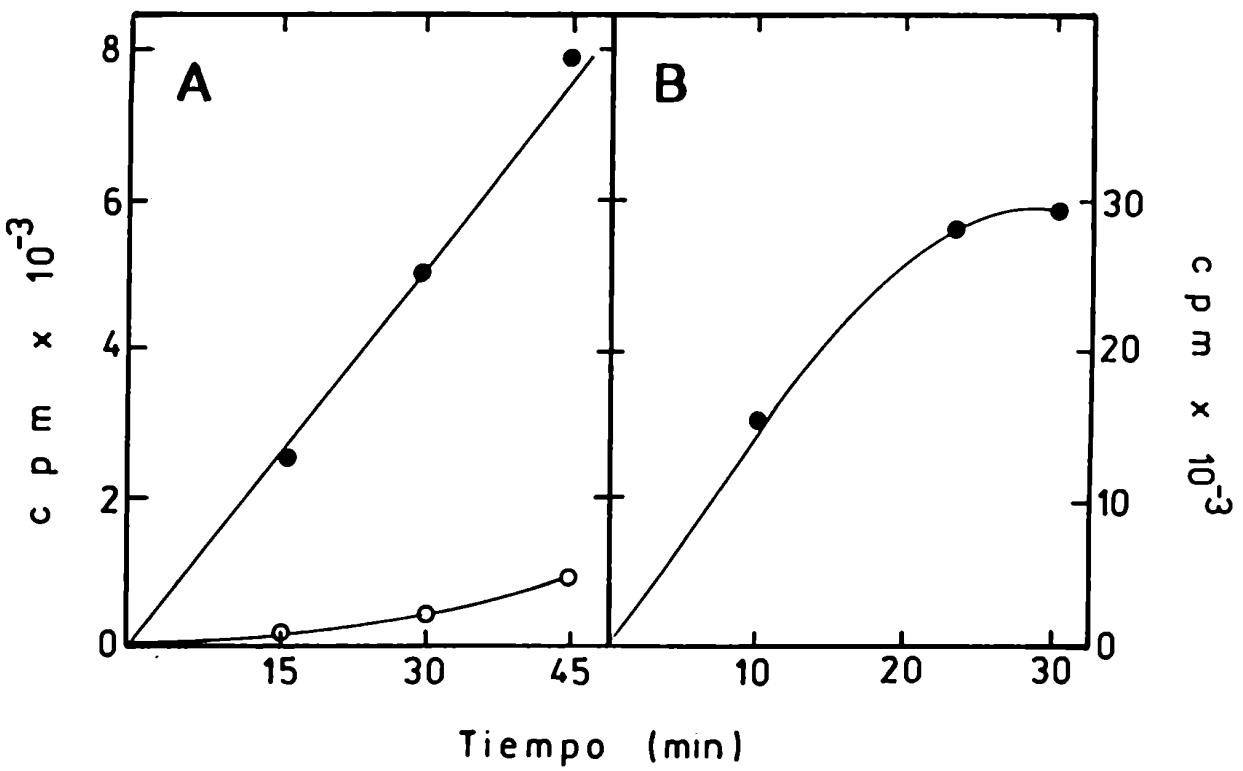


Fig. 19: Curva de tiempo de fosforilasa dependiente (-●-●-) e independiente (-o-o-) de aceptor exógeno. A: La mezcla de incubación contiene 4 µg de proteínas del Pico IIa. B: La mezcla de incubación contiene 6 µg de proteínas del Pico IIb. Se utilizó amilopectina (75 µg) como aceptor exógeno. A los tiempos indicados se mide la radioactividad incorporada al precipitado de TCA 10% (-o-o-) o al precipitado de metanol (-●-●-) como se describe en Materiales y Métodos.

con el encontrado por Sivak y col. (1980) para la fosforilasa independiente de aceptor exógeno de la fracción soluble de 140.000 x g de tubérculo de papa. En cambio, la actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno, presente en el Pico IIa (Fig. 19A) o en el Pico IIb (Fig. 19B), muestra una relación lineal con el tiempo de reacción.

III.4.2. Almidón sintetasa: propiedades cinéticas.

Cuando se estudió la dependencia con el tiempo de incubación de la reacción catalizada por UDP-Glc almidón sintetasa medida en presencia de aceptor exógeno para la enzima presente en el Pico IIa (Fig. 20A), se observó una relación lineal de la radioactividad incorporada a material insoluble en metanol-KCl hasta aproximadamente 45 minutos de incubación. La figura 20B muestra la dependencia con la cantidad de proteínas para la UDP-Glc almidón sintetasa presente en el Pico IIa. La radioactividad incorporada muestra una relación lineal hasta los 4,8 μg de proteínas.

La dependencia con el tiempo de la reacción catalizadas por UDP-Glc o ADP-Glc almidón sintetasa presentes en el Pico IIb se muestra en la figura 21. Se observa que la incorporación de radioactividad es prácticamente lineal hasta aproximadamente 20 minutos.

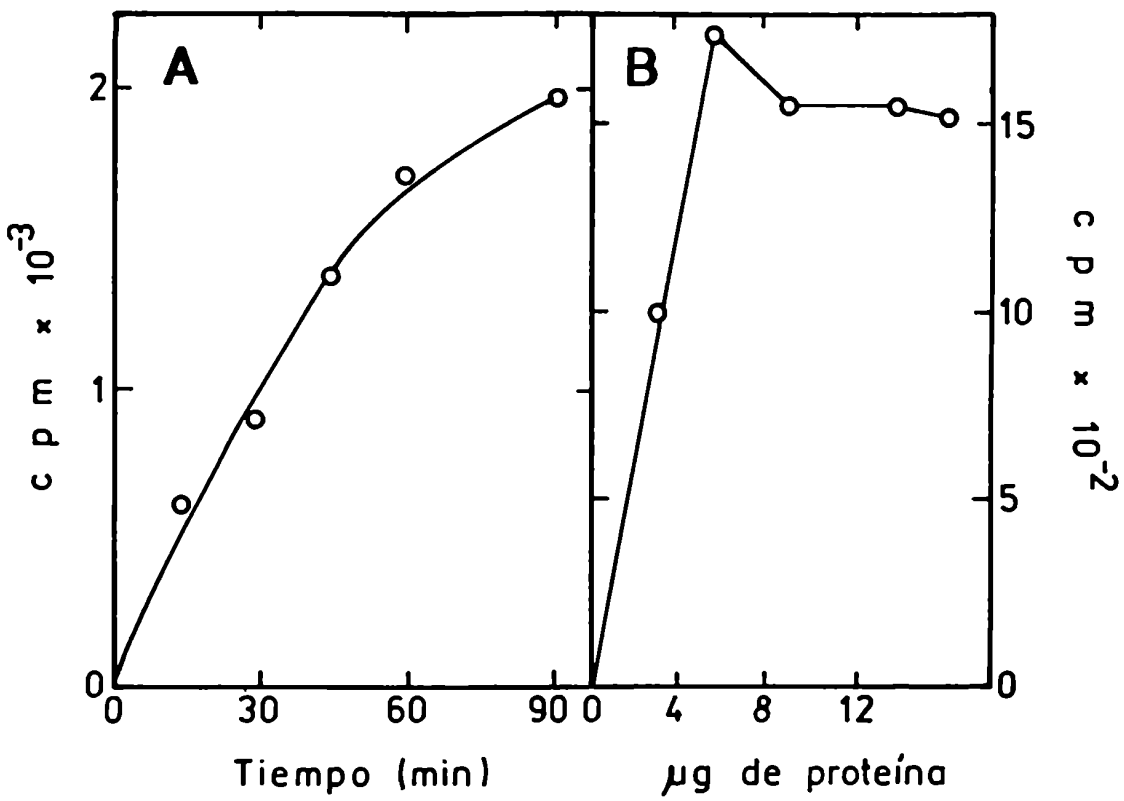


Fig. 20: Actividad de UDP-Glc: almidón sintetasa (Pico IIa) en función del tiempo de reacción (A) y de la concentración de proteínas (B). En (A) la mezcla de incubación contiene 5 µg de proteínas. En (B) el tiempo de incubación fue de 30 minutos. Las demás condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

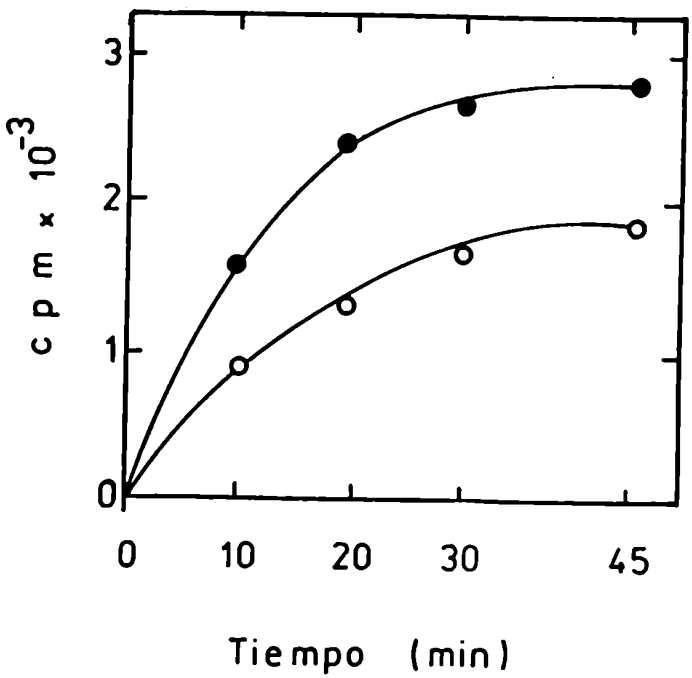


Fig. 21: Actividad de UDP-Glc almidón sintetasa (-o-o-) y ADP-Glc almidón sintetasa (-•-•-) (Pico IIb) en función del tiempo de reacción. La mezcla de incubación contiene 5 µg de proteínas.

III.4.3. Actividad de fosforilasa en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

Con el objeto de investigar la presencia de distintas formas de fosforilasa en los picos IIa y IIb, éstos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas. La figura 22 muestra los zimogramas obtenidos cuando se mide actividad de fosforilasa en ausencia y presencia de aceptor exógeno. Los zimogramas correspondientes al Pico IIa muestran una sola banda de actividad tanto cuando se ensaya en ausencia (Fig. 22A) como en presencia de aceptor exógeno (Fig. 22B). En cambio el Pico IIb mostró 2 bandas en presencia de aceptor exógeno, una de ellas con movilidad similar a la hallada en el Pico IIa y otra banda de menor movilidad electroforética (Fig. 22D). No se encontró actividad de fosforilasa en ausencia de aceptor exógeno en el Pico IIb (Fig. 22C).

III.4.4. Determinación del peso molecular de la subunidad de fosforilasa.

Con el fin de analizar la composición en subunidades de la banda de menor movilidad electroforética (Fig. 22D) y la de mayor movilidad (Fig. 22B y 22A), se cortaron las zonas del gel correspondiente a dichas actividades y se eluyó la proteína como se indica en

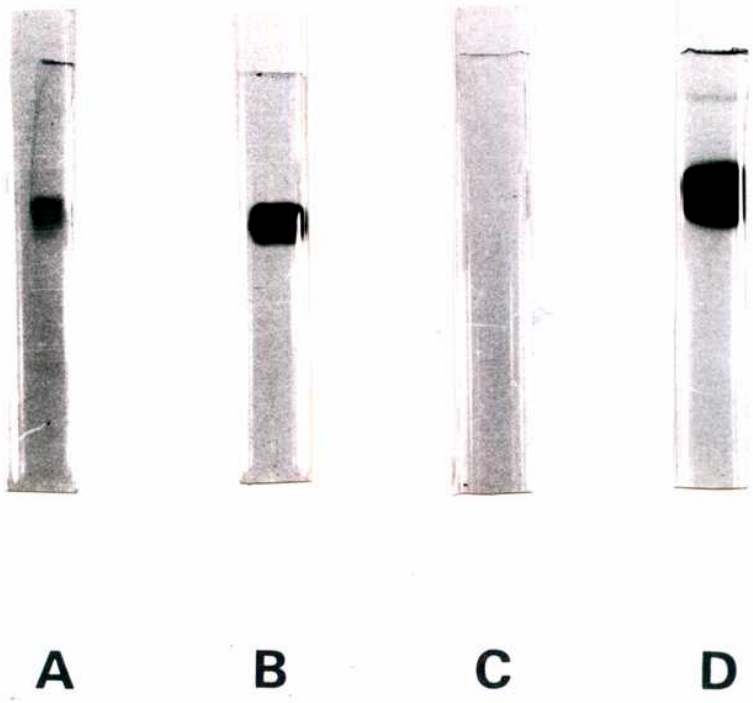


Fig. 22: Electroforesis en gel 7% de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Las muestras conteniendo 60 µg de proteínas del Pico IIa (geles A y B) y 40 µg de proteínas del Pico IIb (geles C y D) se sometieron a electroforesis, como se indica en Materiales y Métodos. Se localizó actividad de fosforilasa dependiente de aceptor (B y D) e independiente de aceptor (A y C).

Materiales y Métodos. Después de este tratamiento, la proteína eluída fue sometida a electroforesis en gel de acrilamida (10%) en presencia de SDS y urea.

Se encontró que las actividades de fosforilasa tenían una banda común correspondiente a un polipéptido de peso molecular 96.000 dalton (Fig. 23). Un resultado similar fue encontrado por Sivak y col. (1981) para la fosforilasa independiente de aceptor exógeno de la fracción soluble de 140.000 x g de tubérculo de papa.

III.4.5. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de los picos IIa y IIb.

Para ver si se pueden separar las actividades de fosforilasa presentes en el Pico IIa, se sometió esta fracción enzimática a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Los perfiles de sedimentación hallados se ilustran en la figura 24. En la misma figura se incluye la curva de calibración obtenida con marcadores de coeficiente de sedimentación conocidos. Se obtuvo un coeficiente de sedimentación de 8,2-8,4 S para ambas actividades de fosforilasa. Esta constante de sedimentación corresponde a un peso molecular de aproximadamente 190.000 para proteínas globulares. Las fosforilasas presentes en el pico IIa y en el IIb serían entonces dímeros formados por dos subunidades de 96.000 dalton. Aunque las

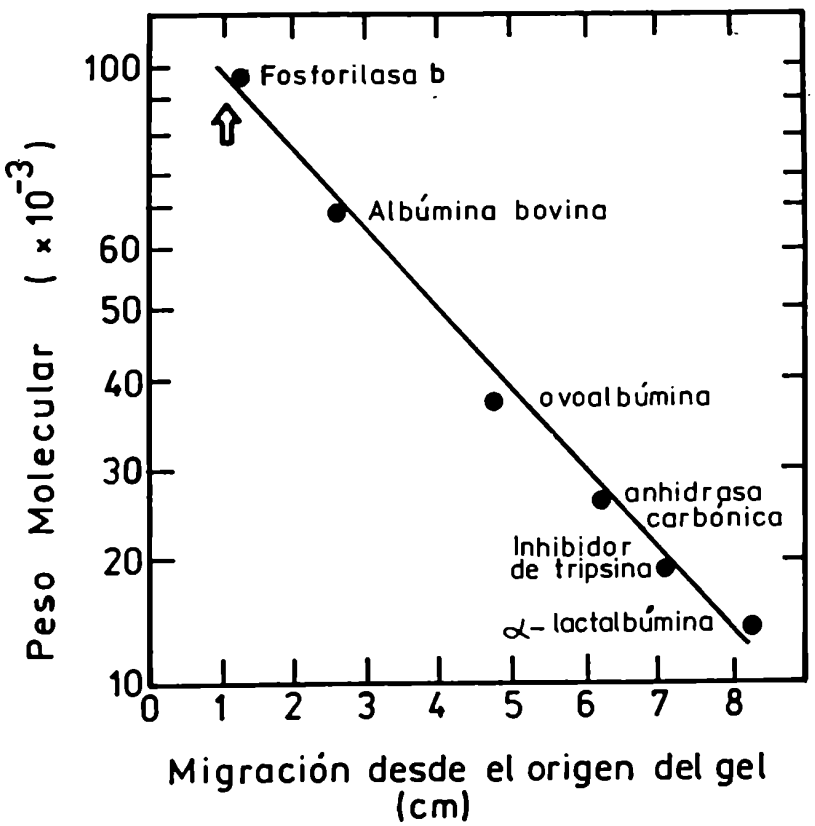


Fig. 23: Electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de SDS y urea. Fosforilasa eluída del gel (A) (Fig. 22) y fosforilasa de menor movilidad eluída del gel D (Fig. 22) fueron sometidas a electroforesis. El peso molecular de la subunidad de fosforilasa fue estimado de la curva de calibración que se obtuvo como se describe en Materiales y Métodos. La flecha indica la migración de las subunidades.

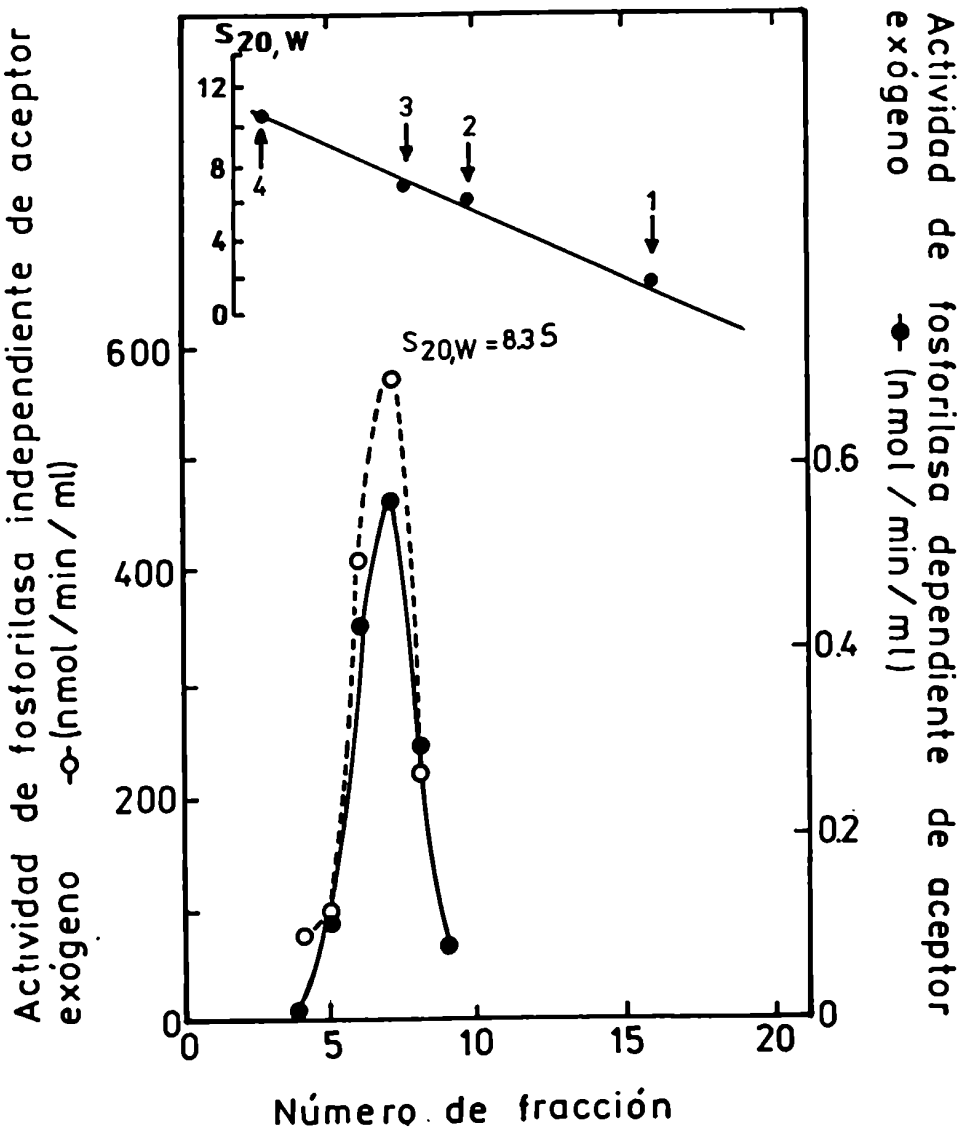


Fig. 24: Ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa. La muestra que contiene 80 µg de proteína del Pico IIa se sometió a ultracentrifugación en gradientes lineales de 5-10% de sacarosa, como se describe en Materiales y Métodos (Sección II.8.). Se midió la actividad en alícuotas de 20 µl de cada fracción. Los tiempos de incubación fueron de 90 minutos. Se insertan las curvas de calibración obtenidas representando la migración de los marcadores en función de sus coeficientes de sedimentación conocidos.

fosforilasas presentes en el Pico IIa no se pueden diferenciar por movilidad electroforética (Fig. 22A y B) o por gradiente de sacarosa presentan cada una de ellas propiedades cinéticas bien definidas (Fig. 19).

Como se mostró en la sección III.2., las actividades de almidón sintetasas cocromatografiaban con las actividades de fosforilasa, y en consecuencia también están presentes en los picos IIa y IIb. Por tal motivo se midieron dichas actividades en los gradientes de sacarosa. Se encontró que las actividades de almidón sintetasas no se separan por dicha técnica y, a su vez, ambas actividades (medidas con ADP-Glc o UDP-Glc) se hallan en la misma zona del gradiente (8,2-8,4 S) que las fosforilasas.

III.5. Reconstitución del sistema original de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína.

III.5.1. Experimentos de reconstitución.

En la sección III.2. se indicó que las enzimas que utilizan el producto de la Reacción 1 como aceptor se separaron de la enzima que cataliza la Reacción 1 mediante cromatografía en DEAE-celulosa. Por esta razón, la actividad de las enzimas que catalizan la Reacción 2, en ausencia de polisacárido exógeno, no se pueden medir

por falta del aceptor glucosilado sintetizado por la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (aceptor endógeno).

Con el objeto de: a) ver si se podía reconstituir el sistema original de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína y b) analizar si alguna de las enzimas alargadoras que catalizan la síntesis de uniones glucosídicas α-1,4, con polisacáridos exógenos como aceptor, puede utilizar el producto de la Reacción 1 como aceptor, se llevaron a cabo experimentos de reconstitución en dos etapas con las enzimas presentes en los picos I, IIa y IIb. En la primera etapa de la incubación, se formó el producto de la Reacción 1. Para ello se incubó UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (Pico I) con UDP-(^{14}C)Glc 4 μM como se describió en Materiales y Métodos. Luego de 30 minutos de incubación (segunda etapa), se agregaron Pico IIa ó Pico IIb como fuente de enzima, con los dadores de glucosa correspondientes a fosforilasa o almidón sintetasa en concentración milimolar, como se describe en la sección II.3.5. de Materiales y Métodos. En el experimento en el cual se agregó en la segunda etapa de la incubación, el Pico IIa y UDP-Glc 2 mM (Tabla 13), se halló un incremento de 50 veces en la incorporación de radioactividad con respecto a la obtenida durante la primera etapa de la incubación. El agre-

TABLA 13: Reconstitución del sistema de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína.

Agregados durante la segunda etapa		Radioactividad precipitable por TCA (cpm)
Fracción enzimática	Dador de glucosa	
		6.460 (13,3 pmol)
-----	UDP-Glc 2 mM	6.431
Pico IIa	------	6.510
Pico IIa	UDP-Glc 2 mM	9.332 (740 pmol)
Pico IIa	UDP-Glc 2 mM	125[a]
Pico IIa	------	140[a]

Se realizó una incubación en dos etapas. Durante la primera etapa se incubó el Pico I (20 μg de proteína) con UDP-(^{14}C)Glc 4 μM durante 30 min a 30°C. En la segunda etapa se reincubó durante 5 horas a 30°C con los agregados que se indican. Se detuvo la reacción como se describe en Materiales y Métodos.
[a] Se omitió durante la primera incubación Pico I.

gado de UDP-Glc 2 mM o el Pico IIa por separado no tuvo ningún efecto. Un experimento similar, realizado con el agregado de Pico IIb en la segunda etapa, no logró aumentar la radioactividad incorporada en el precipitado de TCA respecto de la obtenida durante la primera etapa de la incubación.

Otro experimento para formar el producto de la reacción completa se realizó agregando en la segunda etapa de la incubación ADP-Glc. En la primera etapa de la incubación se formó el producto de la Reacción 1, al igual que en el experimento anterior. En la segunda etapa de la incubación se agregó 3 mM de ADP-Glc y el Pico IIa o el Pico IIb. Se encontró que solamente el agregado de 3 mM ADP-Glc junto con el Pico IIa (Tabla 14) producían un incremento en la radioactividad incorporada con respecto a la obtenida durante la primera etapa de la incubación.

Posteriormente, se estudió la posibilidad de formación del producto de la reacción completa a partir de Glucosa-1-P en la segunda etapa de la incubación y Pico IIa ó Pico IIb. Se encontró que el agregado de Glucosa-1-P 4 mM y Pico IIa en la segunda etapa de la incubación, en presencia del Pico I en la primera etapa, producían un gran incremento en la radioactividad incorporada con respecto a la primera etapa de la incubación

TABLA 14: Reconstitución del sistema de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína.

Agregados durante la segunda etapa		Radioactividad precipitable por TCA (cpm)
Fracción enzimática	Dador de glucosa	
------	------	2.201
------	ADP-Glc 3 mM	2.250
Pico IIa	------	2.190
Pico IIa	ADP-Glc 3 mM	3.259
Pico IIa	ADP-Glc 3 mM	165[a]
Pico IIa	------	130[a]

La mezcla de reacción que contiene 20 μg de proteínas de Pico I se incubó, en la primera etapa, con UDP-(^{14}C)Glc 4 μM durante 30 minutos a 30°C. Durante la segunda etapa se reincubó durante 5 horas a 30°C con los agregados que se indican. Se detuvo la reacción como se describe en Materiales y Métodos.
[a] Se omitió durante la primera etapa de la incubación el Pico I.

(Tabla 15). Se incluyeron controles en los que se omitió el Pico I o el éster fosfórico. Se encontró que cuando se omite el Pico I, el Pico IIa incorpora (^{14}C)Glc a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 μM; dicha incorporación fue dependiente de la presencia del éster fosfórico en la mezcla de reacción (Tabla 15), condiciones bajo las cuales se forma el α-glucano producto de la fosforilasa independiente de aceptor que, a su vez, puede servir como aceptor para las sintetasas presentes en esta fracción. El Pico IIb, en la segunda etapa, no logró aumentar la radioactividad incorporada en el precipitado de TCA respecto de la obtenida durante la primera etapa.

III.5.2. Análisis de los productos sintetizados en los experimentos de reconstitución del sistema original por geles de poliacrilamida en condiciones disociantes.

Con el fin de analizar los productos sintetizados durante la reconstitución del sistema de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína, los productos radioactivos de los experimentos en dos etapas (ver III.5.1.) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y urea. La figura 25B muestra la fluorografía correspondiente al sistema reconstituído en el cual se agregó UDP-Glc como dador de

TABLA 15: Reconstitución del sistema de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína.

Agregados durante la segunda etapa		Radioactividad precipitable por TCA (cpm)
Fracción enzimática	Dador de glucosa	
------	------	2.129
------	Glucosa-1-P 4 mM	2.030
Pico IIa	------	2.051
Pico IIa	------	57[a]
Pico IIa	Glucosa-1-P 4 mM	4.110[a]
Pico IIa	Glucosa-1-P 4 mM	16.874

Se realizó una incubación en dos etapas: la primera etapa como se describió en la Tabla 13. En la segunda etapa se reincubó durante 5 horas a 30°C en presencia de buffer Mes 100 mM pH 5,7 con los agregados que se indican. Se midió la radioactividad incorporada al precipitado de TCA (ver Materiales y Métodos).

[a] Se omitió durante la primera etapa el Pico I.

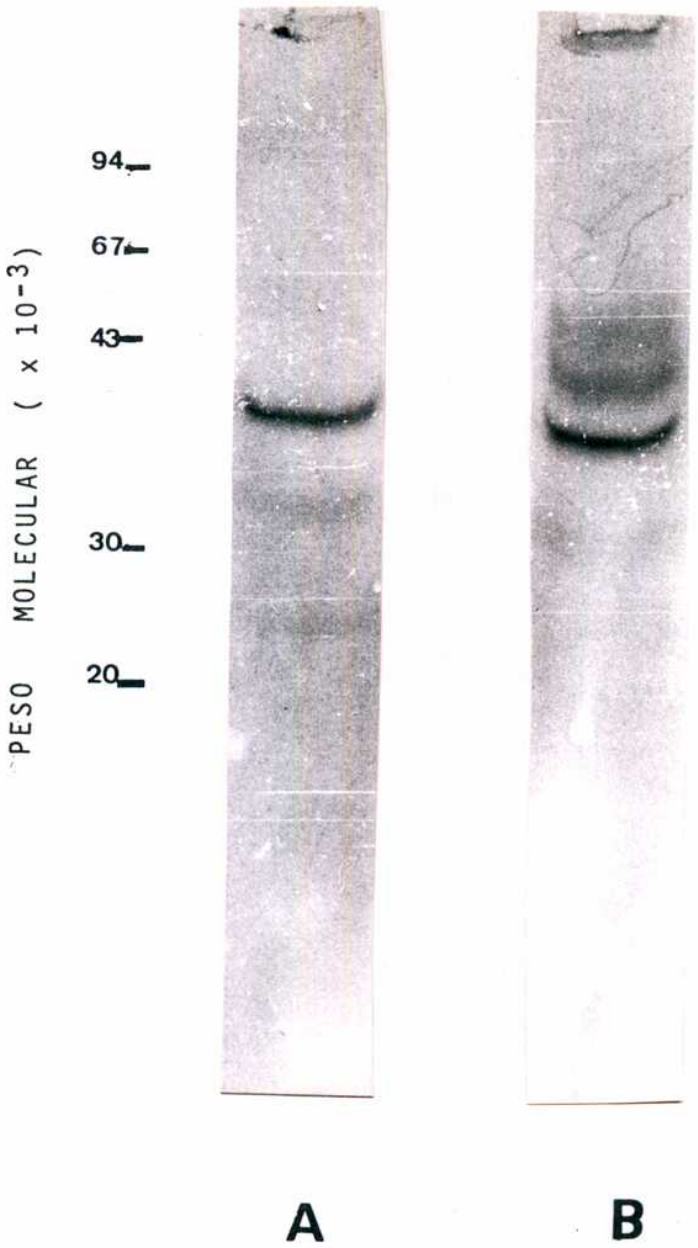


Fig. 25: Fluorografía luego de electroforesis en gel de 12,5% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las muestras que contienen (A) el producto radioactivo de la Reacción 1 obtenido con el sistema reconstituído (Tabla 13; 20 µg de proteínas, 13,3 pmoles de glucosa radioactiva incorporada al material precipitable por TCA 10%) y (B) producto radioactivo obtenido con el sistema reconstituído (70 µg de proteínas, 740 pmoles incorporados al material precipitable por TCA; Tabla 13).

glucosa durante la segunda etapa de la incubación (ver Tabla 13). Se observan, además de la banda de 38.000 dalton correspondiente al producto de la Reacción 1, dos bandas de mayor peso molecular.

La figura 26B muestra la autorradiografía correspondiente al producto sintetizado en los experimentos en dos etapas (ver Tabla 14) en presencia de Pico IIa y ADP-Glc 3 mM en la segunda etapa de la incubación. Se observan 3 bandas cuyas movilidades son similares a las de las bandas de la figura 25B.Los pesos moleculares aparentes de las bandas de mayor peso molecular de las figuras 25B y 26B determinados a 12.5% de acrilamida fueron 42.000 y 50.000 dalton aproximadamente.

La figura 27 muestra la autorradiografía obtenida luego de someter los productos radioactivos de la Tabla 17 a electroforesis en gel de 10% de acrilamida. Se encontró para el producto sintetizado en presencia de Pico IIa y Glucosa-1-P 4 mM en la segunda etapa, además de la banda correspondiente al producto de la Reacción 1, una banda ancha de peso molecular aparente de 70.000 dalton (Fig. 27B). El mismo producto sometido a electroforesis en gel de 12,5% de acrilamida mostró una banda ancha de peso molecular aparente de 50.000 dalton, además de la banda de 38.000 dalton.

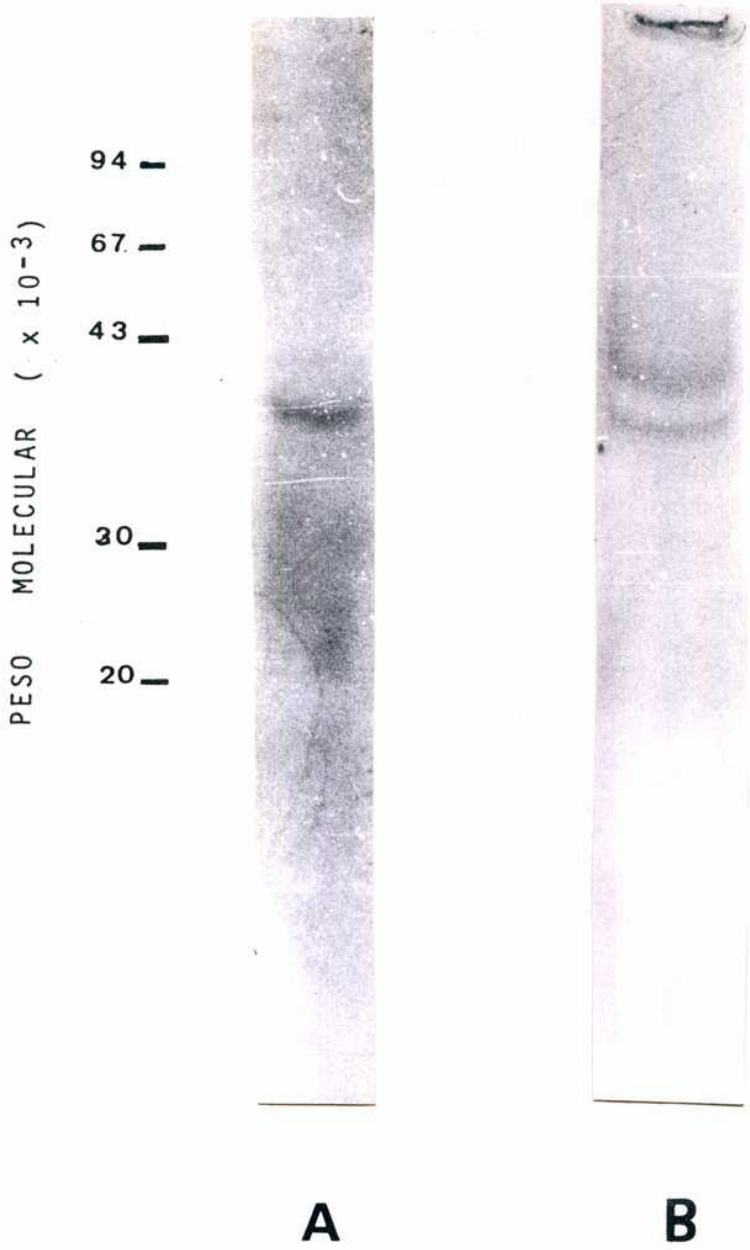


Fig. 26: Fluorografía luego de electroforesis en gel de 12,5% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. (A) producto de la Reacción 1 (Tabla 14; 20 µg de proteínas, 2.200 cpm); (B) producto radioactivo obtenido con el sistema reconstituído (Tabla 14; 70 µg de proteínas, 3.200 cpm incorporadas al precipitado de TCA).

Fig. 27: Fluorografía luego de electroforesis en gel de 10% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. (A) producto de la Reacción 1 (20 µg de proteínas, 2.100 cpm); (B) producto radioactivo obtenido con el sistema reconstituído (Tabla 15; 70 µg de proteínas, 16.000 cpm) en el cual se ensayó actividad de fosforilasa en presencia del producto de la Reacción 1 formado en la primera etapa de la incubación.

En la sección III.1.3.1. se había mostrado que el peso molecular de la banda radioactiva de 38.000 es independiente de la concentración de acrilamida usada. No ocurre lo mismo con las bandas radioactivas de menor movilidad, cuyos pesos moleculares aparentes son dependientes de la concentración de acrilamida (Fig. 25, 26, y 27). Se encuentra que el peso molecular de las bandas disminuye con el aumento de la concentración de acrilamida. Este comportamiento fue descripto por Segrest y col. (1971) para glicoproteínas conteniendo un alto porcentaje de hidratos de carbono. El grado de sobreestimación del peso molecular de la glicoproteína varía con el tamaño del poro del gel y al aumentar la concentración de acrilamida el peso molecular aparente se acerca asintóticamente al real (Segrest y col., 1971). Por esta razón, el peso molecular aparente determinado a 12,5% de acrilamida fue de 50.000 dalton y a 10% de acrilamida fue de 70.000 dalton, indicando que la glicoproteína sintetizada en los ensayos de reconstrucción contienen un alto porcentaje de hidratos de carbono.

Otro experimento que confirma que las enzimas presentes en el Pico IIa utilizan como aceptor el producto glucosilado sintetizado en la Reacción 1, fue el siguiente: el producto radioactivo sintetizado en presen-

cia del Pico I en la primera etapa de la incubación y Pico IIa y Glucosa-1-P en la segunda etapa de la incubación, como se describe en la Tabla 15, se sometió a electroforesis en gel de 10% de acrilamida en condiciones disociantes. Se cortó la zona del gel correspondiente a la glucoproteína sintetizada, ubicada por la aparición de una zona azul con el reactivo de iodo en una muestra corrida en paralelo y se eluyó, como se indica en la sección II.7.1.5. de Materiales y Métodos. Se eliminaron del producto radioactivo las cadenas glucosídicas α-1,4 sintetizadas en la segunda etapa por tratamiento con β-amilasa y se lo sometió luego a electroforesis en gel de 10% de acrilamida en condiciones disociantes. La fluorografía del gel mostró una banda cuyo peso molecular fue de aproximadamente 38.000 dalton (Fig. 28), indicando la utilización del producto de la Reacción 1 por fosforilasa y almidón sintetasa presentes en el Pico IIa.

Fig. 28: Fluorografía luego de electroforesis en gel de 10% de acrilamida en condiciones disociantes.
Banda radioactiva de 70.000 dalton eluída del gel y sometida a β-amilolisis. La electroforesis se desarrolló como se indica en la Sección II.7.1.2. Placa sobreexpuesta.

III.6. Determinación de la unión O-glicosídica.

Como se vió en la sección III.1.3., la labilidad al álcali bajo condiciones reductoras del producto de la Reacción 1 indicaba que se estaba ante un tipo de unión O-glicosídica entre la proteína y la glucosa. Sin embargo, es necesario el aislamiento de un glucopéptido pequeño o del glucosil-aminoácido para la identificación inequívoca del tipo de unión. Para ello, el producto radioactivo obtenido con Pico I, según se describiera en II.4.1. de Materiales y Métodos, fue sometido a proteólisis exhaustiva de acuerdo con el procedimiento expuesto en la sección correspondiente. El proteolizado fue sometido a cromatografía en columna de Sephadex G-15, en donde se obtiene un pico de radioactividad que se incluye. Las fracciones radioactivas de la columna se reunieron y se concentraron bajo N_2. Posteriormente se sometieron a electroforesis en papel empleando ácido fórmico 5%. La mayor parte de la radioactividad se encontró en un pico ancho que migró hacia el cátodo. Resultados similares se obtuvieron cuando se sometió el producto de la Reacción 1 de la fracción solubilizada a proteólisis (Tabla 8) y posterior electroforesis en papel (Fig. 10). Esta electroforesis elimina una cantidad

sustancial de péptidos no radioactivos. Se eluyó la radioactividad del papel, se concentró el material radioactivo y se trató con álcali en presencia de $B(^3H)_4Na$ y Cl_2Pd, como se describió en la sección II.5.2. de Materiales y Métodos.

La electroforesis en ácido fórmico 5% del material sometido a la reacción de β-eliminación mostró varios picos de radioactividad (Fig. 29). Dos picos de radioactividad (3 y 4) coincidieron con la movilidad de los aminoácidos α-aminobutírico y alanina respectivamente. Dichos aminoácidos son los que se forman por reducción del ácido 2-aminopropenoico y 2-aminobutenoico a partir de los residuos de serina y treonina involucrados en la unión glicopeptídica. Mientras que el ácido 2-aminopropenoico se reduce cuantitativamente para dar alanina, no ocurre lo mismo con el 2-aminobutenoico. Para que ocurra una reducción cuantitativa del último compuesto citado, la reacción de β-eliminación debe desarrollarse en presencia de Cl_2Pd-HCl. Durante este paso, se libera el hidrógeno y el paladio coloidal, los cuales parecen ser requeridos para la reducción catalítica del aminoácido no saturado (Dows y col., 1973). El Pico I de la figura 29, corrido en acetato de piridina pH 6.5 presentó compuestos con movilidad similar a la de los ácidos

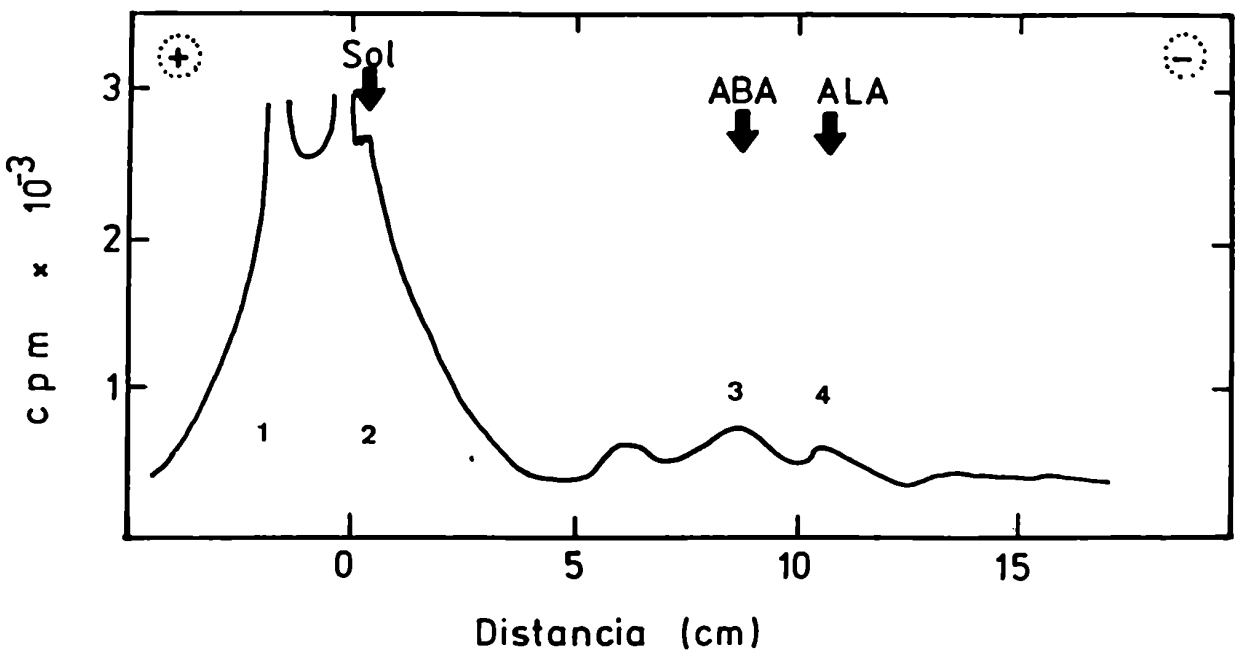


Fig. 29: Electroforesis en papel de productos obtenidos por tratamiento de β-eliminación. El desarrollo electroforético se efectuó durante 5 horas a 1.000 V en ácido fórmico 5% pH 2,5. Las demás condiciones de la electroforesis se indican en la Sección II.7.2.

sacarínicos. Dicho resultado era bastante predecible, ya que para poder identificar las pequeñas cantidades de aminoácidos tritiados formados durante el tratamiento de β-eliminación, se utilizó un $B(^3H)_4Na$ de muy alta radioactividad específica. Estas condiciones de fuerte alcalinidad y baja concentración de agente reductor favorecen la formación de productos de degradación alcalina como gliceraldehido y derivados carboxílicos conocidos como ácidos sacarínicos, al no alcanzar el agente reductor para estabilizar la conversión del grupo reductor del azúcar en la función alcohol (Sharon, 1975). Parte de la radioactividad presente en el pico 2 fue identificada como sorbitol mediante electroforesis en molibdato de Na pH 5, siendo muy probablemente los restantes picos de radioactividad productos de hidrólisis alcalina.

Para confirmar la identidad de los aminoácidos tritiados, se eluyó del electroforetograma (Fig. 29) la zona correspondiente a los aminoácidos alanina y α-aminobutírico y se sometieron a cromatografía en capa delgada. La figura 30 muestra el perfil de radioactividad obtenido luego de cromatografiar los picos 3 y 4 de la figura 29 en capa delgada. Se hallaron picos de radioactividad coincidentes con la movilidad de alanina (pico 4)

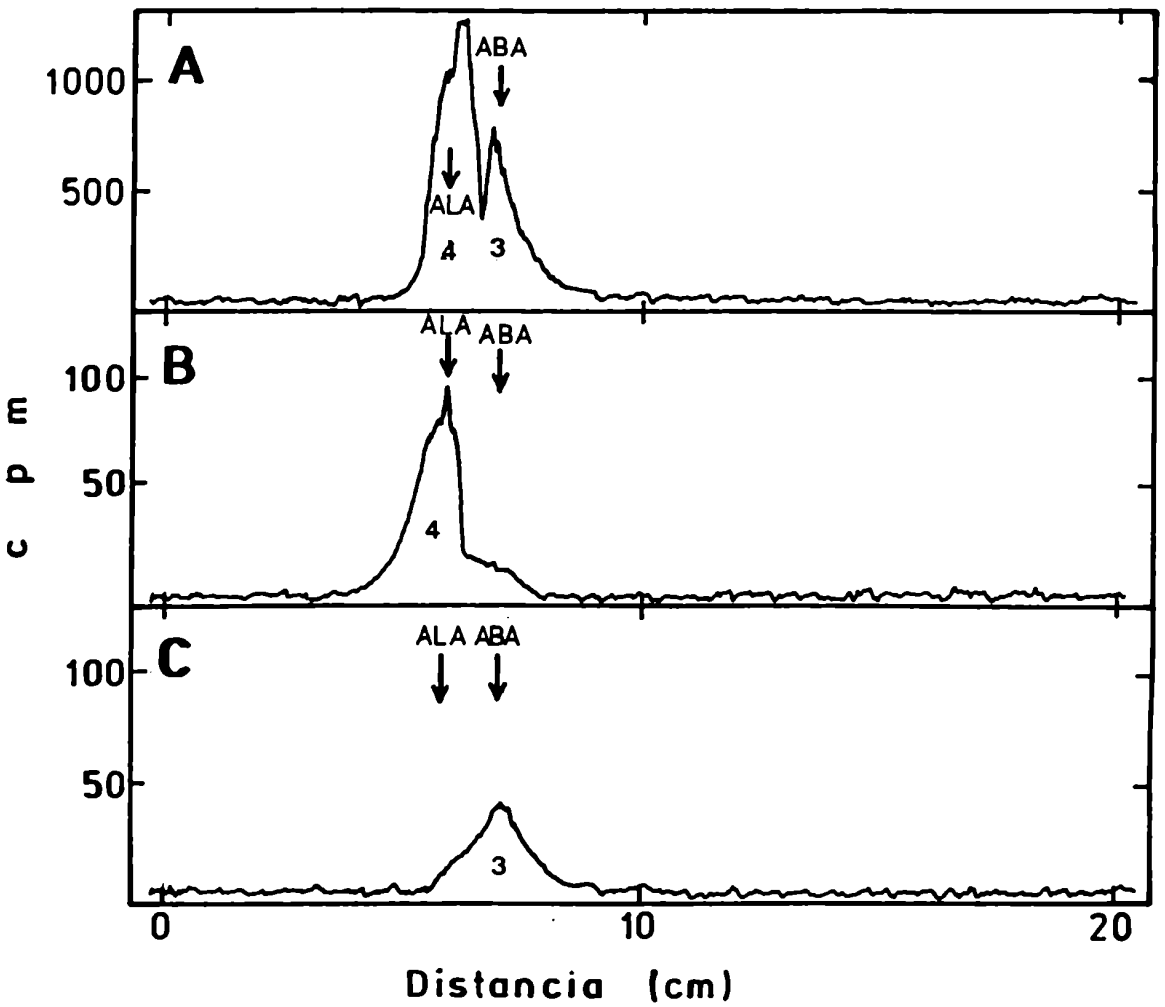


Fig. 30: Distribución de radioactividad luego de cromatografía en capa delgada de los picos 3 y 4 de la Figura 29. En (A) cromatografía en solvente D de los picos 3 y 4 eluídos del papel (Fig. 29). (B) cromatografía del pico 4 (eluído luego de cromatografía en capa delgada, Fig. 30A) en solvente C. (C) cromatografía del pico 3 (eluído luego de cromatografía en capa delgada, Fig. 30A) en solvente C.

y de α-aminobutírico (pico 3). Ambos picos de radioactividad fueron eluídos por separado, vueltos a cromatografiar en el mismo sistema. Este procedimiento se repitió varias veces. En la figura 30B y C se muestran los perfiles de radioactividad hallados en cada caso. La figura 30B muestra que la radioactividad proveniente del pico 4 estaba constituída principalmente por un pico cuya movilidad era coincidente con un standard externo de alanina. La figura 30C muestra que la radioactividad proveniente del pico 3 estaba constituída principalmente por un pico cuya movilidad era coincidente con un standard externo de α-aminobutírico.

El pico 4 de la figura 30B se eluyó y se sometió a cromatografía bidimensional en placa delgada; no se sometió el pico 3 de la figura 30C a cromatografía bidimensional en placa delgada debido a la baja recuperación del pico 3. En la figura 31 se muestra la autorradiografía luego de la cromatografía bidimensional en placa delgada. Se halló un solo componente radioactivo coincidente con la movilidad de alanina.

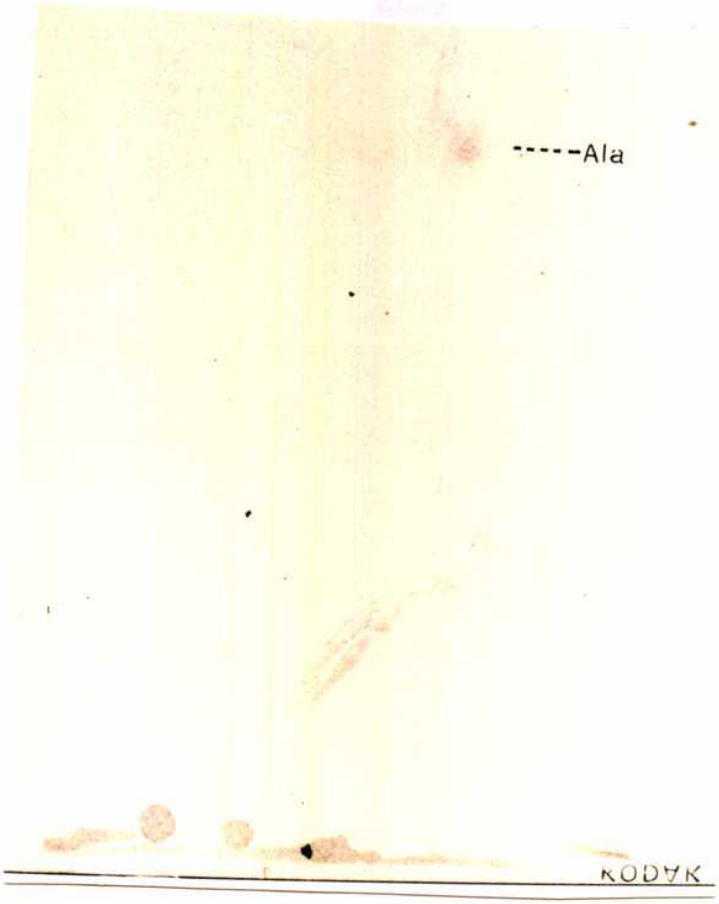


Fig. 31: Autorradiografía luego de cromatografía bidimensional del pico 4 eluído luego de la cromatografía en capa delgada, Fig. 30B.

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados descriptos en esta tesis indican que una fracción solubilizada de membranas de tubérculo de papa es capaz de sintetizar *in vitro* una glucoproteína que podría funcionar *in vivo* como intermediaria en la síntesis de almidón.

IV.1. Solubilización de la preparación de membranas.

Las glucosiltransferasas que catalizan la síntesis del glucano en ausencia de aceptor exógeno fueron liberadas de las membranas por aumento de la fuerza iónica del medio, sin el uso de detergentes que las desorganizan (Tabla 6). El alto contenido acuoso de los tubérculos de papa posibilitó la obtención de la fracción de membranas sin el agregado de buffer hasta la etapa de resuspensión de las membranas. La liberación de las actividades enzimáticas de éstas fue posible mediante el aumento de la fuerza iónica del buffer de resuspensión. Probablemente esas proteínas están asociadas a las proteínas o lípidos de las membranas por interacciones débiles del tipo no covalente y podrían considerarse operacionalmente como proteínas extrínsecas o periféricas (Singer y Nicolson, 1972; Singer, 1974). Entre éstas, se encuentra la espectrina, que puede ser separada de los eritrocitos

por agentes quelantes, y el citocromo C en las mitocondrias (Silman y Karlin, 1967) que es fácilmente extraído por una solución salina concentrada.

IV.2. Caracterización de las glucosiltransferasas y de los productos de reacción.

La fracción solubilizada exhibe diferentes actividades de glucosiltransferasa bajo condiciones experimentales diferentes. A concentraciones micromolares de UDP-Glc, la única actividad enzimática hallada es la UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. Dicha actividad cataliza la transferencia de glucosa específicamente del UDP-Glc a residuos de serina/treonina de una proteína aceptora endógena (Reacción 1). A concentración milimolar de dadores de glucosa como UDP-Glc, ADP-Glc y Glucosa-1-P glucosiltransferasas presentes en la preparación catalizan la síntesis de uniones glucosídicas α-1,4 en una estructura prácticamente lineal semejante a la de amilosa, utilizando el producto de la Reacción 1 como aceptor.

La cinética de la Reacción 1 sugiere la existencia de un número reducido de moléculas de aceptor en la preparación enzimática (Fig. 5A). Rodén y Schwartz (1975) sostienen que cuando se mide actividad de glucosiltrans-

ferasas de mamíferos que catalizan la transferencia de azúcares a aceptores endógenos, el dador de azúcar y los aceptores en los ensayos enzimáticos están usualmente en baja concentración. A diferencia de lo que ocurre en esos tejidos, en los cuales ambos sustratos de la reacción son limitantes, en el sistema que se describe aquí, el nucleótido dador de azúcar en la Reacción 1 está en exceso y la reacción es lineal hasta 350 ug de proteínas en 5 minutos de incubación (Fig. 5B).

El producto radioactivo de la Reacción 1, precipitable por TCA, es sensible a enzimas proteolíticas (Tabla 8). Después de proteólisis, el material radioactivo, ahora soluble en TCA, mostró un comportamiento anfotérico cuando se sometió a electroforesis en papel (Fig. 10) debido a que la glucosa radioactiva está unida a un aminoácido o a un péptido. Por otro lado, el producto radioactivo de la Reacción 1, sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y urea, presenta una banda radioactiva que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 38.000 dalton. Este es el polipéptido que se glucosila y que forma parte del producto de la Reacción 1. La glucoproteína sintetizada a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 μM es resistente al tratamiento con α o β-amilasa, y libera glucosa por acción de

amiloglucosidasa (Tabla 8). Es sensible al tratamiento alcalino bajo condiciones reductoras, que resulta en la formación de sorbitol(^{14}C) como único azúcar-alcohol. Este resultado indica que el producto de la Reacción 1 tiene una sola glucosa unida a la proteína aceptora a través de una unión O-glicosídica (Tabla 8).

El tratamiento alcalino en presencia de $B(^3H_4)Na$ permitió la identificación de serina y treonina como los aminoácidos del aceptor endógeno de la Reacción 1 involucrados en la unión glucosídica (Fig. 29 y 30). Es importante destacar que se describe aquí por primera vez la unión glicopeptídica glucosa-serina/treonina (unión O-glicosídica).

La cinética de incorporación de glucosa, a partir de los dadores de glucosa a concentración milimolar (Fig. 7, 8 y 9) presenta un período de "lag" después del cual la incorporación de radioactividad fue prácticamente lineal. Cinéticas similares fueron observadas con fosforilasa, que presenta actividad en ausencia de aceptor exógeno (Kamogawa y col., 1968; Sivak y col., 1981). Este período de "lag" en la incorporación de glucosa reflejaría el tiempo requerido por las transglucosilasas presentes en la preparación, para alargar suficientemente la cadena hidrocarbonada, unida a la proteína, que sirve así

de aceptor más eficiente. El producto radioactivo que se sintetiza bajo estas condiciones experimentales es sensible al tratamiento con α y β-amilasa (Tabla 8).

IV.3. Separación de las glucosiltransferasas solubilizadas.

IV.3.1. UDP-proteína transglucosilasa I.

La cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción solubilizada fue eficiente para separar la enzima que cataliza la Reacción 1 (UDP-Glc: proteína transglucosilasa I) de las otras glucosiltransferasas presentes en dicha fracción (Fig. 12 y 13). Este hecho posibilita realizar estudios de especificidad de aceptor de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I. Se encontró que en la fracción solubilizada la incorporación de radioactividad a material precipitable por TCA a partir de UDP-(^{14}C)Glc 4 μM (formación de producto de la Reacción 1) no es afectada por el agregado de glucógeno (Tablas 6 y 7) o amilopectina (dato no mostrado) a la mezcla de incubación. En la Tabla 13, se muestra claramente que la enzima que cataliza la Reacción 1 obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa, además de tener especificidad de dador de glucosa, es específica para el aceptor endógeno, ya que no es capaz de transferir (^{14}C)glucosa del UDP-(^{14}C)Glc 4

μM al polisacárido agregado. En consecuencia, como los aceptores exógenos no afectan tampoco la incorporación de radioactividad al material precipitable por TCA, se puede concluir que no compiten con el aceptor endógeno presente en la fracción solubilizada (Tabla 13). El Pico I no presenta actividad de almidón sintetasa dependiente de aceptor exógeno, ya que no se halla radioactividad precipitable por metanol en presencia de glucógeno en la mezcla de incubación (Tabla 13). Tampoco presenta actividad de las enzimas que sintetizan el α 1,4 glucano unido a proteína (Reacción 2), que requieren el producto de la Reacción 1 como aceptor.

El perfil de elución hallado luego de cromatografía en columna de Con A-Sepharosa del Pico I (Fig. 15) indica que ni el aceptor ni la enzima presentan afinidad por la lectina inmovilizada. En consecuencia, no poseen carbohidratos (glucosa o manosa) que sean reconocidos por la lectina o, si están presentes, su configuración estérica impide la unión a la misma. En la fracción que tiene afinidad por la lectina, se halló una banda mayoritaria PAS positiva que no está relacionada con la actividad de UDP-Glc: proteína transglucosilasa I (Fig. 15B). Luego de cromatografía en columna de Sephacryl S-300, la actividad de la enzima eluye con un

K_{av} = 0,24 correspondiente a un radio de Stokes de 6,1 nm (Fig. 16). En gradiente de sacarosa (Fig. 17) se encontró que la actividad enzimática sedimenta con un coeficiente de $s_{20,w}$ = 10,3 S. Estos resultados indican que la enzima que cataliza la Reacción 1 no se separa del aceptor endógeno después de cada paso de purificación empleado. Podría ocurrir que el aceptor y la enzima sean dos proteínas diferentes que copurifican en cada uno de estos pasos, o bien, que se tratara de una sola proteína con actividad enzimática y capacidad aceptora que se autoglucosila. Cuando se analiza el producto radioactivo de la Reacción 1 nativo, por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, se halla un coeficiente de sedimentación algo menor que el correspondiente a la enzima (Fig. 17). El producto radioactivo desnaturalizado presenta una banda radioactiva de aproximadamente 38.000 dalton de peso molecular; que es el polipéptido que se glucosila y que forma parte del producto de la Reacción 1 (Fig. 18). No se puede descartar un mecanismo de autoglucosilación de la misma proteína enzimática, la que una vez glucosilada no presenta más actividad de transferencia de glucosa. La glucosilación podría inducir algún cambio conformacional o algún tipo de procesamiento que podría explicar la disminución encontrada en el coeficiente de sedimentación

del producto de la Reacción 1 con respecto al de la enzima que cataliza dicha reacción.

Fredrick (1971), y Kamogawa y col. (1968) sugirieron que la síntesis de novo de uniones glucosídicas se llevaba a cabo porque la enzima que catalizaba dicha síntesis podría ser una glicoproteína o tener un componente glicosídico contaminante como aceptor. Los resultados obtenidos por cromatografía en Con-A Sepharosa (Fig. 15) y los análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida del producto de la Reacción 1 a distintas concentraciones de acrilamida (Fig. 11), unido al hecho que la glucosa se une directamente a la proteína (Fig. 30 y 31), estarían en contra de dicha hipótesis.

IV.3.2. Análisis de las enzimas presentes en los Picos IIa y IIb.

La cromatografía en columna de DEAE-celulosa mostró la existencia de más de una forma molecular de sintetasa y fosforilasa dependientes de aceptor exógeno (Pico IIa y Pico IIb; Figs. 12 y 13). La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (Fig. 22) permitió visualizar más de una forma molecular de fosforilasa, aunque por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa no se hallaron diferencias entre fosforilasas o

sintetasas de los picos IIa ó IIb. A su vez, las actividades de fosforilasa y sintetasa cosedimentan en el gradiente (Fig. 24). La conversión de ADP(UDP)-Glc a Glucosa-1-P a través de una pirofosforilasa (ver Sección I.3. de Introducción) fue descartada, ya que por incubación de los picos IIa o IIb con UDP-(^{14}C)Glc ó ADP-(^{14}C)Glc no se encontró formación del éster fosfórico (dato no mostrado).

IV.4. Reconstitución del sistema.

Los trabajos pioneros de Leloir y col. (1961) describen por primera vez la utilización de oligosacáridos de cadenas cortas por almidón sintetasas unidas al grano, sugiriendo así el rol predominante que podrían cumplir estas enzimas en los primeros estadios de síntesis del almidón. Posteriormente, algunos autores (Sección I.3.3. de Introducción) describieron la existencia de múltiples formas de almidón sintetasas solubles en hoja y en tejido de reserva, algunas de las cuales eran capaces de catalizar la síntesis de polisacáridos en ausencia de aceptor exógeno. En el sistema en estudio, las almidón sintetasas dependientes de aceptor exógeno presentan especificidad de sustrato similar a la de las almidón sintetasas unidas al grano, ya que tanto el ADP-Glc como

el UDP-Glc pueden ser dadores de glucosa.

Mediante los experimentos descriptos en las tablas 15, 16 y 17, se logró reconstituir el sistema original de síntesis del α-1,4 glucano unido a proteína. Se encontró que el agregado del Pico IIa en la segunda etapa de la incubación era capaz de incrementar la radioactividad en el precipitado de TCA con respecto a la obtenida durante la primera etapa (Tabla 15, 16 y 17); no se encontró ningún efecto con el agregado del Pico IIb. En consecuencia, solamente las almidón sintetasas y fosforilasas presentes en el Pico IIa tienen especificidad por el producto de la Reacción 1 como aceptor. Así, la proteína glucosilada (producto de la Reacción 1) sirve de aceptor para almidón sintetasas y fosforilasas presentes en el Pico IIa, que catalizan la síntesis de uniones glucosídicas α 1,4 con formación de glucoproteínas con un alto contenido de hidratos de carbono (Fig. 25, 26 y 27). Esto explica que el peso molecular aparente de estas glucoproteínas disminuya con el aumento de la concentración de acrilamida, ya que el peso molecular aparente determinado a 12,5% de acrilamida fue de 50.000 dalton y a 10% de acrilamida fue de 70.000 dalton aproximadamente.

El hecho que no se observe una disminución apreciable en la banda de 38.000 dalton concomitante con la

aparición de las bandas de menor movilidad electroforética en los experimentos de reconstitución sugiere que un número pequeño de moléculas del producto de la Reacción 1 es utilizado como aceptor por las enzimas presentes en el Pico IIa.

Whelan y Bailey (1954) encontraron que la fosforilasa de papa, con sustratos ineficientes como maltotriosa, posee un mecanismo de alargamiento del tipo "cadena única", es decir, que las moléculas fijadas a la enzima se alargan considerablemente antes de desprenderse, lo que da por resultado una mezcla de cadenas de largos muy distintos. En cambio, los sustratos eficientes, como maltopentaosa o amilopectina, se alargan mediante un tipo de "cadena múltiple", en que todas las moléculas de oligosacáridos o todas las cadenas exteriores se alargan a un ritmo igual, dando por resultado una familia de cadenas de largo homogéneo. Se podría explicar el hecho de que no se observe una disminución apreciable de radioactividad en la banda de 38.000 dalton a través de un mecanismo de alargamiento del producto de la Reacción 1 de "cadena única" por las enzimas presentes en el Pico IIa. Además, las glucoproteínas sintetizadas en los ensayos de reconstitución serían heterogéneas en tamaño, ya que presentan bandas anchas y

difusas en la fluorografías (Fig. 27).

Se confirmó la utilización del producto de la Reacción 1 por las enzimas presentes en el Pico IIa (Fig. 27) por tratamiento con β-amilasa de la cadena glucosídica de la glucoproteína sintetizada con el sistema reconstituído (Fig. 28). La fluorografía luego de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y urea (Fig. 28) de la glucoproteína mostró una banda de peso molecular de aproximadamente 38.000 dalton, después del tratamiento amilolítico. En consecuencia, el polipéptido de 38.000 dalton que forma parte del producto de la Reacción 1 está formando parte también de la glucoproteína sintetizada en el ensayo de reconstitución. Esto confirma que las enzimas que catalizan la Reacción 2 presentes en el Pico IIa, utilizan el producto de la Reacción 1 como aceptor.

V. REFERENCIAS

- Aminoff, D., Gathmann, W.D., McLean, M. y Yadomae, T. (1980) Anal.Biochem. 104, 44-53.
- Aubert, J.P., Biserte, G. y Loucheux-Lefebure, M.H. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 175, 410-418.
- Bailey, J.M. y Whelan, W.J. (1961) J.Biol.Chem. 236, 969.
- Banks, W. y Muir, D.D. (1980) En: The Biochemistry of Plants. Vol. 3. Carbohydrates: Structure and function (J. Preiss, Ed.), Academic Press, pag. 321-369.
- Barengo, R. y Krisman, C.R. (1978) Biochim.Biophys. Acta 540, 190-196.
- Bassham, J.A. y Krause, G.H. (1969) Biochim.Biophys. Acta 189, 207-221.
- Baxter, E.D. y Duffus, C.M. (1971) Phytochemistry 10, 2641-2644.
- Baxter, E.D. y Duffus, C.M. (1973) Phytochemistry 12, 2321.
- Behrens, N.H. y Leloir, L.F. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 66, 153.
- Berthillier, G., Azzar, C.G.J. y Got, R. (1975) Eur.J. Biochem. 51, 275-282.
- Borovsky, D., Smith, E.E. y Whelan, W.J. (1975a) Eur.J. Biochem. 59, 615-625.

- Bray, G. (1960) Anal.Biochem. 1, 279.
- Cardini, C.E. (1966) Ciencia e Investigación 22, 12, 531-549.
- Cardini, C.E. y Frydman, R.B. (1966) Methods in Enzymol. 8, 387.
- Cardini, C.E., Leloir, L.F. y Chiriboga, J. (1955) J. Biol.Chem. 214, 148-155.
- Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini, C.E. y Paladini, A.C. (1950) J.Biol.Chem. 184, 333-350.
- Cohn, M. (1961) En: The Enzymes (2a. Edición), Vol. 5 (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K., Eds.), Academic Press, N.Y. y Londres, pag. 179-206.
- Chamberlain, J.P. (1979) Anal.Biochem. 98, 132-135.
- Davis, B.J. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 104.
- de Fekete, M.A.R. y Cardini, C.E. (1964) Arch.Biochem. Biophys. 104, 173-184.
- de Fekete, M.A.R., Leloir, L.F. y Cardini, C.E. (1960) Nature 187, 918.
- Dickinson, D.B. y Preiss, J. (1969a) Arch.Biochem. Biophys. 130, 119-128.
- Drummond, G.S., Smith, E.E. y Whelan, W.J. (1972) Eur. J.Biochem. 26, 168-176.
- Espada, J. (1962) J.Biol.Chem. 237, 3577.
- Feingold, D.S., Neufeld, E.F. y Hassid, W.Z. (1958) J.

Biol.Chem. 233, 783-788.

- Fredrick, J.F. (1971) Physiol.Plantarum 25, 32.
- French, D. (1960) En: The Enzymes (2a. Edición), Vol. 4A (Boyer, P.D., Lardy, H. y Myrbäck, K., Eds.), Academic Press, Nueva York y Londres, pag. 345.
- French, D. (1975) En: M.T.P. Int.Rev.Sci.Biochem.Ser. One Biochemistry of Carbohydrates (Whelan, W.J., Ed.), Vol. V, Butterworths Univ. Park Press, Londres, p. 267.
- Frydman, R.B. y Cardini, C.E. (1966) Arch.Biochem. Biophys. 116, 9-18.
- Frydman, R.B. y Cardini, C.E. (1967) J.Biol.Chem. 242, 312-317.
- Gallant, D. y Guilbot, A. (1969) Stärke 21, 156-163.
- Gallant, D., Degrois, M., Sterling, C. y Guilbot, A. (1972) Stärke 24, 116-123.
- Ghosh, H.P. y Preiss, J. (1965) Biochemistry 4, 1354.
- Ghosh, H.P. y Preiss, J. (1966) J.Biol.Chem. 241, 4491-4505.
- Green, J.R. y Northcote, D.H. (1978) Biochem. J. 170, 599-608.
- Greenwood, C.T. (1956) Adv.Carbohyd.Chem. 11, 335.
- Hanes, C.S. (1937) New Phytol. 36, 189.
- Hanes, C.S. (1940) Proc.Roy.Soc. London Ser. B. 128, 421-450.

- Hanover, J.A. y Lennarz, W.J. (1981) Arch.Biochem. Biophys. 211, 1-19.
- Heber, U. y Santarius, K.A. (1965) Biochim.Biophys.Acta 109, 390-408.
- Heldt, H.W., Chon, CH.J., Maronde, D., Herold, A., Stankovic, Z.S., Walker, D.A., Kraminer, A., Kirk, M.R. y Herer, U. (1977) Plant.Physiol. 59, 1146-1155.
- Herth, W., Franke, W.W., Stadler, J.S., Bittiger, H., Keilich, G. y Brown, R.M. (1972) Planta 105, 79-92.
- Hopp, H.E. (1977) Tesis doctoral.
- Illingworth, B., Brown, D.H. y Cori, C.F. (1961) Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 47, 469.
- Isbell, H.S. (1943) Ann.Rev.Biochem. 12, 215.
- Kainuma, K. y French, D. (1971) Biopolymers 10, 1673-1681.
- Kamogawa, A., Fukui, T. y Nikumi, Z. (1968) J.Biochem. 63, 361.
- Kjolberg, O. y Manners, D.J. (1963) Biochem. J. 86, 258.
- Kjosbakken, J. y Colvin, J.R. (1975) Can.J.Microbiol. 21, 111-120.
- Krisman, C.R. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 46, 1206-1212.
- Krisman, C.R. (1973) Ann.N.Y.Acad.Sci. 210, 81-89.

- Krisman, C.R. y Barengo, R. (1975) Eur.J.Biochem. 52, 117-123.
- Kuhn, R. y Löw, I. (1941) Chem.Ber. 74, 219.
- Lamport, D.T.A. (1980) En: THe Biochemistry of Plants, Vol. 3, Carbohydrates: Structure and Function (J. Preiss, Ed.), Academic Press, Nueva York y Londres, pag. 501-541.
- Lamport, D.T.A., Katona, L. y Roerig, S. (1973) Biochem. J. 133, 125-131.
- Lavintman, N. (1966) Arch.Biochem.Biophys. 116, 1-8.
- Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1968) Plant and Cell Physiol. 9, 587-592.
- Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1972) En: Biochemistry of the Glycosidic Linkage (Piras, R. y Pontis, H.G., Eds.), Academic Press, Nueva York, pag. 503.
- Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1973) FEBS Lett. 29, 43-46.
- Lavintman, N. y Krisman, C.R. (1964) Biochim.Biophys. Acta 89, 193-196.
- Lavintman, N., Tandecarz, J.S., Carceller, M., Mendiara, S. y Cardini, C.E. (1974) Eur.J.Biochem. 50, 145-155.
- Lee, Y.P. (1960a) Biochim.Biophys.Acta 43, 18.
- Lee, Y.C. y Scocca, J.R. (1972) J.Biol.Chem. 247,

5753-5758.

- Leloir, L.F. y Cardini, C.E. (1962) En: The Enzymes, 2a. Edición, Tomo 6, 317-325, Academic Press, Nueva York.
- Leloir, L.F., de Fekete, M.A.R. y Cardini, C.E. (1961) J.Biol.Chem. 236, 636-641.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265.
- Manners, D.J., Rowe, J.J.M. y Rowe, K.L. (1968) Carbohydr.Res. 8, 72-81.
- Maréchal, L.R. y Goldemberg, S.H. (1964) J.Biol.Chem. 239, 3163-3167.
- Markovitz, A. y Dorfman, A. (1962) J.Biol.Chem. 237, 273-279.
- Matheson, N.K. y Richardson, R.H. (1976) Phytochem. 15, 887.
- Mellis, S.J. y Baenziger, J.U. (1983) J.Biol.Chem. 258, 11557-11563.
- Montreuil, J. (1975) Pure Appl.Chem. 42, 431.
- Moreno, S. y Tandecarz, J.S. (1982) FEBS Lett. 139, 313-316.
- Murata, T., Suziyama, T. y Akazawa, T. (1965) Biochem. Biophys.Res.Commun. 18, 371-376.
- Neuberger, A., Gottschalk, A., Marshall, R.D. y Spiro,

R.G. (1972) En: Glycoproteins: Their composition, structure and function (Gottschalk, A., Ed.) 2a Edición, pag. 450-490, Elsevier, Amsterdam.

- Nomura, R., Nakayama, N., Murata, T. y Akazawa, T. (1967) Plant Physiol. 42, 327.
- Ornstein, L. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321.
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S. y Preiss, J. (1971a) Biochem. Biophys.Res.Commun. 43, 631-636.
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S. y Preiss, J. (1971b) Plant Physiol. 48, 765-769.
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S. y Preiss, J. (1972) Biochem. J. 126, 953-963.
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S, Greenberg, E., Lammel, C., Preiss, J. y Lee, E.Y.C. (1973) Plant Physiol. 51, 1-5.
- Pazur, J.H. (1965) En: Starch: Chemistry and technology, (Whistler, R.L. y Paschall, E.F., Eds.), Vol. 1, Academic Press, Nueva York y Londres, pag. 133-171.
- Peterson, E.A. y Sorber, H.A. (1962) En: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O., Eds.), Vol. 5, Academic Press, Nueva York, pag. 6.
- Pisigan, R.A. y Del Rosario, E.J. (1976) Phytochem. 15, 71-73.
- Preiss, J. y Kosuge, T. (1970) Ann.Rev.Plant.Physiol. 21, 433-466.

- Preiss, J. y Levi, C. (1980) En: The Biochemistry of plants (Preiss, J., Ed.), Vol. 3, Academic Press, Nueva York, pag. 371-423.
- Randerath, K. (1970) Anal.Biochem. 34, 188-205.
- Recondo, E. y Leloir, L.F. (1961) Biochem.Biophys.Res. Commun. 6, 85-88.
- Rodén, L. y Schwartz, N.B. (1975) En: M.T.P. Int.Rev. Sci.Biochem.Ser. One Biochemistry of carbohydrates (Whelan, W.J., Ed.) Vol. V, Butterworks Univ. Park Press, Londres, pag. 267.
- Rundle, R.E. y French, D. (1943) J.Am.Chem.Soc. 65, 558-1707.
- Saenger, W. (1984) Naturwissenchaften 71, 31-36.
- Salema, R. y Badenhuizen, N.P. (1967) J.Ultrastr.Res. 20, 383.
- Sarko, A., Wu, H.C. y Chuah, C.T. (1983) Biochem.Soc. Symp. 11, 139-142.
- Sanwal, G.G., Greenberg, E., Hardie, J., Cameron, E. y Preiss, J. (1968) Plant Physiol. 43, 417-427.
- Schneider, E.M., Becker, J.U. y Volkenann, D. (1981) Planta 151, 124-134.
- Segrest, J., Jackson, R., Andrews, E. y Marchesi, V. (1971) Biochem.Biophys.Res.Commun. 44, 390.
- Shachter, H. (1981) En: Lysosomes and lysosomal

diseases (Callahan, J.W. y Lowden, A., Eds.) Raven Press, Nueva York, pag. 73.

- Sharon, N. (1975) En: Complex Carbohydrates: Their chemistry, Biosynthesis and Functions, Addison-Wesley, pag. 466.
- Sharon, N. (1984) TIBS. Vol. 9 N°4, 198-202.
- Sharon, N. y Lis, H. (1979) Biochemical Society Transactions, 7, 783-799.
- Sharon, N. y Lis, H. (1981) C. and EN. March 30, 21-44.
- Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966) Biochem.Biophys.Acta 112, 346.
- Silman, H.I. y Karlin, A. (1967) Proc.Natl.Ac.Sci. 58, 1664.
- Singer, S.J. (1974) Ann.Rev.Biochem. 43, 805-833.
- Singer, S.J. y Nicolson, G.L. (1972) Science 175, 720-731.
- Sivak, N.M., Tandecarz, J.S. y Cardini, C.E. (1981) Arch.Biochem.Biophys. 212, 525-536.
- Slabnik, E. y Frydman, R.B. (1970) Biochem.Biophys.Res. Commun. 38, 709.
- Somokinos, J.R. (1976) Plant Physiol. 57, 63-68.
- Staneloni, R.J. y Leloir, L.F. (1982) CRC Crit.Rev. Biochem. 289-326.
- Stegeman, H. (1968) Z.Analyt.Chem. 243, 573.

- Sterling, C. (1974) Stärke 26, 105-110.
- Takahara, H. y Matsuda, K. (1977) J.Biochem. 81, 1587-1594.
- Takeda, y. y Hizukuri, S. (1982) Carbohydr.Res. 102, 321-327.
- Tanaka, K. y Pigman, W. (1965) J.Biol.Chem. 240, 1487.
- Tandecarz, J.S. y Cardini, C.E. (1978) Biochim.Biophys. Acta 543, 423-429.
- Tandecarz, J.S. y Cardini, C.E. (1979) Plant Sci.Lett. 15, 151.
- Tandecarz, J.S., Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1973) Carbohydr.Res. 19, 385.
- Tandecarz, J.S., Lavintman, N. y Cardini, C.E. (1975) Biochim.Biophys.Acta 399, 345.
- Tandecarz, J.S., Sivak, M.N. y Cardini, C.E. (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 82, 157.
- Trevelyan, W.E., Procter, D.P. y Harrison, J.S. (1950) Nature 166, 444-445.
- Tomos, D.A. y Northcote, D.H. (1978) Biochem. J. 174, 283-290.
- Turner, J.F. y Turner, D.H. (1975) Ann.Rev.Plant.Physiol. 26, 159-186.
- Whelan, W.J. y Bailey, J.M. (1954) Biochem. J 58, 560.
- Wright, A. y Robbins, P.W. (1965) Biochim.Biophys.Acta

104, 594-596.

- Worthington Enzyme Manual (1972) Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, U.S.A.
- Wu, H-C.H. y Sarko, A. (1978a) Carbohydr.Res. 61, 7-25.
- Wu, H-C.H. y Sarko, A. (1978b) Carbohydr.Res. 61, 27-40.
- Ziegler, A., Harrison, S.C. y Leberman, R. (1974) Virology 59, 509.