

Tesis de Posgrado

Síntesis de glucanos alfa 1,4 unidos a proteína en músculo cardíaco de rata

Blumenfeld, Marta Liliana

1986

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

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

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

Cita tipo APA:

Blumenfeld, Marta Liliana. (1986). Síntesis de glucanos alfa 1,4 unidos a proteína en músculo cardíaco de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1956_Blumenfeld.pdf

Cita tipo Chicago:

Blumenfeld, Marta Liliana. "Síntesis de glucanos alfa 1,4 unidos a proteína en músculo cardíaco de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1956_Blumenfeld.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SINTESIS DE GLUCANOS α 1,4 UNIDOS A PROTEINA EN MUSCULO CARDIACO DE RATA

AUTORA: MARTA LILIANA BLUMENFELD

DIRECTORA: CLARA R. KRISMAN DE FISCHMAN

LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS "FUNDACION
CAMPOMAR"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1986

1986
42

A mis padres,
a Silvia,
a Dany, y
a Laura.

A G R A D E C I M I E N T O S

Este trabajo de tesis ha sido realizado gracias a la colaboración de numerosas personas, a las que quiero expresar mi sincero agradecimiento:

A la Dra. Clara R. Krisman de Fischman, quien dirigió esta tesis y junto a quien me inicié en la investigación bioquímica, por haberme enseñado con afecto los secretos del glucógeno, y por haberme brindado permanentemente su estímulo y apoyo y la independencia necesaria para llevar adelante este trabajo.

Al Dr. Luis R. Maréchal, bajo cuya dirección inicié parte de los experimentos que aquí se exponen, por haberme orientado y ayudado a concretar algunas de las ideas aquí presentadas.

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

A Alberto Kornblihtt y María Teresa Téllez-Iñón, por su apoyo afectivo e intelectual, que fueron fundamentales en las primeras etapas de este trabajo.

A los compañeros del I.I.B., por su estímulo y colaboración, y muy especialmente a mis amigos Daniel Boscoboinik, Mónica Torruella, Raúl Andino, Alberto Ochoa y Marcela Ferrer, con quienes compartí, a lo largo de estos años, éxitos, fracasos y mucho mate cocido.

A Roberto Geremía y Diana Tolmasky, compañeros de laboratorio, por el cariño y el respeto con que compartimos ideas, pipetas y reactivos.

Al personal técnico y administrativo del I.I.B., en especial a Francisco Irusta, por la eficiente y cordial colaboración proporcionada en todo momento.

A Norberto Malarini, por su dedicación y esmero en la confección de las figuras e ilustraciones de esta tesis.

A Irene Cangiano, por la disposición y eficiencia demostradas al transcribir parte de esta tesis.

A María Dolores Turró, por su invalorable ayuda, eficacia y disposición en la etapa final de transcripción de este trabajo.

Finalmente deseo agradecer en especial a mis padres, por el constante apoyo, inclusive económico, que recibí de ellos, y a Daniel Mendelzon, porque

hasta el último momento de esta etapa hizo que todo pareciera más fácil.

A B R E V I A T U R A S

ABA	ω -aminobutil agarosa.
ADP	adenosina 5' difosfato.
Ala	alanina.
AMP	adenosina 5' monofosfato.
Asn	asparagina.
ATP	adenosina 5' trifosfato.
cAMP	AMP cíclico.
cpm	cuentas por minuto.
DEAE	dietilaminoetil.
Dol	dolicol.
Dol-P	dolicol monofosfato.
Dol-P-P	dolicol difosfato.
DTT	ditiotreitól.
EDTA	etilendiamino tetraacetato.
Etn	etanolamina.
EtOH	etanol.
F, Fru	fructosa.
Fuc	fucosa.
Gal	galactosa.
GalN	galactosamina.
GalNAc	N-acetilgalactosamina.
GDP	guanosina 5' difosfato.
G, Glc	glucosa.
Glc-1-P	glucosa 1-fosfato.
Glc-6-P	glucosa 6-fosfato.
GlcN	glucosamina.
GlcNAc	N-acetilglucosamina.
GlcUA	ácido glucurónico.
Gln	glutamina.
Gno	glucógeno.
GS	glucógeno sintetasa.
GSK	quinasa de glucógeno sintetasa.

h	hora.
Hep	L-glicero-D-manoheptosa.
i	inhibidor.
IdUA	ácido idurónico.
kDa	kilodaltons.
KDO	ketodeoxioctonato.
KOH-EtOHpp	fracción digerida con KOH 33% y precipitada con 1,5 volúmenes de etanol.
M, Man	manosa.
M ₂	maltosa.
M ₃	maltotriosa.
Mes	ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico.
min	minuto.
2-MSH	2-mercaptoetanol.
NADP	dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina.
NeuAc	ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico).
PAPS	3' fosfoadenil 5' fosfosulfato.
Ph	glucógenofosforilasa.
PhK	quinasa de glucógeno fosforilasa.
Pi	fosfato inorgánico.
PM	peso molecular.
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro.
PPi	pirofosfato inorgánico.
PrK	quinasa de proteína.
prot	proteína.
PrP	fosfatasa de proteína.
RER	retículo endoplásmico rugoso.
Rha	ramnosa.
rpm	revoluciones por minuto.
S.A.	ácido siálico.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
Ser	serina.
TCA	ácido tricloroacético.

TCApp	fracción insoluble en TCA 10%.
TCAso1-EtOHpp	fracción soluble en TCA 10% e insoluble en 1,5 volúmenes de etanol.
Thr	treonina.
Tris	tris-(hidroximetil) aminometano.
UDP	uridina 5' difosfato.
UMP	uridina 5' monofosfato.
UTP	uridina 5' trifosfato.
Xyl	xilosa.

I N D I C E

	Página
<u>RESUMEN</u>	1
1. <u>INTRODUCCION</u>	7
1.1. Polisacáridos. Generalidades. Clasificación. Funciones.	7
1.2. Mecanismos de síntesis de polisacáridos.	11
1.2.1. Síntesis a partir de nucleótido- azúcares.	13
1.2.1.1. Síntesis por alargamiento de "primers" polisacarídicos. ...	13
1.2.1.2. Síntesis "de novo". Glicosaminoglicanos.	14
1.2.2. Síntesis a partir de intermediarios lipídicos.	23
1.2.2.1. Polisacáridos bacterianos. Antígeno O de <u>Salmonella</u>	23
1.2.2.2. Polisacáridos de eucariotes. Manano.	29
1.2.3. Síntesis a partir de oligo y poli- sacáridos.	38
1.2.3.1. Síntesis a partir de poli- sacáridos. Ramificación de glucógeno y amilopectina.	38
1.2.3.2. Síntesis a partir de sacarosa. Dextranos y fructanos.	38
1.2.3.2.1. Dextranos.	39
1.2.3.2.2. Fructanos.	43
1.3. Glucógeno.	46
1.3.1. Propiedades, distribución y estructura.	46
1.3.2. Metabolismo del glucógeno en mamíferos.	48
1.3.2.1. Síntesis.	51

1.3.2.1.1. Glucógeno sintetasa.	51
1.3.2.1.2. Enzima ramificante.	55
1.3.2.2. Degradación.	58
1.3.2.2.1. Glucógeno fosforilasa.	60
1.3.2.2.2. Sistema desramificante.	61
1.3.2.2.3. Otras enzimas degradantes del glucógeno.	62
1.3.2.3. Regulación.	64
1.4. Antecedentes recientes y objetivos de esta investigación.	67
1.4.1. Síntesis "de novo" de glucógeno.	67
1.4.2. Objetivos de esta tesis.	73
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	75
2.1. Sustratos y enzimas auxiliares.	75
2.1.1. Sustratos radioactivos.	75
2.1.2. Enzimas auxiliares.	75
2.1.3. Preparación de glucógeno libre de proteínas.	76
2.2. Preparación de enzima.	76
2.2.1. Obtención de sedimentos de 100.000 y 150.000 x g.	76
2.2.2. Purificación de la glucógeno sintetasa.	77
2.2.2.1. A partir de sedimentos de 150.000 x g.	77
2.2.2.2. A partir del sobrenadante de 25.000 x g.	78
2.3. Medición de actividades enzimáticas.	79
2.3.1. Ensayo en presencia de "primer". Incorporación de glucosa a glucógeno (actividad GS-1).	79

2.3.2.	Ensayo en ausencia de "primer". Incorporación de glucosa a proteína (actividad GS-2).	79
2.3.3.	Ensayo de actividad amilolítica.	81
2.4.	Recuperación de muestras radioactivas.	81
2.4.1.	Fracción TCAp.	81
2.4.2.	Papeles de filtro tratados con TCA. ...	82
2.5.	Tratamientos químicos.	82
2.5.1.	Hidrólisis ácida suave.	82
2.5.1.1.	Fracción TCAp.	82
2.5.1.2.	Papeles de filtro tratados con TCA.	83
2.5.2.	Permetilación e hidrólisis total de la fracción TCAp.	83
2.6.	Tratamientos enzimáticos.	84
2.6.1.	Digestión enzimática del compuesto TCAp.	84
2.6.2.	Digestión de la glucógeno sintetasa con α -amilasa insoluble.	84
2.7.	Métodos cromatográficos.	85
2.7.1.	Cromatografía en papel.	85
2.7.2.	Cromatografía en capa delgada.	85
2.7.3.	Filtración en geles.	86
2.7.4.	Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.	86
2.7.5.	Cromatografía en columna de ω -aminobu- til agarosa.	86
2.8.	Métodos electroforéticos.	86
2.8.1.	Electroforesis en papel.	86
2.8.2.	Electroforesis en geles de poliacrila- mida.	87
2.8.2.1.	Geles no disociantes.	87
2.8.2.1.1.	Detección de glucó- geno sintetasa en	

geles no disociantes.	87
2.8.2.1.2. Determinación de pesos moleculares en geles no disociantes.	88
2.8.2.2. Geles disociantes en presencia de SDS.	90
2.8.2.2.1. Determinación de pesos moleculares en geles disociantes con SDS.	90
2.8.2.3. Detección de proteínas.	91
2.8.2.4. Detección de carbohidratos. ..	91
2.8.2.5. Detección de radioactividad. .	91
2.9. Otras técnicas.	91
2.9.1. Determinación de proteínas.	91
2.9.2. Determinación de glucógeno.	91
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	92
3.1. Obtención de preparaciones enzimáticas estables.	93
3.1.1. Discusión.	98
3.2. Propiedades de la actividad enzimática responsable de la incorporación de glucosa a la fracción TCApp en ausencia de "primer".	100
3.2.1. Propiedades cinéticas. Curva de UDP-Glc y curva de tiempo.	100
3.2.2. Relación precursor-producto entre las fracciones TCApp y TCAsol-EtOHpp.	104
3.2.3. Efecto de la preincubación.	104
3.2.4. Efecto de la concentración de proteínas.	110
3.2.5. Efecto de la temperatura.	110
3.2.6. Efecto del agregado de glucógeno.	113

3.2.7. Propiedades comparativas de la actividad GS-2 con la actividad de incorporación de glucosa a glucógeno exógeno (GS-1).	113
3.2.7.1. Efecto del ditiotreitol.	113
3.2.7.2. Especificidad del nucleótido-azúcar.	117
3.2.7.3. Efecto del pH.	117
3.2.7.4. Efecto de activadores e inhibidores.	117
3.2.8. Discusión.	121
3.3. Propiedades de los productos radioactivos insolubles en TCA, sintetizados durante la reacción GS-2.	133
3.3.1. Tratamientos enzimáticos. Amilolisis y proteólisis.	133
3.3.2. Tratamientos químicos.	136
3.3.2.1. Hidrólisis ácida suave.	136
3.3.2.2. Permetilación e hidrólisis ácida total.	141
3.3.3. Discusión.	141
3.4. Purificación de la glucógeno sintetasa.	146
3.4.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.	146
3.4.2. Cromatografía en columna de ω -aminobutil agarosa.	146
3.4.3. Discusión.	149
3.5. Propiedades de la actividad GS-2 en la glucógeno sintetasa purificada (fracción D1A).	152
3.5.1. Efecto de Glc-6-P y otros azúcares fosfato.	152
3.5.2. Efecto de maltosacáridos y bajas concentraciones de glucógeno.	155
3.5.3. Discusión.	158
3.6. Detección de las actividades GS-1 y GS-2 pre-	

sentes en la glucógeno sintetasa purificada, después de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.	159
3.6.1. Desarrollo del método.	160
3.6.2. Detección de las actividades GS-1 y GS-2.	165
3.6.3. Determinación del peso molecular de la glucógeno sintetasa.	166
3.6.4. Discusión.	166
3.7. Propiedades de los productos de la reacción GS-2 sintetizados por la glucógeno sintetasa purificada.	171
3.7.1. Tratamientos enzimáticos. Amilolisis y proteólisis.	171
3.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	171
3.7.2.1. Condiciones nativas.	171
3.7.2.2. Condiciones desnaturalizantes.	173
3.7.2.2.1. Experimentos de pulso. Digestión con α -amilasa.	173
3.7.2.2.2. Experimentos de pulso y "chase". Digestión con amiloglucosidasa.	176
3.7.3. Discusión.	178
3.8. Digestión de la glucógeno sintetasa purificada (D1A) con α -amilasa insoluble.	184
3.8.1. Discusión.	186
4. <u>REFERENCIAS</u>	187

RESUMEN

El glucógeno es el polisacárido de reserva presente en tejidos animales, así como también en algunas plantas superiores, hongos y bacterias. Es un homopolímero ramificado de moléculas de D-glucosa, unidas entre sí por uniones glucosídicas α 1,4, mientras que en los puntos de ramificación presenta uniones α 1,6.

En la síntesis del glucógeno intervienen dos enzimas: la glucógeno sintetasa (UDP-Glc: α 1,4-glucan- α 1,4 glucosil transferasa) y la enzima ramificante (α 1,4-glucan- α 1,4 glucan-6 glucosil transferasa). La glucógeno sintetasa cataliza la transferencia de restos glucosilo de un nucleótido-glucosa específico (UDP-Glc ó ADP-Glc según el organismo) al extremo no reductor de una molécula aceptora del tipo del glucógeno que puede llegar a ser tan pequeña como maltotriosa. Una vez sintetizada una cadena glucosídica α 1,4 de largo suficiente, la enzima ramificante produce un reordenamiento de la misma, formando un punto de ramificación α 1,6. Este esquema de síntesis corresponde en realidad a un mecanismo de alargamiento de glucanos α 1,4 preexistentes.

El hecho de que la glucógeno sintetasa requiera un "primer" o aceptor para los residuos de glucosa que se van a transferir plantea, por lo tanto, el problema de cómo se lleva a cabo la síntesis "de novo" del glucógeno. Es decir, cómo se sintetiza una molécula de glucógeno cuando en la célula no existe aceptor para la glucógeno sintetasa. Se ha demostrado que fracciones microsomales de hígado de rata y de Escherichia coli carentes de glucógeno transfieren marca radioactiva a partir de nucleótido-(^{14}C)glucosa a un compuesto insoluble en ácido tricloroacético (TCA), que es sensible a la digestión con enzimas amilolíticas o proteolíticas.

En base a estos resultados y evidencias adicionales, Krisman ha postulado que la síntesis "de novo" del glucógeno involucraría una etapa inicial de formación de una glucoproteína catalizada por una enzima distinta de la glucógeno sintetasa. Los glucanos así sintetizados, unidos covalentemente a la proteína, servirían a su vez como "primers" para la acción conjunta de la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante. Se formarían entonces moléculas de glucógeno unidas a proteína que serían liberadas de la misma por acción de

enzimas de tipo amilolítico, proporcionando así aceptores para la síntesis del glucógeno no unido a proteína, según el esquema clásico.

Este modelo ha sido apoyado por la demostración de la existencia "in vivo" de glucógeno unido a proteína (desmoglucógeno) en sistemas tales como hígado y corazón de rata. En el caso particular del músculo cardíaco de rata, se ha descrito que alrededor del 50% del glucógeno extraíble por agua a 100°C, es insoluble en TCA, y que 25% del polisacárido sigue precipitando con ácido aún después de digestión con solución alcalina caliente. Por otra parte, el glucógeno insoluble en TCA puede ser solubilizado por proteólisis.

Estos resultados, si bien no demuestran la existencia de una unión covalente entre polisacárido y proteína, sugieren una fuerte asociación entre ambos.

Con el objeto de ampliar y generalizar las observaciones realizadas en hígado de rata y E. coli, y considerando que el músculo cardíaco de rata constituía un sistema adecuado, se estudió la formación de glucanos α 1,4 unidos a proteína y su probable papel como intermediarios en la síntesis "de novo" del glucógeno. Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

- Se puso a punto la preparación de fracciones microsomales de músculo cardíaco de rata con muy bajo contenido de glucógeno.
- Después de incubar estas preparaciones enzimáticas con UDP-(¹⁴C)Glc, se incorporó radioactividad a un aceptor endógeno presente en una fracción insoluble en TCA 10% (fracción TCApp), y en menor grado a una fracción soluble en ácido e insoluble en alcohol (fracción TCAsol-EtOHpp). La actividad enzimática en ausencia de "primer" se denominó GS-2. La insolubilidad en ácido de la (¹⁴C)glucosa incorporada indicó que el producto mayoritario de la reacción GS-2 era un glucoconjugado, y que la aglicona era probablemente una proteína.
- La radiomarca insoluble en TCA fue precursora de la presente en la fracción TCAsol-EtOHpp. Esto requirió la incorporación previa de restos glucosilo del UDP-Glc.
- Las curvas de tiempo de la actividad GS-2 presentaron un período "lag" que varió con la concentración de UDP-Glc y con la preparación. Este período de latencia correspondió a la formación de un mejor aceptor para la transferencia de restos glucosilo del UDP-Glc, ya que desapareció al preincubar

las mezclas de reacción con nucleótido-azúcar no radioactivo.

- Las preparaciones enzimáticas presentaron también actividad de glucógeno sintetasa (actividad GS-1), medida como la incorporación de glucosa del UDP-Glc al glucógeno exógeno presente en el precipitado etanólico de la mezcla de reacción digerida con KOH (fracción KOH-EtOHpp).
- El agregado de glucógeno durante el ensayo GS-2 inhibió la incorporación de (^{14}C)glucosa a la fracción TCApp, pero aumentó la correspondiente a TCAsol-EtOHpp. En este caso, la reacción se llevó a cabo sin período "lag", al igual que lo que ocurrió con el ensayo GS-1. Por lo tanto, el aceptor endógeno era distinto, al menos en parte, que el glucógeno exógeno, el cual era un mejor sustrato para la transferencia de restos glucosilo.
- Se estudiaron algunas propiedades de la actividad GS-2 (curva de UDP-Glc, efecto de la preincubación, concentración de proteínas y temperatura), así como diversas propiedades comparativas de las actividades GS-1 y GS-2 (efecto del DTT, sales, nucleótidos de uridina y adenina, y otros activadores e inhibidores, pH, y especificidad del nucleótido-azúcar). Se concluyó que las actividades GS-1 y GS-2 eran catalizadas por la misma enzima, la glucógeno sintetasa, y que las diferencias observadas en algunos casos se debían a la variación del cosustrato aceptor de la reacción: glucógeno exógeno para GS-1 y aglicona endógena para GS-2.
- Los productos radioactivos insolubles en TCA, sintetizados durante la reacción GS-2 fueron degradados por α - o β -amilasas, amiloglucosidasa o proteasa libre de amilasa. El grado de sensibilidad a la digestión con enzimas amilolíticas correspondió al de una estructura ramificada semejante a la del glucógeno nativo.
- La radioactividad insoluble en ácido se solubilizó por tratamiento ácido suave (HCl 0,01 ó 0,1 N, 15 min, 100°C). La cinética de ambas hidrólisis sugirió que la (^{14}C)glucosa estaba unida a la aglicona por al menos dos tipos de uniones distintas, cuyos $t_{1/2}$ eran similares al de la unión éster-fosfato.
- La permetilación e hidrólisis ácida total de los compuestos liberados por HCl 0,1 N confirmaron que la porción sacarídica del glucoconjugado sintetizado durante la reacción GS-2 tenía la estructura ramificada del glucógeno nativo.

- Se purificó parcialmente la glucógeno sintetasa, separándose cromatográficamente dos especies enzimáticas: una, que presentaba las actividades GS-1 y GS-2 (fracción D1A), y otra que solo tenía actividad GS-1 (fracción D2A).
- La actividad GS-2 de D1A fue estimulada por Glc-6-P y, en menor grado, por otros ésteres fosfato. Estos compuestos activaron de forma semejante la actividad GS-1. La fracción D2A, que no presentaba actividad GS-2, también fue activada por estos compuestos.
- La fracción D1A no fue capaz de sintetizar glucanos insolubles en ácido a partir de aceptores exógenos no unidos a proteína (maltosacáridos o glucógeno), indicando que los aceptores endógenos de la actividad GS-2 no eran de este tipo.
- Al igual que en el caso de las fracciones microsomales, los compuestos radioactivos insolubles en TCA sintetizados por D1A fueron sensibles a la degradación amilolítica o proteolítica.
- Se desarrolló un método de detección "in situ" de actividad de glucógeno sintetasa en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Este método permitió determinar que las actividades GS-1 y GS-2 eran catalizadas por una misma proteína. Por otra parte, dado que se pudo detectar actividad en ausencia de "primer" después de una corrida electroforética, se concluyó que la enzima y el receptor endógeno de la reacción GS-2 estaban fuertemente asociados, ya que migraban juntos en electroforesis.
- Los productos de reacción de GS-2 sintetizados por D1A se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Se observó migración de (^{14}C)glucosa tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. En este último caso se comprobó que la movilidad de las bandas radioactivas disminuía en función del tiempo de incubación. Por otra parte, la radioactividad desapareció después de incubar las mezclas con α -amilasa. Cuando se estudiaron muestras provenientes de un pulso con UDP-(^{14}C)Glc y posterior "chase" con nucleótido-azúcar no radioactivo, se verificó que las especies radioactivas de mayor movilidad daban lugar, después del "chase", a las de menor migración. Por su parte, las bandas radiomarcadas más móviles se regeneraron por incubación de las mezclas de reacción con amiloglucosidasa.
- La preincubación de la fracción D1A con α -amilasa insoluble produjo una notable disminución de la actividad GS-2 sin afectar mayormente la actividad GS-1 de la preparación.

En consecuencia, se demostró que las preparaciones enzimáticas de músculo cardíaco de rata estudiadas en el presente trabajo de tesis catalizaban la síntesis "in vitro" de glucanos α 1,4 unidos a proteína. El aceptor proteico tenía, en este caso en particular, glucanos presintetizados "in vivo", los que eran alargados por la glucógeno sintetasa durante el ensayo GS-2, y en el caso de las preparaciones microsomales, eran ramificados por la enzima ramificante. Se formaban así moléculas del tipo del glucógeno, unidas a proteína, coincidiendo con lo postulado en el modelo de Krisman para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno. Por lo tanto, aún cuando en el caso particular de esta tesis, el ensayo GS-2 no constituyó un sistema de estudio de la iniciación propiamente dicha, la síntesis "in vitro" de los intermediarios (proteoglucanos) apoya fuertemente el modelo antes mencionado.

Parte de los resultados presentados en esta tesis ha sido publicada en los siguientes artículos:

- "The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart". M.L. Blumenfeld, W.J. Whelan & C.R. Krisman (1983). European Journal of Biochemistry 135, 175-179.
- "The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart. Studies with a purified preparation". M.L. Blumenfeld & C.R. Krisman (1985). The Journal of Biological Chemistry 260, 11560-11566.
- "The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart. α 1,4 glucans tightly associated with glycogen synthase". M.L. Blumenfeld & C.R. Krisman (1986). European Journal of Biochemistry, en prensa.
- "A method for the direct measurement of glycogen synthase activity on gels after polyacrylamide gel electrophoresis". C.R. Krisman & M.L. Blumenfeld (1986). Analytical Biochemistry, en prensa.

1. INTRODUCCION

1.1. POLISACARIDOS. GENERALIDADES. CLASIFICACION. FUNCIONES

Los hidratos de carbono son los compuestos orgánicos que se encuentran en mayor proporción en la naturaleza, debido fundamentalmente a la abundancia de polímeros vegetales de glucosa, tales como la celulosa (1).

La mayoría de los hidratos de carbono presentes en los seres vivos está bajo la forma de compuestos de alto peso molecular, los polisacáridos. Estos últimos se definen como polímeros de condensación de monosacáridos o de derivados tales como ácidos urónicos o aminoazúcares, que contienen 10 ó más residuos de azúcar (2). La separación entre oligo- y polisacáridos es operacional, ya que ambos difieren sólo en el peso molecular, y como consecuencia de ello, en las propiedades físicas características de las sustancias de alto peso molecular.

Desde el punto de vista estructural, los polisacáridos pueden clasificarse como:

- a) homopolisacáridos, formados por un solo tipo de unidad monosacarídica, o
- b) heteropolisacáridos, constituidos por dos o más monosacáridos diferentes.

En ambos grupos, además, existen representantes lineales y ramificados, pudiendo haber también moléculas proteicas o lipídicas unidas covalentemente a la porción sacarídica. Dado que este último concepto podría llevar a incluir dentro de los polisacáridos a compuestos tales como glicoproteínas o glicolípidos, se considera como polisacáridos sólo a aquellos glicoconjugados en los que el componente sacarídico representa la mayor parte de la molécula. Asimismo, si bien el término proteoglicano ha sido utilizado exclusivamente para designar a las moléculas de tejido conectivo que contienen 80 a 90% de cadenas de glicosaminoglicanos unidas covalentemente a un núcleo proteico (3; ver sección 1.2.1.2.), se usará el mismo para referirse además a la asociación covalente de proteína con cualquier polisacárido, siempre que este último constituya la parte mayoritaria de la molécula.

En las Tablas I y II se describen algunos homopolisacáridos y heteropolisacáridos representativos, respectivamente.

En cuanto al papel que cumplen los polisacáridos, se destacan fundamentalmente dos tipos de funciones. La primera es como forma de almacenamiento de energía, como es el caso del almidón (4), fructanos (5) o galactomananos (6) en plantas; del glucógeno en: animales (7), hongos (8), algas (9) y bac-

Tabla I: HOMOPOLISACARIDOS REPRESENTATIVOS.

A) LINEALES.

Polisacárido	Monosacárido	Unión	Ref.
Celulosa	Glucosa	β 1,4	19
Amilosa	Glucosa	α 1,4	20
Nigerano	Glucosa	α 1,3, α 1,4	21
Levano/fructano	Fructosa	β 2,6	5,22
Quitina	N-acetilglucosamina	β 1,4	1

B) RAMIFICADOS.

Polisacárido	Monosacárido	Unión	Ramificación	Ref.
Amilopectina	Glucosa	α 1,4	α 1,6	20
Glucógeno	Glucosa	α 1,4	α 1,6	20
Dextrano	Glucosa	α 1,6	α 1,3 ó α 1,4	22
Manano	Manosa	α 1,6, α 1,2 α 1,3	α 1,2	24

Tabla II: HETEROPOLISACARIDOS REPRESENTATIVOS.

A) LINEALES		
POLISACARIDO	UNIDAD REPETITIVA	REF.
Acido Hialurónico	$\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcUA-(1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-GlcNAc-(1-}$	12
Ramnogalacturonano	$[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalUA-(1-4)\text{-}\alpha\text{-GalUA-(1-)]}_n\text{-4)\text{-}\alpha\text{-D-GalUA-(1-2)\text{-}\beta\text{-L-Ram-(1-[4)\text{-}\alpha\text{-D-GalUA-(1-4)\text{-}\alpha\text{-D-GalUA-(1-}$	19
Exopolisacarido		
Enterobacter aerogenes tipo 5	$\rightarrow 4 \text{GlcUA} \xrightarrow{\beta} 4 \text{Glc1} \rightarrow 3 \text{Man 1-}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> \downarrow Ac </div> <div style="text-align: center;"> \downarrow $\begin{matrix} 4 & 6 \\ & \\ \text{Pyr} \end{matrix}$ </div> </div>	25
B) RAMIFICADOS		
Arabinogalactano	$\begin{matrix} -3) \text{Gal} (1 \xrightarrow{\beta} 3) \text{Gal} (1 \xrightarrow{\beta} 3) \text{Gal} (1 \xrightarrow{\beta} \\ \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \\ \text{Ara}(1-3) \text{Gal} \quad \text{Ara}(1-3) \text{Gal} \quad \text{Ara}(1-3) \text{Gal} \\ \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \\ \text{Ara}(1-3) \text{Gal} \quad \text{Gal} \quad \text{Ara} \\ \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \\ \text{Ara} \quad \text{Ara} \end{matrix}$	26
Xantano	$\begin{matrix} \rightarrow 4 \beta \text{Glc 1} \rightarrow 4 \beta \text{Glc 1} \rightarrow 4 \beta \text{Glc 1} \rightarrow 4 \beta \text{Glc 1} \rightarrow \\ \downarrow \quad \downarrow \\ \alpha \text{Man-6-OAc} \quad \alpha \text{Man-6-OAc} \\ \downarrow \quad \downarrow \\ \beta \text{GlcUA} \quad \beta \text{GlcUA} \\ \downarrow \quad \downarrow \\ \beta \text{Man} \quad \beta \text{Man} \\ \downarrow \quad \downarrow \\ \begin{matrix} 4 & 6 \\ \diagdown & / \\ & \text{C} \\ / & \diagdown \\ \text{CH}_3 & \text{CO}_2\text{H} \end{matrix} \end{matrix}$	64

terias (7); o de la laminarina (paramilón) en algas (10).

El segundo tipo de funciones es consecuencia de propiedades fisicoquímicas características de las macromoléculas. Así, la celulosa (1) y las hemicelulosas (11) en plantas, o la quitina en hongos, algas, artrópodos, anélidos y moluscos (1), sirven como moléculas estructurales, y como nexos entre otros componentes de la pared celular, controlando la permeabilidad de la misma (1,11). Por otra parte, los glicosaminoglicanos de animales superiores desempeñan funciones relacionadas con propiedades fisicoquímicas propias, tales como unión de agua y microiones, y exclusión estérica de diferentes macromoléculas, controlando de este modo la permeabilidad intercelular (12). Asimismo, la estructura de estos polisacáridos está directamente relacionada con su capacidad de unir macromoléculas, lo que determina procesos tan diversos como la organización estructural de la matriz extracelular de tejidos conectivos; el control de la homeostasis; la unión específica de proteínas plasmáticas a la pared del capilar sanguíneo; o la regulación del metabolismo y comportamiento celular (13). Por último, la gran diversidad estructural de los polisacáridos bacterianos ejemplifica claramente la variedad de funciones que se puede asignar a los polisacáridos: a) contribución al mantenimiento de la rigidez mecánica y la forma celular, en el caso del peptidoglicano (14,15); b) la unión de cationes divalentes y regulación del flujo catiónico a través de la pared celular, por parte de polisacáridos aniónicos tales como los ácidos teicoicos y teicurónicos de la pared celular de bacterias Gram positivas (15); c) provisión de una fuerte hidrofilicidad a la superficie celular, permitiendo a las bacterias escapar a la fagocitosis y a la acción del complemento (14,16); formación de una barrera de permeabilidad a la entrada de antibióticos y otras macromoléculas, y a la salida de enzimas y componentes estructurales del espacio periplásmico (14,16), así como también determinación de alta especificidad serológica, receptores para fagos y bacteriocinas, y poderosa actividad de endotoxina (17), para el caso de los lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas; d) finalmente, los polisacáridos capsulares se relacionan con la protección contra la desecación, la unión y englobamiento de diversos compuestos, el bloqueo de la unión de bacteriófagos, y fundamentalmente, el aumento de la virulencia y patogenicidad bacterianas, debido al enmascaramiento de antígenos.

nos de superficie, que permite a las bacterias escapar al ataque de leucocitos polimorfonucleares y a la acción de anticuerpos y complemento (18).

Es importante destacar que los polisacáridos se diferencian de biopolímeros tales como proteínas, porque existen como series homólogas cuyo peso molecular se distribuye alrededor de un valor medio, y no como macromoléculas discretas de igual peso molecular. Esta característica hace que, en general, no exista una relación tan estrecha entre estructura y función de los polisacáridos, como la que existe en el caso de proteínas o ácidos nucleicos, que presentan una alta especificidad funcional e informacional dependiente de la estructura. Así, la mayoría de las propiedades diferenciales de los polisacáridos reside, no en el ordenamiento de las unidades estructurales individuales, sino en la conformación de la cadena polimérica como un todo.

1.2. MECANISMOS DE SÍNTESIS DE POLISACARIDOS

La síntesis de polisacáridos no se lleva a cabo mediante la simple adición consecutiva de las unidades monosacarídicas constitutivas del mismo, sino que representa un proceso de transglicosilación que implica la transferencia del resto glicosídico de un dador apropiado a un aceptor adecuado. Los dadores de glicosilo constituyen formas activadas de los respectivos azúcares, estando representados fundamentalmente por los nucleótido-azúcares, los azúcares fosfato, y los azúcares unidos a intermediarios lipídicos.

Desde el punto de vista termodinámico, los nucleótido-azúcares son los mejores dadores para la formación de uniones glicosídicas, dado que tienen la energía libre de hidrólisis (ΔG°) más negativa (27; Tabla III). Así, el ΔG° para UDP-Glc a pH 6,6 es de -8,0 kcal/mol, mientras que el correspondiente a α -D-Glc-1-P al mismo pH es de -5,2 kcal/mol (27). Es importante destacar que la sacarosa (Glc α 1 \rightarrow 2 Fru) tiene un ΔG° de -7,0 kcal/mol, por lo que también resulta un buen dador de azúcares (ver sección 1.2.3.2.).

La síntesis de nucleótido-azúcares se puede esquematizar según las siguientes reacciones:

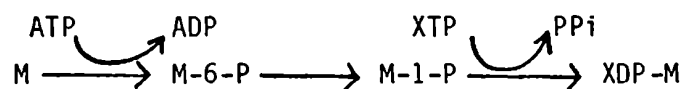


Tabla III: ENERGIA LIBRE DE HIDROLISIS (ΔG°) DE UNIONES GLICOSIDICAS.

Unión	ΔG° (kcal/mol)
UDP-Glc (pH 6,6)	- 8,0
Sacarosa	- 7,0
α -D-Glc-1-P pH 6,6	- 5,2
pH 8,5	- 4,8
Glucógeno	- 4,3
Maltosa	- 4,0
Dextrano	- 2,0

Tomado de Ref. 27.

donde M es un monosacárido y X un nucleósido cualquiera.

Según cuál sea el dador de restos glicosídicos, los polisacáridos se sintetizan mediante los siguientes mecanismos:

- a) por transferencia directa a partir de nucleótido-azúcares (sección 1.2.1.),
- b) por transferencia a partir de intermediarios lipídicos (sección 1.2.2.), o bien
- c) por transferencia a partir de oligo o polisacáridos (sección 1.2.3.).

Si bien es posible sintetizar "in vitro" las uniones glicosídicas α 1,4 del glucógeno o del almidón a partir del dador α -D-Glc-1-P, se sabe actualmente que el mecanismo de síntesis "in vivo" de estos polisacáridos involucra sólo a los nucleótido-azúcares (27; ver sección 1.3.2.).

Por último, la estructura final del polisacárido, es decir, la configuración anomérica y la posición de la unión glicosídica, así como también el largo de la cadena polimérica, está determinada por la especificidad de las enzimas involucradas en la transferencia.

1.2.1. SINTESIS A PARTIR DE NUCLEOTIDO-AZUCARES

Dentro de los polisacáridos que se sintetizan utilizando sólo nucleótido-azúcares como dadores del resto glicosídico, podemos distinguir dos grupos, según la importancia que tenga la síntesis "de novo" del polisacárido en el mantenimiento de la concentración celular del mismo:

- a) el polisacárido se sintetiza por alargamiento, desde el extremo no reductor, de cadenas sacarídicas del tipo del polisacárido, preexistentes en la célula (ver 1.2.1.1.), o
- b) el polisacárido es sintetizado "de novo" (ver 1.2.1.2.).

1.2.1.1. SINTESIS POR ALARGAMIENTO DE "PRIMERS" POLISACARIDICOS

Este tipo de mecanismo, que requiere un "primer" de tipo polisacárido que quedará incorporado al producto, es llevado a cabo en la síntesis de las uniones glicosídicas α 1,4 del glucógeno, la amilosa o la amilopectina. La síntesis del glucógeno será descripta en detalle en la sección 1.3.2.1.

Es importante destacar que la síntesis "de novo" de este tipo de polisacáridos, que ocurriría en ausencia de "primers" disponibles para el alargamiento, podría involucrar tanto a aceptores no sacarídicos, como a dadores diferentes de los nucleótido-azúcares. En el caso de los polisacáridos antes mencionados, aún no se ha dilucidado en forma concluyente el mecanismo de síntesis "de novo" de los mismos, y particularmente respecto al glucógeno, esta tesis tiene como objeto el estudio de dicho mecanismo.

1.2.1.2.SINTESIS "DE NOVO". GLICOSAMINOGLICANOS

Este tipo de mecanismo está ejemplificado en la síntesis de los glicosaminoglicanos que forman parte de proteoglicanos, con excepción del keratán sulfato I de córnea, que se sintetiza vía lípido intermediario (ver sección 1.2.2.).

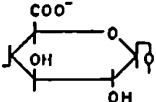
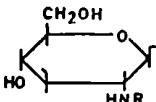
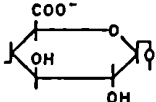
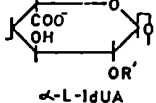
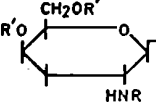
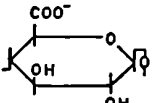
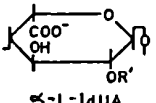
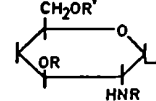
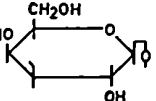
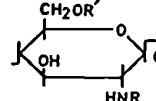
Los glicosaminoglicanos son heteropolisacáridos lineales aniónicos, formados por unidades disacarídicas repetitivas que alternan generalmente un ácido urónico (ácido D-glucurónico y/o L-idurónico) y una hexosamina (D-glucosamina o D-galactosamina). Existen seis tipos diferentes de glicosaminoglicanos (Tabla IV), de los cuales todos, salvo el ácido hialurónico, están sulfatados.

Se los encuentra casi exclusivamente en tejidos animales (13); el ácido hialurónico es producido también por bacterias del grupo A de los estreptococos (28).

Con excepción del ácido hialurónico, los glicosaminoglicanos se encuentran en los tejidos formando parte de proteoglicanos, en los que varias cadenas polisacarídicas están unidas covalentemente a un núcleo proteico (13).

Los proteoglicanos son muy heterogéneos, no sólo respecto al tamaño de las cadenas polisacarídicas, la relación del contenido de ácido idurónico a glucurónico, o la cantidad y distribución de grupos sulfato en la porción sacarídica, sino también en cuanto a la proteína que sirve como núcleo del proteoglicano (13). A pesar de la escasa información referente a la estructura de estos núcleos proteicos, se sabe que existen varios tipos diferentes, que además, pueden llevar un mismo tipo de glicosaminoglicano (13); por otra parte, también puede ocurrir que una misma proteína sirva de núcleo a distin-

Tabla IV: ESTRUCTURA DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS.

Polisacárido	Monosacáridos ^a		Sustituyentes
	A	B	
Acido Hialurónico	 β-D-GlcUA	 β-D-GlcN	$R = -C(=O)CH_3$
Condroitin sulfatos	 β-D-GlcUA  α-L-IdUA	 β-D-GalN	$R' = -H \text{ ó } -SO_3$
Heparina, heparan sulfato	 β-D-GlcUA  α-L-IdUA	 α-D-GlcN	$R = -C(=O)CH_3$ $\text{ó } -SO_3$ $R = -H \text{ ó } -SO_3$
Keratan sulfato	 β-D-Gal	 β-D-GlcN	$R = -C(=O)CH_3$ $R = -H \text{ ó } -SO_3$

^a Los polisacáridos se describen como polímeros lineales de monosacáridos alternantes A y B.
 GlcUA, ácido glucurónico; IdUA, ácido idurónico; GlcN, glucosamina; GalN, galactosamina; Gal, galactosa.

tos glicosaminoglicanos, como en el caso del proteoglicano de cartílago nasal bovino. Este último contiene aproximadamente 100 cadenas de condroitín sulfato de alrededor de 20.000 de peso molecular, y 60 cadenas de keratán sulfato II, unidas a un núcleo proteico heterogéneo de 200 a 250 kDa, que constituye el 7 u 8% del total de la molécula (29). Estos proteoglicanos, a su vez, están unidos no covalentemente a moléculas de ácido hialurónico, formando grandes agregados de hasta 200×10^6 de peso molecular, que están estabilizados por proteínas de unión específicas (30; Figura 1).

Dentro de los proteoglicanos se han identificado tres tipos de uniones carbohidrato-proteína:

- a) unión O-glicosídica entre D-xilosa y el grupo oxhidrilo de serina (Figura 2 A),
- b) unión N-glicosilamina entre N-acetilglucosamina y el grupo amido de asparagina (Figura 2 B), y
- c) unión O-glicosídica entre N-acetilgalactosamina y el grupo oxhidrilo de serina o treonina (Figura 2 C).

La unión xilosa-serina (tipo a) no se ha encontrado en ningún otro glicoconjugado de mamíferos, fuera de los proteoglicanos de tejido conectivo. Esta unión fue identificada inicialmente en la heparina (31), encontrándose después también en los condroitín 4- y 6-sulfatos, dermatán sulfato y heparán sulfato (32). En todos estos casos, la región de unión contiene el tetrasacárido glucuronil-galactosil-galactosil-xilosa, con la estructura que se muestra en la Figura 3 (32).

Se describirá a continuación sólo la síntesis de proteoglicanos que tienen unión tipo a, ya que para los tipos b y c, que se encuentran en el keratán sulfato I de córnea (33) y en keratán sulfato II esquelético (34), respectivamente, no se ha caracterizado el mecanismo de formación de los mismos. Dado que estas últimas uniones son muy comunes en glicoproteínas (35), se supone que el mecanismo de síntesis es similar al de éstas (36,37).

En la Figura 4 se esquematiza la síntesis del condroitín 4- y 6-sulfato.

La formación de los polisacáridos requiere como paso inicial la síntesis del aceptor proteico, aunque no se conoce la exacta relación temporal entre este proceso y la adición de la porción sacarídica del proteoglicano

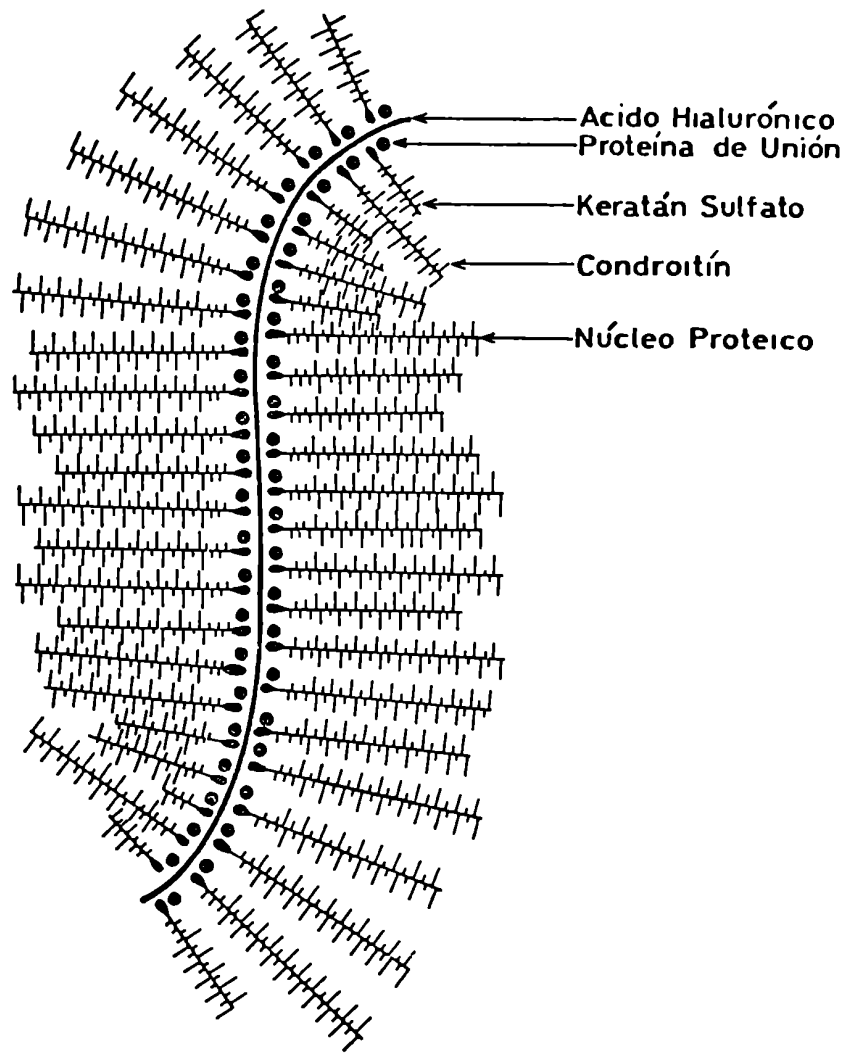


Fig. 1: ESTRUCTURA DE LOS AGREGADOS DE PROTEOGLICANOS DE CARTILAGO NASAL BOVINO.

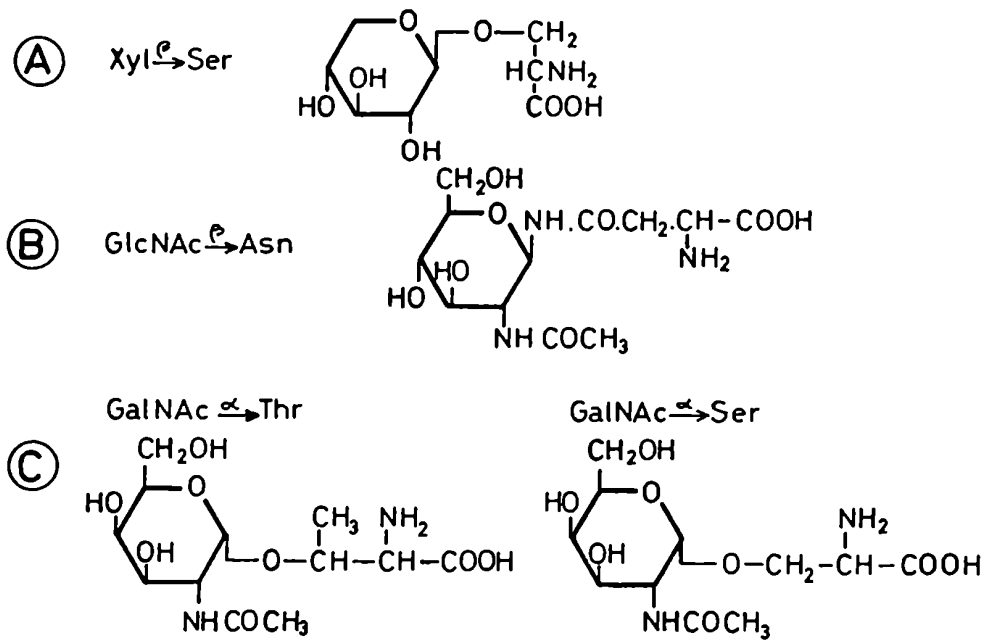


Fig. 2: UNIONES CARBOHIDRATO-PROTEINA PRESENTES EN LOS PROTEOGLICANOS.

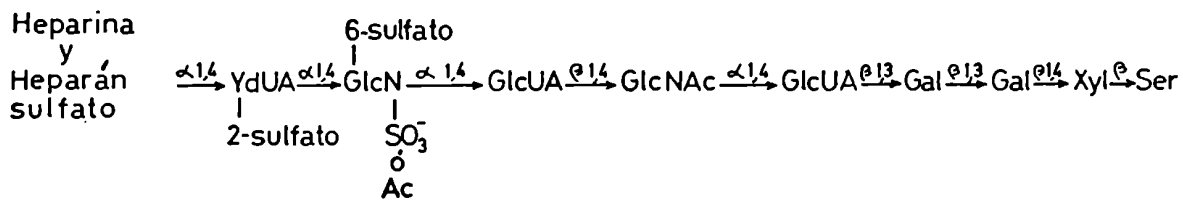
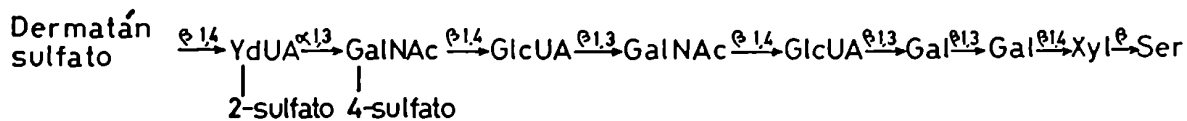
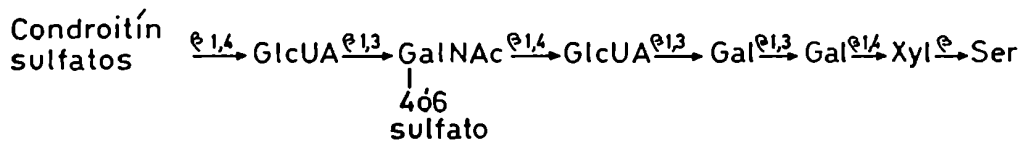
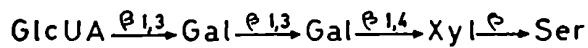
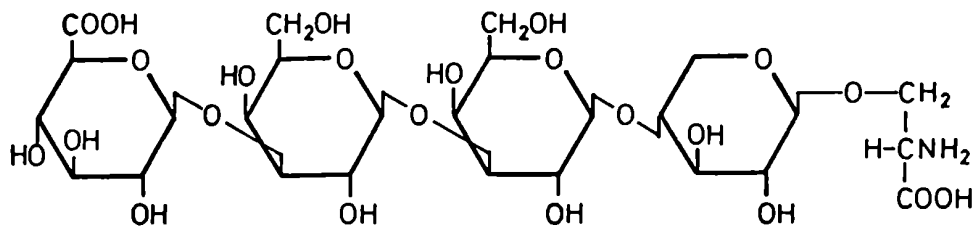


Fig. 3: ESTRUCTURA DE LA REGION DE UNION CARBOHIDRATO-PROTEINA DE PROTEOGLICANOS CON UNION XILOSA-SERINA.

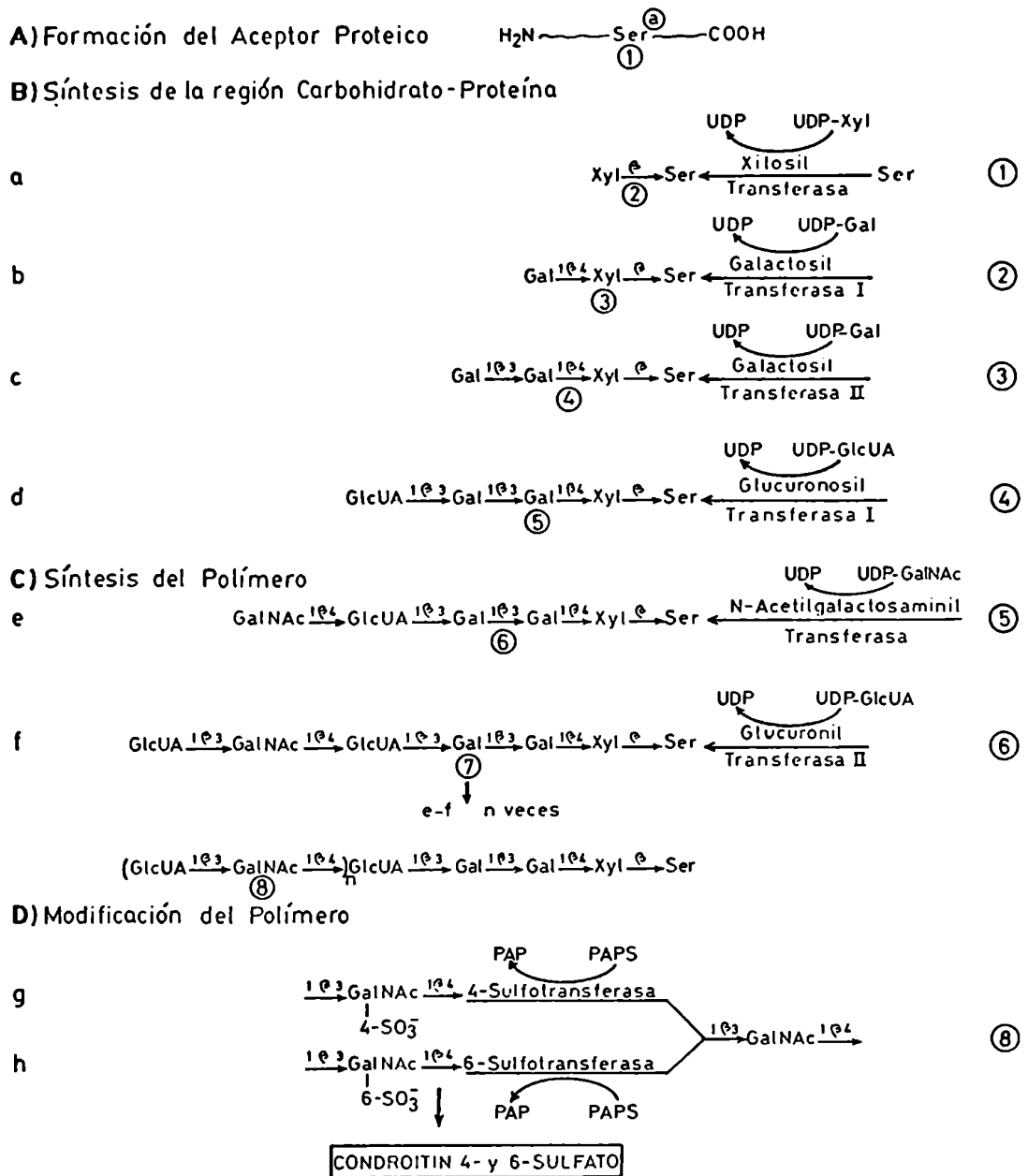


Fig. 4: MECANISMO DE SÍNTESIS DE CONDRITIN 4- Y 6-SULFATO.

(Figura 4 A).

Una vez disponible el aceptor, la cadena de azúcares se inicia por transferencia del resto xilosilo de UDP-Xyl a un residuo serina en el núcleo proteico (Figura 4 B, a). Esta reacción fue demostrada por primera vez por Grebner et al. (38), quienes encontraron que una preparación enzimática cruda de oviducto de gallina incorporaba (^{14}C)xilosa a partir del nucleótido-azúcar radioactivo a aceptores endógenos. La misma reacción se verificó posteriormente en cartílago embrionario de pollo (39) y cerebro, hígado e intestino (40). Dado que los diferentes tejidos sintetizan más de un tipo de polisacárido, y que además, no se han caracterizado los aceptores proteicos, no se ha podido establecer si existen xilosil transferasas específicas para cada polisacárido. Estas enzimas son solubles, y han sido purificadas a homogeneidad a partir de cartílago embrionario de pollo (41) y de un condrosarcoma de rata (42).

La proteína xilosilada actúa entonces como aceptor para la transferencia sucesiva de dos restos galactosilo a partir de UDP-Gal. La primera transferencia (Figura 4 B, b) fue investigada por Robinson et al., quienes demostraron que una preparación enzimática particulada de cartílago embrionario de pollo catalizaba la transferencia de restos galactosilo a partir del correspondiente nucleótido-azúcar, a residuos xilosilo de aceptores endógenos; el producto de la reacción fue caracterizado mediante el aislamiento de galactosil-xilitol radioactivo, después de romper la unión xilosa-serina por tratamiento con borohidruro alcalino (39). Esta reacción es catalizada por la enzima galactosil transferasa I, que en el caso de cartílago embrionario de pollo está unida a membrana. Esta enzima ha sido purificada aproximadamente 1100 veces por extracción con detergentes no iónicos, en presencia de 0,5 M KCl (43). Puede utilizar aceptores exógenos tales como D-xilosa y β -xilósidos como O- β -D-xilosil-L-serina, metil, etil, butil u octil- β -D-xilopiranósido, o p-nitrofenil- β -D-xilopiranósido (43,44). La transferencia es llevada a cabo no sólo "in vitro", sino también "in vivo", ya que el agregado de β -xilósidos a cultivos celulares de tejidos conectivos y no conectivos, permite el crecimiento de cadenas de condroitín sulfato, independientemente de la formación del aceptor proteico (45).

La transferencia del segundo resto galactosilo (Figura 4

B, c) fue demostrada por Helting y Rodén, quienes aislaron 3-O- β -D-galactosil-D-galactosa radioactivo, a partir de un hidrolizado ácido parcial de una mezcla de incubación que contenía UDP-(^{14}C)Gal y una preparación enzimática de cartílago embrionario de pollo (46). Esta reacción es catalizada por la galactosil transferasa II, que es específica para el disacárido 4-O- β -galactosil-D-xilosa; no sirven como aceptores ni galactosa ni otros β -galactósidos (46). También esta enzima está unida a membrana, y ha sido purificada alrededor de 40 veces a partir de cartílago embrionario de pollo (43).

El paso final en la formación de la región de unión carbohidrato-proteína es la transferencia del resto glucuronosilo a partir de UDP-GlcUA, a galactosil-galactosil-xilosil-serina (Figura 4 B, d). La reacción es catalizada por una glucuronosil transferasa distinta de la involucrada en la formación de la unidad disacarídica repetitiva (47). Esta enzima puede utilizar como sustratos a diferentes disacáridos con galactosa en el extremo no reductor.

Una vez sintetizado el tetrasacárido de la región de unión, este sirve como "primer" para el crecimiento del polisacárido. En el caso de condroitín y dermatán sulfatos, la formación del polímero implica la transferencia alternada de restos N-acetilgalactosaminilo y glucuronosilo a partir de los correspondientes nucleótido-azúcares, al extremo no reductor del polisacárido creciente, formando una cadena de disacáridos repetidos (Figura 4 C, e y f). Los polímeros de heparina y heparán sulfato, que tienen la unidad repetitiva ácido glucurónico-N-acetilglucosamina (Tabla IV), se forman de modo similar. Las enzimas involucradas en ambos casos son, respectivamente, una N-acetilgalactosaminil transferasa y una glucuronosil transferasa (48) y una N-acetilglucosaminil transferasa y una glucuronosil transferasa (49), específicas.

Los mecanismos que determinan el largo de las cadenas no están muy claros, aunque se supone que tiene mucha importancia la relación entre "primers" y nucleótido-azúcares disponibles. Así, cuando se agregan β -xilósidos a cultivos, el número de "primers" aumenta, y consecuentemente disminuye el largo de cadena sintetizada (50). Por el contrario, al inhibir la síntesis proteica con cicloheximida, el número de cadenas sintetizadas

disminuye pero aumenta el largo de las mismas (51).

Por último, una vez producida la síntesis del polímero, tiene lugar una serie de modificaciones enzimáticas que llevan a la estructura final de los polisacáridos. En el caso de condroitín sulfato, esto implica la O-sulfatación de las posiciones 4 o 6 de los residuos de N-acetilgalactosamina del polímero, catalizada por sulfotransferasas específicas a partir del 3' fosfoadenil 5' fosfosulfato (PAPS) (52; Figura 4 D, g y h); para dermatán sulfato, además, tiene lugar la epimerización del C₅ del ácido glucurónico y la O-sulfatación en el C₂ del mismo (53). Las modificaciones correspondientes a heparina y heparán sulfato involucran la N-deacetilación de los residuos de N-acetilglucosamina, seguida por la N-sulfatación de los grupos amino libres resultantes, así como también la epimerización del C₅ del ácido glucurónico, y la O-sulfatación en el C₅ de la glucosamina y en el C₂ del ácido idurónico (12).

1.2.2. SÍNTESIS A PARTIR DE INTERMEDIARIOS LIPÍDICOS

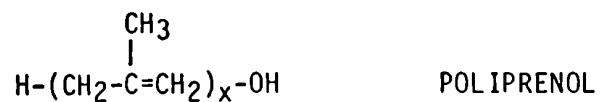
1.2.2.1. POLISACÁRIDOS BACTERIANOS. ANTIGENO O DE Salmonella.

Hacia fines de la década del 60 se demostró que, en bacterias, la síntesis de heteropolisacáridos complejos de la pared celular, tales como el antígeno O del lipopolisacárido de membrana externa de bacterias Gram negativas (54) o el peptidoglicano (55), así como también de polisacáridos capsulares (56-57), involucra la participación de intermediarios sacarídicos unidos a lípidos de membrana. El aceptor lipídico fue identificado como el undecaprenol (54), un poliprenol alílico de 11 unidades isopreno (Tabla V).

En la Figura 5 se describe la estructura del lipopolisacárido de Salmonella anatum; como se observa en la misma, la unidad repetitiva del antígeno O de dicho lipopolisacárido está constituida por el trisacárido manosil-ramnosil-galactosa (58).

La síntesis del polisacárido O de S. anatum está esquematizada en la Figura 6. Los monosacáridos son transferidos secuencial y específicamente desde los correspondientes nucleótido-azúcares al lípido, formándose sobre el aceptor lipídico la unidad repetitiva (Figura 6, reacciones 1 a 3). El primer azúcar, galactosa, es transferido al undecaprenol fosfato como su derivado

Tabla V: LIPIDOS POLIPRENOLES DADORES DE AZUCARES EN LA BIOSINTESIS DE POLIMEROS.



Organismo	Valor de x	Lípido
Bacterias	11	Undecaprenol
Levaduras	14-24	Lípido α -saturado
Mamíferos	17-21	Dolicol (α -saturado)
Plantas superiores	17-28	Dolicol (α -saturado)

Tomado de Ref. 77.

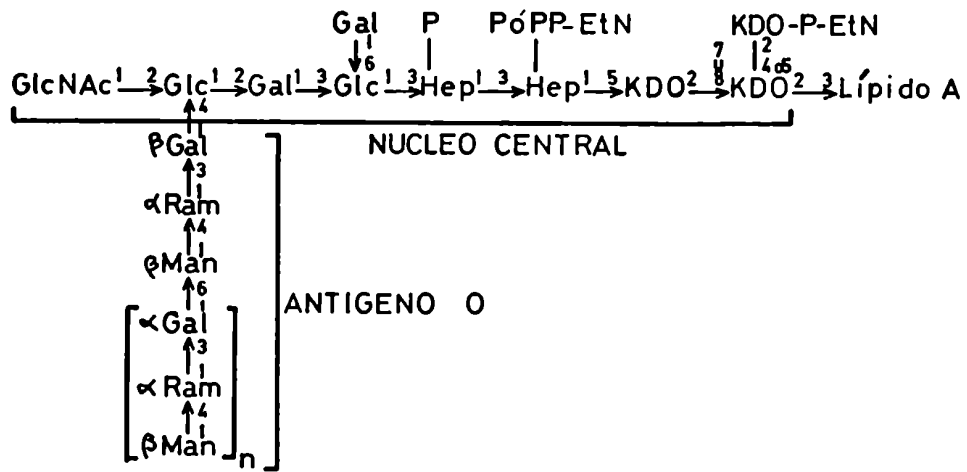


Fig. 5: ESTRUCTURA DEL LIPOPOLISACARIDO DE Salmonella anatum.

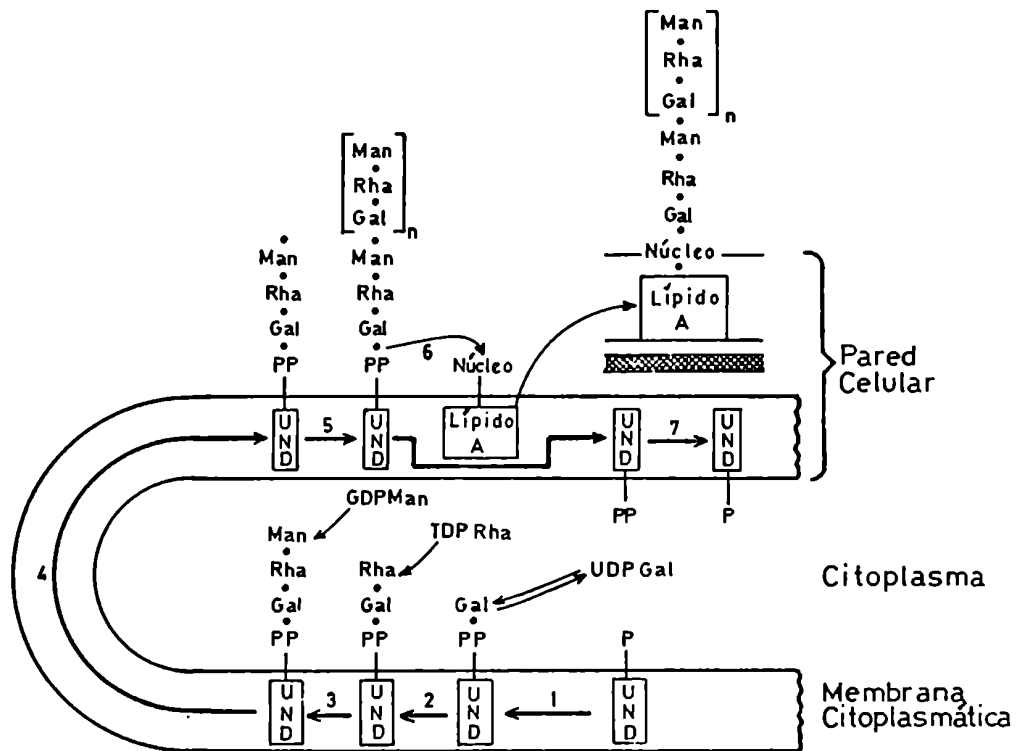


Fig. 6: BIOSINTESIS DEL ANTIGENO O DE *Salmonella anatum*.

1-fosfato (Fig. 6, reacción 1), mientras que los restantes monosacáridos, ramnosa y manosa, son transferidos defosforilados (Figura 6, reacciones 2 y 3). Todas estas reacciones se llevarían a cabo en la cara interna de la membrana citoplasmática, dado que, mientras que las glicosil transferasas y el undecaprenol fosfato están en la membrana, los nucleótido-azúcares son citoplasmáticos (58).

Una vez sintetizada la unidad repetitiva sobre el lípido, tendría lugar el transporte a la cara externa de la membrana (Fig. 6, paso 4), donde ocurriría la polimerización de las unidades repetitivas. En una primera etapa, se cliva la unión galactosa-fosfato de un trisacárido-lípido dador, transfiriéndose el oligosacárido a la manosa terminal de un trisacárido-lípido aceptor. Este proceso se repite varias veces, formándose así una cadena de polisacárido unido al lípido (Figura 6, reacción 5). La cadena creciente actúa siempre como dadora, de modo que el crecimiento del polisacárido se produce por el extremo reductor (59; Figura 7).

Finalmente, el polisacárido preensamblado en el aceptor lipídico es transferido a un aceptor final, el lípido A-núcleo (Figura 6, reacción 6), liberándose undecaprenol-pirofosfato. Este último sirve de sustrato a una pirofosfatasa específica (60), cerrando así el ciclo del poliprenol-fosfato en la membrana (Figura 6, reacción 7).

Mecanismos similares de síntesis se han descrito para el peptidoglicano de Staphylococcus aureus y Micrococcus lysodeikticus (55), para un polisacárido capsular de Enterobacter (Klebsiella) aerogenes (57), para los ácidos teicoicos (61) y teicurónicos (62,63) de la pared de bacterias Gram positivas, y para el xantano (Tabla II), exopolisacárido que es secretado al medio por Xanthomonas campestris (64).

En el caso del xantano, al tratarse de un polisacárido que es liberado al medio, no existe transferencia a un aceptor final. Si bien se ha logrado polimerizar "in vitro" la unidad repetitiva unida al undecaprenol-pirofosfato, no se han detectado intermediarios lipídicos que lleven más de una unidad repetitiva (65). Esto podría indicar que la polimerización y posterior liberación del xantano ocurrirían muy rápidamente.

Por otra parte, se ha demostrado la síntesis "in vitro" de poliprenoles unidos a las unidades repetitivas correspondientes a exopolisacáridos de

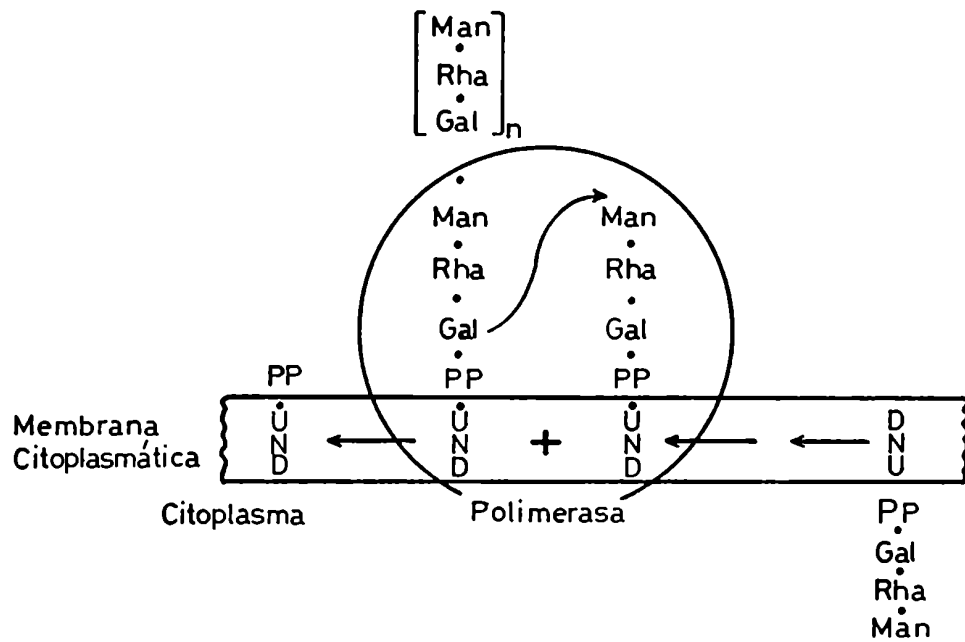


Fig. 7: DIRECCION DE CRECIMIENTO DE LA CADENA DURANTE LA POLIMERIZACION DEL ANTIGENO O DE *Salmonella anatum*.

Rhizobium meliloti (66) y de Acetobacter xylinum (acetano; 67). La síntesis de estos compuestos, aún cuando no se haya logrado su polimerización, sugiere un mecanismo de formación de los respectivos polisacáridos similar al anteriormente descrito (Figura 6).

Por último, si bien originalmente se sugirió la existencia de intermediarios lipídicos involucrados en la síntesis de celulosa de A. xylinum (68), estos intermediarios son, en realidad, precursores del acetano (67), aceptándose actualmente que la formación de celulosa en esta bacteria no requiere la participación de intermediarios lipídicos (69).

1.2.2.2. POLISACARIDOS DE EUCARIOTES. MANANO

Siguiendo el descubrimiento de intermediarios lipídicos en la biosíntesis de polisacáridos complejos bacterianos (sección 1.2.2.1.), se consideró posible que en células eucarióticas existieran compuestos análogos, involucrados en la síntesis de glicoconjugados.

En 1970, Behrens y Leloir (70) demostraron la síntesis de poliprenol fosfato glucosa a partir de UDP-Glc en hígado de rata; el poliprenol fue identificado como dolicol, un poliisoprenol α - saturado de aproximadamente 19 unidades de isopreno (Tabla V). Posteriormente se comprobó la formación de dolicol-pirofosfato-oligosacáridos (71), demostrándose finalmente, gracias a la contribución de numerosos laboratorios, que los mismos son intermediarios en la síntesis de glicoproteínas con unión carbohidrato-proteína de tipo N-glicosídica (36,72). Este tipo de unión, N-acetilglucosamina unida al grupo amido de asparagina, es similar a la ya descrita para los proteoglicanos de keratán sulfato I de córnea (sección 1.2.1.2.; Figura 2).

Según la estructura de las cadenas oligosacáridicas, las glicoproteínas de tipo N-asparagina se clasifican en tres grupos (72; Figura 8):

- a) alta manosa,
- b) complejas,
- c) híbridas.

Como se observa en la Figura 8, los tres grupos tienen una estructura pentasacáridica común, el "core" o núcleo, resultado de un camino biosintético compartido (72).

La estructura del intermediario lipídico precursor de los oligo-

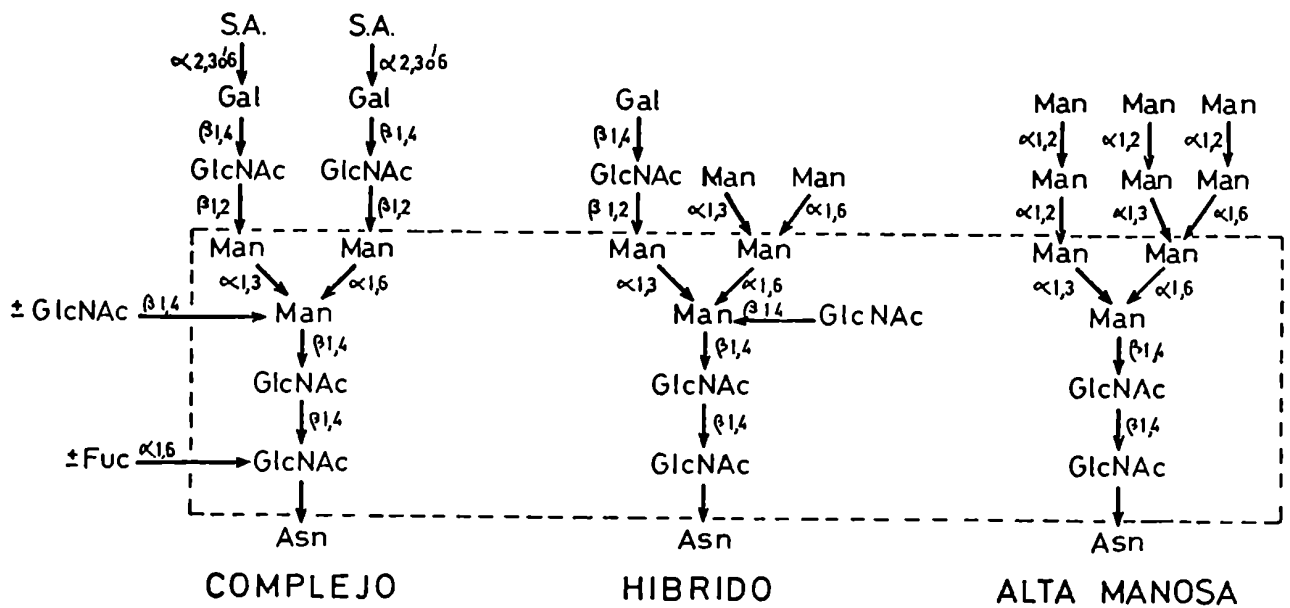


Fig. 8: ESTRUCTURAS DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE OLIGOSACARIDOS UNIDOS A ASPARAGINA.

El área marcada con líneas de puntos encierra el núcleo pentasacarídico común a todas las estructuras.

sacáridos unidos a asparagina fue dilucidada por Li et al. (73; Figura 9). El camino biosintético de este precursor se conoce como ciclo del dolicol (72), y está esquematizado en la Figura 10.

El oligosacárido es ensamblado sobre el aceptor lipídico en el retículo endoplásmico, de modo similar a la síntesis de la unidad repetitiva de los heteropolisacáridos bacterianos, descrita en la sección anterior. Los monosacáridos son transferidos al dolicol fosfato por la acción de glicosil transferasas específicas que actúan de manera secuencial. Los primeros siete azúcares (dos residuos de N-acetilglucosamina y cinco de manosa) derivan de los correspondientes nucleótido-azúcares, mientras que los siguientes monosacáridos (cuatro residuos de manosa y tres de glucosa) provienen de los intermediarios lipídicos dolicol fosfato manosa y dolicol fosfato glucosa.

Después de la adición de los residuos de glucosa, el oligosacárido precursor es transferido en bloque a la proteína, liberándose dolicol pirofosfato. La acción de una pirofosfatasa completa así el ciclo del dolicol.

La transferencia del oligosacárido a la proteína es cotraduccional, ocurriendo simultáneamente al transporte vectorial del péptido naciente a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso (Figura 11, reacción 1). También es cotraduccional la iniciación del procesamiento del oligosacárido precursor unido a proteína, que involucra la remoción de los tres residuos de glucosa y uno de manosa del mismo (Figura 11, reacciones 2 a 4) (72).

Posteriormente, las glicoproteínas siguen viaje hacia su destino final atravesando el aparato de Golgi, donde las cadenas oligosacáridicas son modificadas por remoción y adición de diferentes azúcares, hasta llegar a las estructuras finales descritas en la Figura 8 (Figura 11, reacciones 5 a 11) (72).

En cuanto al papel del ciclo del dolicol en la síntesis de polisacáridos, se ha demostrado su participación en la formación de un polisacárido de pared de levaduras, el manano (74), habiéndose sugerido también un posible rol en la síntesis del keratán sulfato I de córnea (75).

Respecto al manano, este polisacárido estructural se encuentra unido covalentemente a un aceptor proteico. En el caso de Saccharomyces cerevisiae, se ha visto que existen dos tipos de cadenas sacarídicas unidas a la proteína

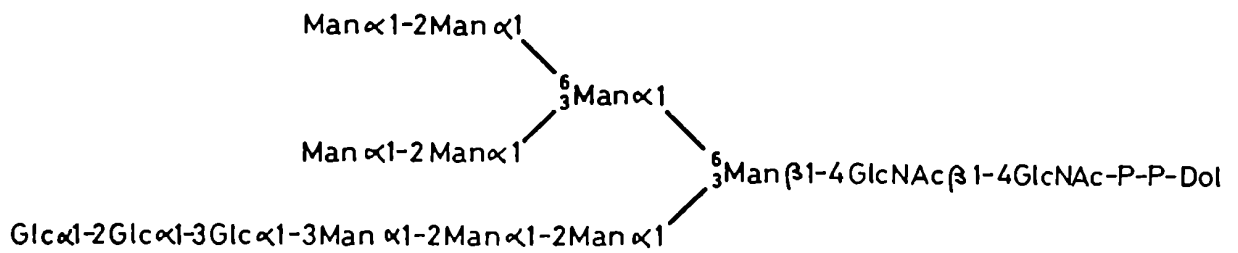


Fig. 9: ESTRUCTURA DEL INTERMEDIARIO LIPIDICO PRECURSOR DE LOS OLIGOSACARIDOS UNIDOS A ASPARAGINA.

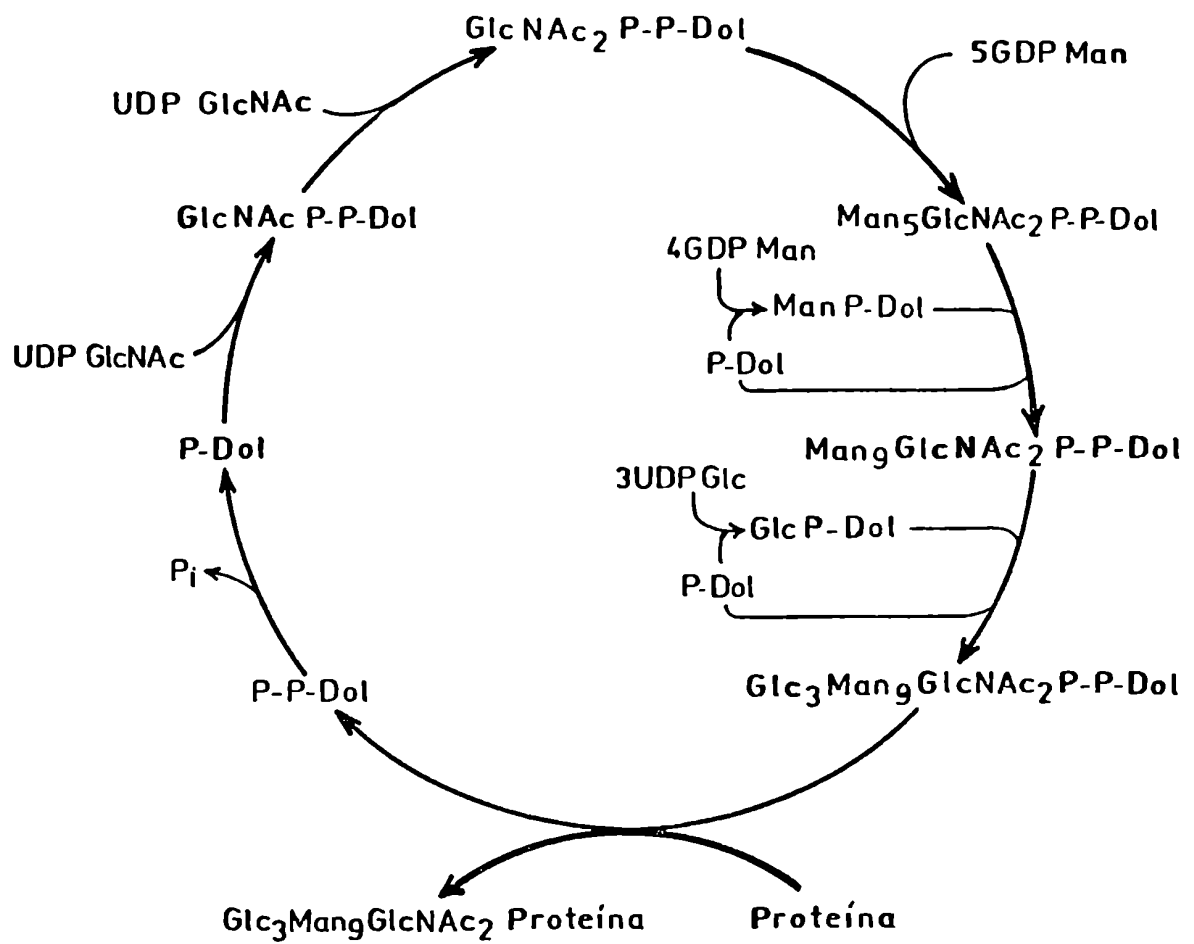


Fig. 10: CICLO DEL DOLICOL.

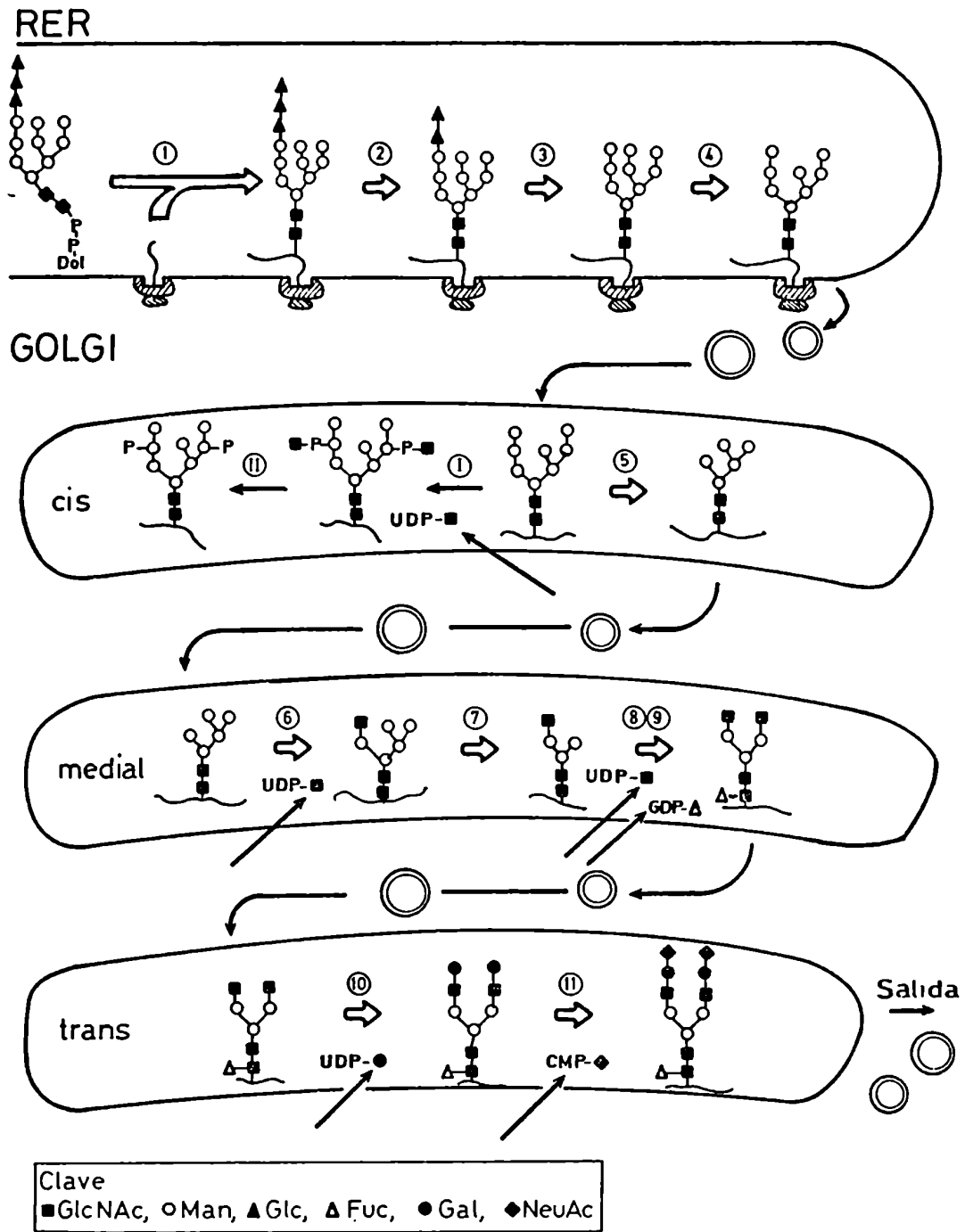


Fig. 11: PROCESAMIENTO DE OLIGOSACARIDOS TRANSFERIDOS A PROTEINA.

(74), con la estructura que se muestra en la Figura 12. El primer tipo se compone de oligosacáridos cortos (manosa, manobiosa, manotriosa o manotetraosa) unidos por una unión O-glicosídica a residuos de serina o treonina del aceptor proteico (Figura 12 A). El segundo tipo está unido N-glicosídicamente a asparagina, y está compuesto por un núcleo interno que contiene dos residuos de N-acetilglucosamina y aproximadamente 12 residuos de manosa, seguido por una cadena externa formada por 100 a 150 restos manosilo (Figura 12 B). Las diferencias entre el núcleo interno y la cadena externa son la existencia de fosfomanosa en la cadena externa, y la presencia de restos de manosa unidos en uniones α 1,3 a la cadena principal, que es α 1,6.

El mecanismo de síntesis de la cadena unida a asparagina se esquematiza en la Figura 13 A (74). Como se observa en dicha figura, el oligosacárido que se transfiere a la proteína tiene la misma estructura que el oligosacárido precursor de glicoproteínas (Figura 9), y al igual que este, es producido por el ciclo del dolicol (Figura 10). La estructura final del polisacárido se logra por un procesamiento del oligosacárido precursor, que implica la remoción de los tres restos de glucosa y uno de manosa, y la posterior incorporación de los restantes residuos de manosa a partir del nucleótido-azúcar, GDP-Man.

Por otra parte, la síntesis de las uniones O-glicosídicas a serina o treonina también involucra la participación de un intermediario lipídico. Como se muestra en la Figura 13 B, la manosa que forma parte de la unión aminoacil-azúcar es cedida por dolicol fosfato manosa, mientras que los restantes restos manosilo adicionados provienen de GDP-Man (76).

Por último, si bien se han descripto distintos poliprenol-azúcares en plantas, no se ha logrado demostrar en ningún caso que sean intermediarios en la síntesis de polisacáridos.

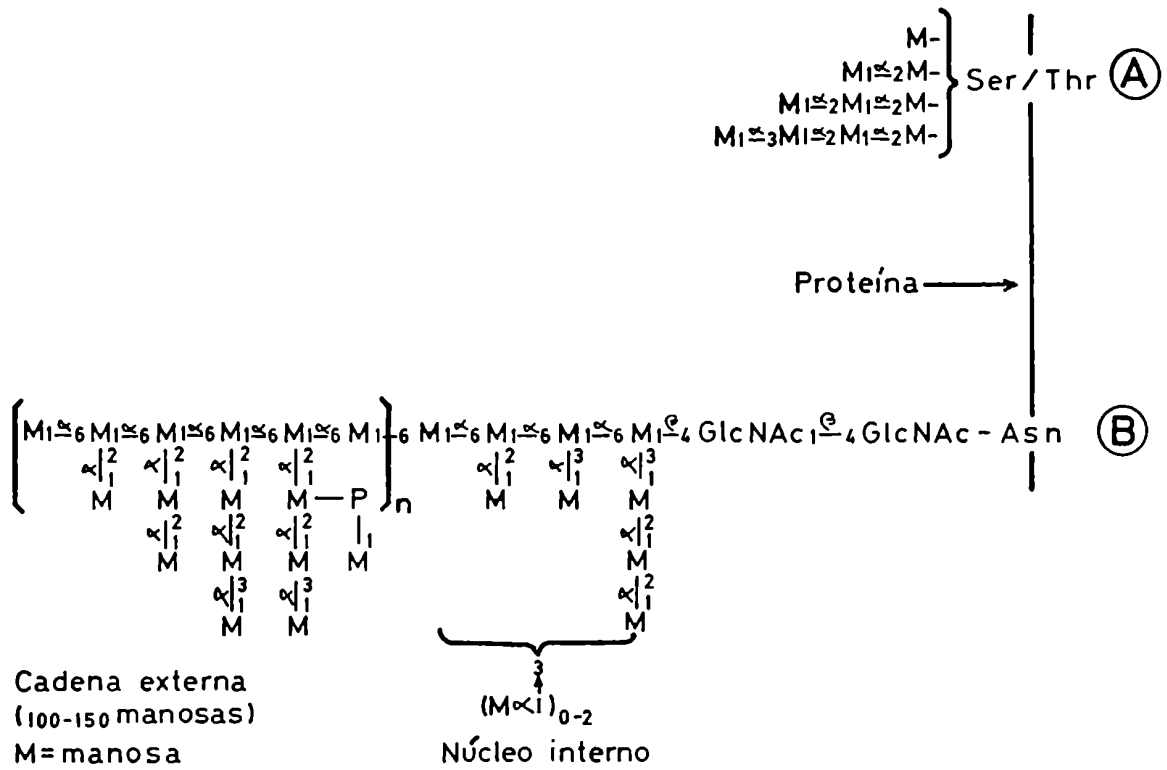


Fig. 12: ESTRUCTURA DE LA PORCIÓN SACARIDICA DEL MANANO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

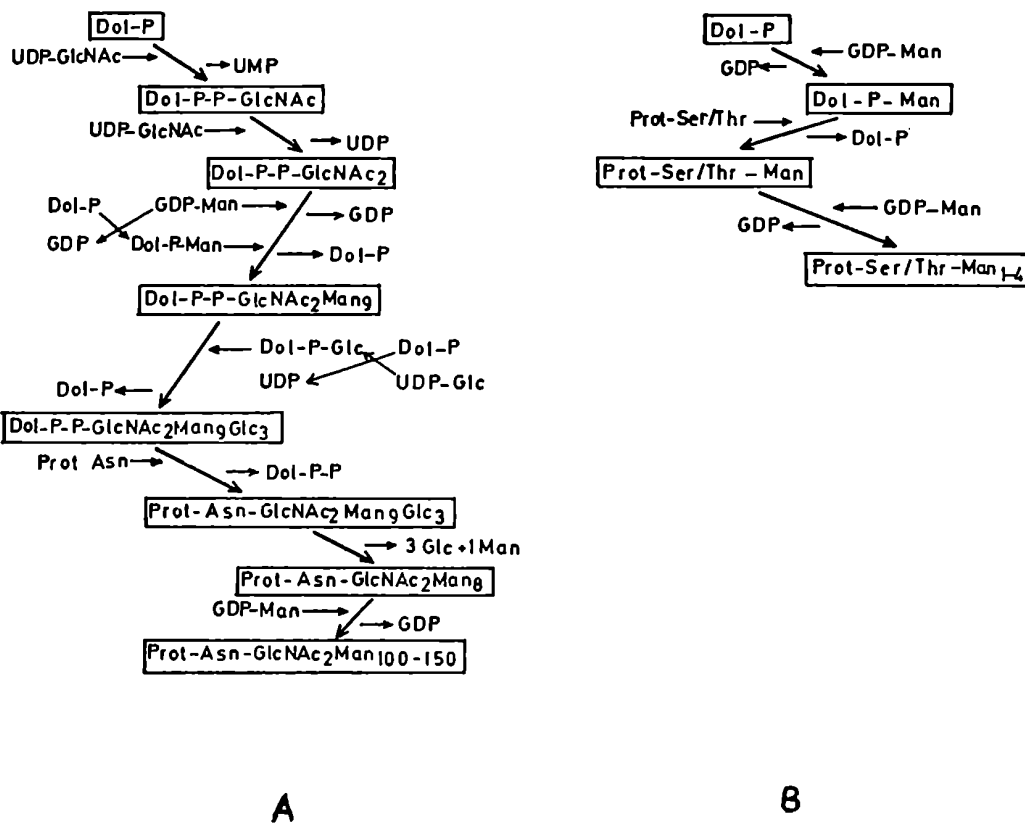


Fig. 13: BIOSINTESIS DE LAS CADENAS SACARIDICAS DEL MANANO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

- A) Cadena unida N-glicosídicamente a asparagina.
- B) Cadena unida O-glicosídicamente a serina/treonina.

1.2.3. SINTESIS A PARTIR DE OLIGO Y POLISACARIDOS

1.2.3.1. SINTESIS A PARTIR DE POLISACARIDOS. RAMIFICACION DE GLUCOGENO Y AMILOPECTINA.

Como se mencionó anteriormente (Tabla I), tanto el glucógeno como la amilopectina son homoglicanos ramificados unidos por uniones glicosídicas α 1,4, con enlaces de tipo α 1,6 en los puntos de ramificación.

Mientras que la síntesis de las uniones glicosídicas α 1,4 se produce por transferencia del resto glucosilo a partir del nucleótido-glucosa correspondiente (ver sección 1.3.2.1.1.), los enlaces glicosídicos α 1,6 se sintetizan por un mecanismo diferente.

La formación de los puntos de ramificación del glucógeno o la amilopectina está catalizada por enzimas llamadas ramificantes. La acción de estas enzimas implica la ruptura de una unión α 1,4 no terminal de un glucano dador del tipo del glucógeno o de la amilopectina, liberando un oligosacárido α 1,4 lineal corto, que es unido nuevamente a una cadena α 1,4 aceptora mediante un enlace glicosídico α 1,6.

Es importante destacar que si bien este mecanismo no produce una incorporación neta de nuevos residuos de glucosa a la cadena, provoca un reordenamiento que tiene fundamental importancia en determinar la estructura final, y consecuentemente en las propiedades, de estos polisacáridos de reserva.

Este mecanismo se describirá con más detalle para el caso del glucógeno en la sección 1.3.2.1.2.

1.2.3.2. SINTESIS A PARTIR DE SACAROSA. DEXTRANOS Y FRUCTANOS.

Ya hemos mencionado anteriormente que la sacarosa puede servir como dador de restos glucosilo o fructosilo para la síntesis de polisacáridos, ya que posee un alto valor de energía libre de hidrólisis (Tabla III).

Se describirá a continuación la síntesis del dextrano de bacterias, como ejemplo de transferencia de restos de glucosa, y del fructano de plantas, para la transferencia de restos de fructosa.

1.2.3.2.1. DEXTRANOS

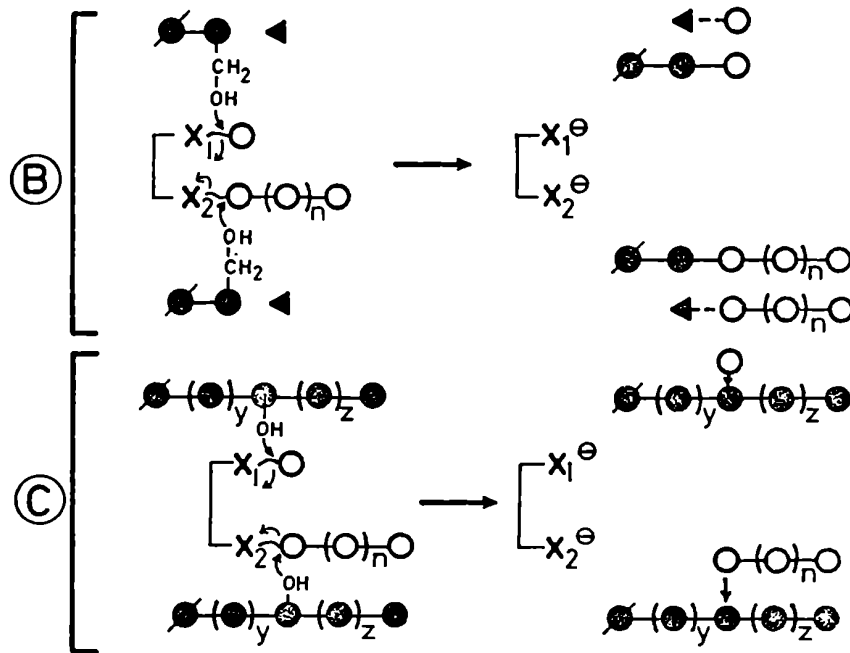
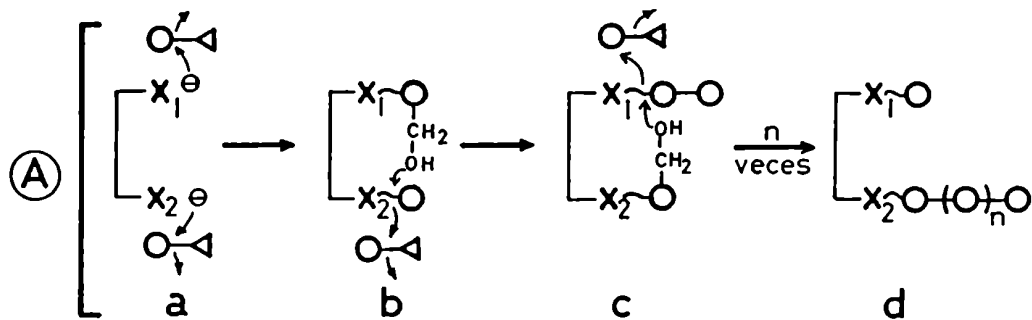
Los dextranos son exopolisacáridos sintetizados por bacterias de los géneros Leuconostoc y Streptococcus, que están involucrados en los procesos de caries dentales. Son homoglicanos de alto grado de polimerización que contienen principalmente uniones glucosídicas de tipo α 1,6, con un número variable de ramas de distinta longitud, unidas en posición α 1,3 (25).

La síntesis del dextrano es catalizada por la enzima dextran-sucrasa, que es una glicosiltransferasa extracelular. Esta enzima utiliza como único dador natural de glucosilo a la sacarosa, habiéndose encontrado que el compuesto sintético α -D-1-fluoroglucosa también sirve como sustrato para la reacción (78).

El mecanismo de acción enzimática ha sido estudiado exhaustivamente por Robyt et al. para el dextrano de Leuconostoc mesenteroides (79-81). Esta bacteria sintetiza un polisacárido que contiene 95% de uniones α 1,6 y 5% de ramificaciones, uniones glucosídicas α 1,3.

La dextran-sucrasa puede actuar en ausencia de un "primer" o aceptor, teniendo lugar entonces la síntesis "de novo" del dextrano. Este mecanismo se estudió mediante técnicas de pulso y "chase" con (^{14}C)sacarosa, usando una preparación parcialmente purificada de dextran-sucrasa, unida covalentemente a esferas de BioGel P-2 (79). Después del pulso, se recuperó la enzima inmovilizada, viéndose que retenía marca radioactiva que podía liberarse por calentamiento durante 10 minutos a 95°C y pH 2. Los compuestos radioactivos liberados fueron identificados como glucosa y dextrano. Después de separada la glucosa, la reducción e hidrólisis ácida del dextrano radioactivo dió una relación ^{14}C -sorbitol a ^{14}C -glucosa de 1:1. El análisis similar de un experimento de pulso con ^{14}C -sacarosa y "chase" con sustrato no radioactivo dió, en cambio, una relación 1:100, sugiriendo que el dextrano es sintetizado por la enzima mediante la transferencia de glucosa a partir de sacarosa al extremo reductor de una cadena creciente de dextrano. Por otra parte, se concluyó también que durante la síntesis existen un resto glucosilo y un dextranosilo unidos covalentemente al sitio activo de la enzima.

El mecanismo de síntesis propuesto (79) se esquematiza en la Figura 14 A. Según el mismo, el sitio activo de la enzima tiene dos nucleófilos



CLAVE

O, ● Glc; ◀, ◀ Fru; ◀ Sacarosa; ◀ Leucrosa; ● Glc reductora;
 — Unión α 1,6; ↓ Unión α 1,3; --- Unión α 1,5

Fig. 14: SINTESIS DEL DEXTRANO DE *Leuconostoc mesenteroides*.

A) Síntesis "de novo" de las uniones α 1,6; B) Reacción de aceptor con fructosa o isomaltosa: liberación de dextrano; C) Reacción de aceptor con dextrano: síntesis de ramificaciones α 1,3.

X1 y X2, nucleófilos del sitio activo.

(X_1 y X_2) que atacan a la sacarosa para dar dos restos glucosilo unidos covalentemente a los nucleófilos a través del C_1 (Figura 14 A, a). En pasos siguientes, el oxhidrilo C_6 de uno de los restos glucosilo hace un ataque nucleofílico al C_1 del otro glucosilo, formándose un enlace $\alpha_{1,6}$, y dejando a su vez libre el sitio nucleofílico desplazado, que puede entonces atacar a otra molécula de sacarosa para dar un nuevo grupo glucosilo unido (Figura 14 A, b). El oxhidrilo del C_6 de este nuevo glucosilo ataca entonces al C_1 del grupo isomaltosilo (Figura 14 A, c). En presencia de sacarosa este proceso se repite, de modo que los grupos catalíticos X_1 y X_2 van teniendo unidos alternadamente un resto glucosilo y la cadena creciente del dextrano (Figura 14 A, d).

El dextrano, entonces, crece a partir de la enzima, por transferencia al sitio activo de restos glucosilo de la sacarosa, e inserción de los mismos entre la enzima y el extremo reductor del dextrano (79).

El mecanismo de liberación del dextrano de la enzima se comprendió al estudiar el efecto de la adición de azúcares de bajo peso molecular a un sistema semejante al recién descrito (80). La dextransucrasa inmovilizada se incubó con sacarosa no radioactiva, y después de recuperarla por filtración de las mezclas de reacción, se la reincubó con ^{14}C -glucosa, ^{14}C -fructosa o ^{14}C -maltosa. En ausencia de sacarosa, la adición de los tres compuestos produjo la liberación de la enzima de dos tipos de productos radioactivos: un dextrano de alto peso molecular, y un oligosacárido de bajo peso molecular. En todos los casos la reducción e hidrólisis ácida de estos compuestos indicó que la radioactividad era reducible, sugiriendo que los aceptores marcados habían sido incorporados al extremo reductor de los productos.

Los oligosacáridos liberados con los distintos aceptores se identificaron como: isomaltosa, con glucosa; leucrosa (α -D-glucosa- α 1,5-D-fructosa), con fructosa, y panosa (6- α -D-glucopiranosilmaltosa), con maltosa.

Cuando la reincubación se hizo en presencia de sacarosa, los aceptores glucosa y maltosa produjeron una serie homóloga de oligosacáridos, con disminución de la producción de dextrano. El estudio de las velocidades de aparición y desaparición de estos oligosacáridos radioactivos, indicó que cada oligosacárido de la serie derivaba del inmediato anterior (así por ejemplo, a partir de maltosa se formaba el trisacárido, a partir de éste el

tetrasacárido, etc.).

Por el contrario, la incubación con fructosa en presencia de sacarosa daba sólo el disacárido leucrosa, al igual que en ausencia de sacarosa. Dado que no se formaba la serie de oligosacáridos, se concluyó que la leucrosa debía ser un muy pobre aceptor, y que por lo tanto, la reacción terminaba con este disacárido.

La leucrosa se produce normalmente con la reacción de la dextran-sucrasa, ya que la fructosa es un producto de la reacción de polimerización a partir de sacarosa. Cuando la concentración de fructosa aumenta, este azúcar puede actuar como aceptor, dando como producto leucrosa y un dextrano con fructosa en el extremo reductor. De este modo se produce entonces la liberación del dextrano de la enzima.

El mecanismo propuesto para la acción de los aceptores se esquematiza en la Figura 14 B (80). Uno de los oxhidrilos de los aceptores actúa como nucleófilo (C_6 para glucosa y maltosa, y C_5 para fructosa), desplazando los grupos glucosilo y dextranosilo del sitio activo de la enzima. Se forma así una unión α glucosídica que da lugar a los dos productos, oligosacárido (Figura 14 B, X_1) y dextrano (X_2). Cuando la reacción ocurre en presencia de sacarosa, los grupos glucosilo y dextranosilo son continuamente regenerados sobre el sitio activo y consiguientemente desplazados por el aceptor. Cuando la concentración del primer oligosacárido producido llega a ser suficientemente alta, este a su vez actúa como aceptor dando lugar al homólogo inmediato superior, que eventualmente repite el proceso. Por lo tanto, los aceptores no actúan como "primers", sino por el contrario, como terminadores de la polimerización (80).

Cuando se realizó un estudio similar usando dextrano no radioactivo de bajo peso molecular como aceptor, y enzima que había sido preincubada con ^{14}C -sacarosa, se vio que toda la radioactividad previamente unida a la enzima se liberaba como dextrano (81). La acetólisis de este dextrano radioactivo dio como resultado 93% de ^{14}C -glucosa y 7% de ^{14}C -nigerosa (D-glucosil- α 1,3-D-glucosa). (La acetólisis rompe más rápidamente las uniones α 1,6 que las α 1,3). La reducción y posterior hidrólisis ácida de la ^{14}C -nigerosa dio el total de la marca en glucosa, indicando que la radioactividad de la nigerosa estaba solamente en la glucosa no reductora. Este

resultado sugirió que el dextrano exógeno había desplazado al grupo dextranosilo radioactivo del sitio activo de la enzima, formando un punto de ramificación α 1,3 entre el C₁ del ¹⁴C-dextranosilo y el oxhidrilo del C₃ del dextrano exógeno.

El mecanismo de formación de puntos de ramificación del dextrano se representa en la Figura 14 C. El oxhidrilo del C₃ de un dextrano aceptor hace un ataque nucleofílico sobre el C₁ del extremo reductor del grupo dextranosilo o del glucosilo unidos al sitio activo de la dextransucrasa, liberándolos del mismo y formando un punto de ramificación α 1,3. Por lo tanto, la biosíntesis del dextrano no requiere aparentemente la participación de una enzima ramificante (sección 1.2.3.1.), ya que la formación de ramas ocurre por reacciones de tipo aceptor (Figura 14 C; 81).

El mecanismo de síntesis propuesto para el caso de L. mesenteroides (Figura 14), ha sido postulado también para la formación del dextrano y del glucano insoluble de Streptococcus mutans (82) y para el dextrano de Streptococcus sanguis (83).

1.2.3.2.2. FRUCTANOS

Los fructanos son homopolímeros de D-fructosa ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde pueden coexistir con el almidón como polisacáridos de reserva (84).

Desde el punto de vista estructural, existen tres tipos de fructanos:

- a) el grupo de la inulina (Dicotiledóneas), con unidades β -(2 \rightarrow 1)-D-fructofuranosilo (Figura 15 A),
- b) el grupo de la fleña (Monocotiledóneas), con unidades β -(6 \rightarrow 2)-D-fructofuranosilo (Figura 15 B), y
- c) el grupo de los fructanos ramificados, con ambos tipos de uniones glicosídicas (Figura 15 C y D).

Los fructanos son de los pocos polímeros naturales en los que el carbohidrato existe en la forma furanósica, lo que le conferiría una mayor flexibilidad estructural (84).

Todos los fructanos tienen en común la presencia de un residuo de D-glucosa terminal unido a la cadena por una unión 2 \rightarrow 1, como en la sacarosa

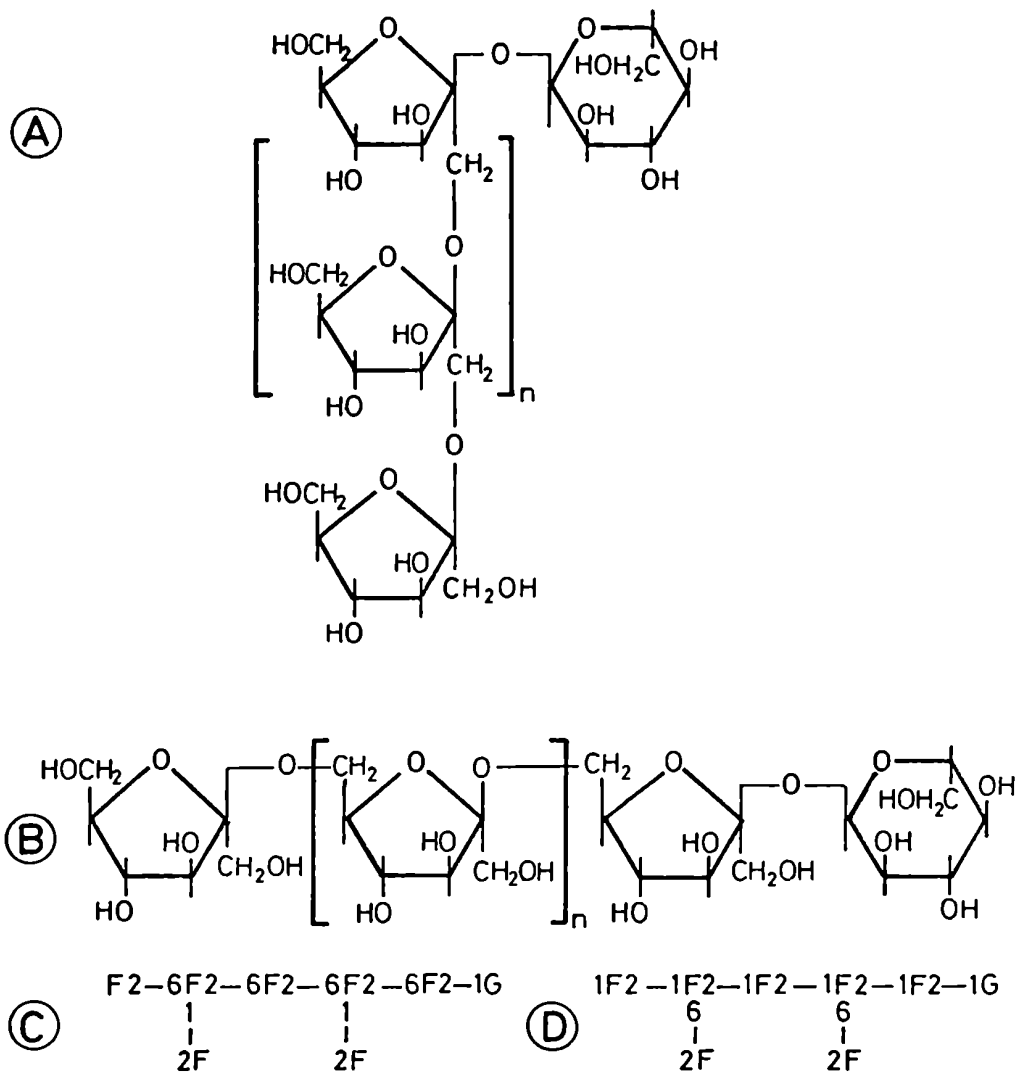


Fig. 15: ESTRUCTURA DE LOS FRUCTANOS.

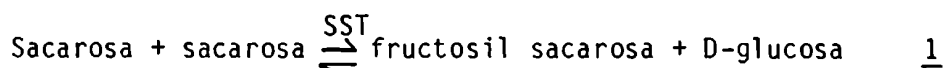
A) Inulinas; B) Fleínas; C) y D) Fructanos ramificados.

(Figura 15).

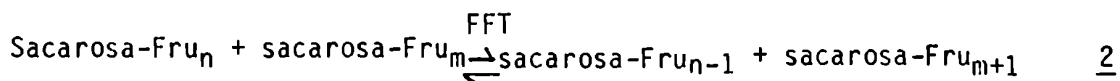
El grado de polimerización varía con la especie, pero en general es bajo comparado con el almidón, variando desde 10-30 en las inulinas a 260 en las fleínas (84).

En cuanto a su biosíntesis, se ha estudiado con mayor detalle el mecanismo de formación de la inulina. Intervienen dos enzimas:

a) La sacarosa-sacarosa transfructosilasa (SST), que cataliza la formación a partir de sacarosa del homólogo inicial del fructano β 2 \rightarrow 1, según la reacción:

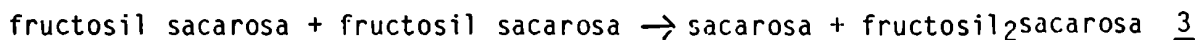


b) β -2 \rightarrow 1-fructan: β -2 \rightarrow 1-fructan-1-fructofuranosiltransferasa (FFT), que transfiere restos terminales de β -D-fructofuranosas desde un dador al extremo de un aceptor según la reacción:



donde n del dador varía desde 1 (trisacárido) hasta 30, y m en el aceptor, de 0 (sacarosa) hasta 30.

Dado que la sacarosa sólo actúa como aceptor para FFT, la síntesis del homólogo superior al trisacárido fructosil sacarosa se produce por la reacción:



La alta afinidad de la sacarosa por FFT hace que a altas concentraciones del disacárido no se sintetice fructano de alto grado de polimerización. Se ha postulado entonces, que las reacciones catalizadas por SST y FFT tendrían lugar en compartimientos celulares separados, citoplasma y cloroplasto respectivamente. El trisacárido formado por SST en el citoplasma (reacción 1) sería convertido por FFT a tetrasacárido en el cloroplasto (reacción 3), liberándose a la vacuola, en tanto que la sacarosa producida en esta reacción volvería al citoplasma. El polisacárido crecería por acción de FFT (reacción 2), y la sacarosa que pudiera producirse volvería al citoplasma, evitando así interferir en la reacción de FFT. Dado que aún no se

ha estudiado la ubicación de SST y FFT, esta hipótesis debe aún ser demostrada (84).

1.3. GLUCOGENO

1.3.1. PROPIEDADES, DISTRIBUCION Y ESTRUCTURA

Como se mencionó anteriormente, el glucógeno es un homopolisacárido de α -D-glucosa, en el que la mayoría de los restos glucosilo están conectados entre sí mediante uniones glicosídicas α 1,4, mientras que los residuos de glucosa correspondientes a los puntos de ramificación presentan uniones α 1,6 (Tabla I).

En la Tabla VI se presentan algunas propiedades comparativas del glucógeno y la amilopectina, componente ramificado del almidón de reserva de tejidos vegetales, que también es un homoglucono con uniones glicosídicas α 1,4 y α 1,6.

En cuanto a su distribución, el glucógeno ha sido identificado en una gran variedad de organismos: vertebrados (7), invertebrados (7), hongos (8,89), algas (9) y bacterias (7). Por otra parte, si bien el polisacárido de reserva de las plantas superiores es el almidón, se ha descrito la presencia adicional de un polisacárido de estructura similar a la del glucógeno en algunas variedades de maíz (90), y en los llamados "cuerpos Mullerian" de la morácea Cecropia peltata (91).

A pesar de la ubicuidad del glucógeno en tejidos de mamíferos (7), los análisis estructurales han sido realizados en su mayoría en hígado y músculo.

El glucógeno hepático se caracteriza por ser polidisperso en cuanto a su peso molecular, variando desde 10^6 a más de 10^9 . Esta variación se refleja también en la estructura, ya que la observación al microscopio electrónico indica que el glucógeno de bajo peso molecular está compuesto por una mezcla heterogénea de esferas de aproximadamente 25 nm de diámetro promedio, llamadas partículas β , mientras que las fracciones de mayor tamaño presentan agregados covalentes de partículas β , de hasta 120 nm de diámetro promedio, las partículas α (92,93).

Respecto al glucógeno muscular, si bien se aceptaba que existía sólo en la forma de partículas β de bajo peso molecular (94), recientemente

Tabla VI: PROPIEDADES COMPARATIVAS DEL GLUCOGENO Y LA AMILOPECTINA.

PROPIEDAD	GLUCOGENO	AMILOPECTINA	REFERENCIA
PESO MOLECULAR	10^6-10^9	10^7-10^8	85,4
LONGITUD PROMEDIO DE CADENA ($\bar{C}L$) (Nº de glucosas)	10-14	20-25	85
LONGITUD DE CADENA EXTERNA ($\bar{E}CL$) (Nº de glucosas)	6-9	12-17	85
LONGITUD DE CADENA EXTERNA DESPUES DE β -AMILOLISIS (Nº de glucosas)	2-3	2-3	86
LONGITUD DE CADENA EXTERNA DESPUES DE FOSFORILASA (Nº de glucosas)	4	4	87
LONGITUD DE CADENA INTERNA ($\bar{I}CL$) (Nº de glucosas)	3-4	5-8	85
CONTENIDO DE PUNTOS DE RAMIFICACION (% de α 1,6)	8-10	4-5	85
% DE DEGRADACION POR CONVERSION A:			
a) MALTOSA			
con α -amilasa	75-85	85-95	86
con β -amilasa	40-50	50-60	86
con β -amilasa e isoamilasa	105-110	100-105	86
b) Glc-1-P con fosforilasa	20-30	35-45	86
c) GLUCOSA			
con glucoamilasa	80-100	80-100	86
con isoamilasa	7-10	4-5	86
COLORACION CON IODO	marrón	púrpura	85
$\lambda_{m\acute{a}x}$ DE ABSORCION CON REACTIVO I_2-Cl_2Ca (nm)	460	520	88

se ha reportado que al realizar la extracción del polisacárido más rápidamente, se detecta también la presencia de glucógeno de alto peso molecular, que responde a diferentes tratamientos de forma similar a la fracción de partículas α del hígado (95).

En cuanto a la relación espacial entre las ramificaciones de la molécula del glucógeno, esta ha sido inferida a partir de estudios teóricos de la conformación de oligosacáridos en solución. En la Figura 16 se esquematiza el modelo de estructura terciaria propuesto por Whelan et al. (96), que es el más aceptado actualmente (93,97). Las partículas β estarían constituidas por dos o tres moléculas de glucógeno unidas a un núcleo proteico, las que a su vez se unirían por medio de puentes disulfuro, para dar las partículas α (93).

La estructura altamente ramificada y el alto peso molecular del glucógeno, le confieren las siguientes propiedades:

- a) Alta solubilidad, por lo que no necesita almacenarse en organelas especiales, como en el caso del almidón vegetal.
- b) Fácil movilización, proporcionando de manera rápida y eficiente la glucosa requerida por el organismo.
- c) Ejerce una presión osmótica mucho menor que la que ejercería una cantidad equivalente de glucosa libre.

Estas características hacen que el glucógeno sea una forma muy conveniente de reserva de hidrato de carbono para el organismo que lo sintetiza.

1.3.2. METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN MAMIFEROS

Las enzimas del metabolismo del glucógeno han contribuido significativamente a la comprensión de la base molecular de la regulación enzimática. Existe, en consecuencia, una enorme cantidad de estudios relacionados con este tema, cuya cita será imposible referir aquí. Nos limitaremos, por lo tanto, a suministrar en forma breve los detalles conocidos hasta el momento, haciendo referencia principalmente a los estudios realizados en músculo esquelético, en particular sobre glucógeno sintetasa. Gran parte de la información ha sido recopilada en artículos de revisión publicados recientemente (7, 98-104).

En la Figura 17 se presenta un esquema de la síntesis y degradación del

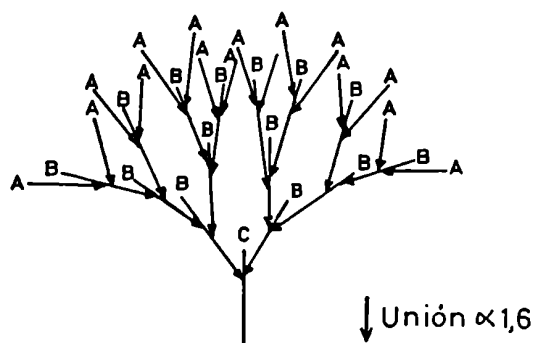


Fig. 16: MODELO DE WHELAN DE LA ESTRUCTURA DEL GLUCOGENO.
A, cadena no ramificada; B, cadena ramificada; C, extremo reductor.

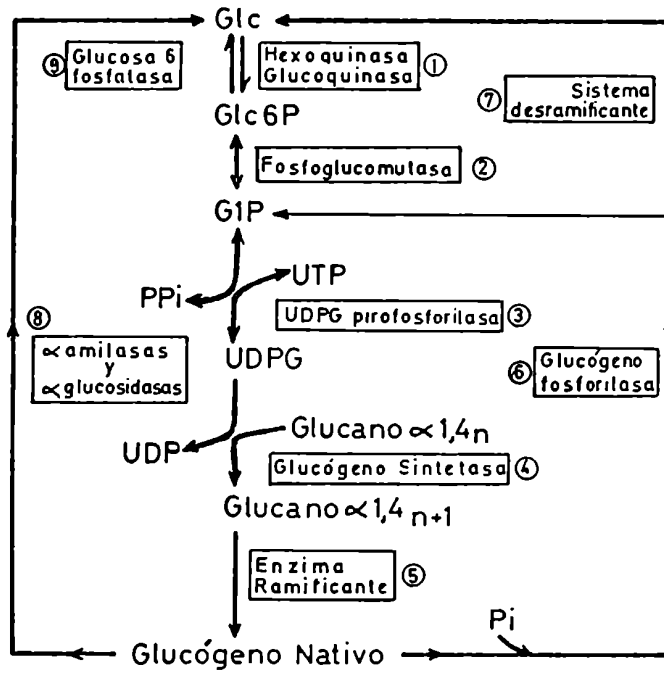


Fig. 17: SINTESIS Y DEGRADACION DEL GLUCOGENO.

glucógeno en mamíferos.

1.3.2.1. SINTESIS

La síntesis de glucógeno utilizando aceptores celulares del tipo del polisacárido, involucra dos etapas:

- a) el alargamiento de las cadenas α 1,4 de estos aceptores, mediado por la enzima glucógeno sintetasa o UDP-Glc: α -1,4-glucan- α -1,4-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.11) (Figura 17, reacción 4), y
- b) la ramificación de las cadenas alargadas, catalizada por la enzima ramificante o α -1,4-glucan- α -1,4-glucan-6-glucantransferasa (EC 2.4.1.18) (Figura 17, reacción 5).

1.3.2.1.1. GLUCOGENO SINTETASA

La síntesis de glucógeno a partir de UDP-Glc fue descrita por primera vez en 1957 por Leloir y Cardini (105), utilizando un extracto de hígado. La enzima involucrada es la glucógeno sintetasa, que cataliza la transferencia de los restos glucosilo del dador UDP-Glc al extremo no reductor de una cadena glucosídica α 1,4, sintetizando una nueva unión α 1,4. La reacción puede escribirse entonces:



Las observaciones originales sobre la estimulación de la glucógeno sintetasa por Glc-6-P (106, 107), sumadas al estudio del efecto de la insulina sobre esta activación en el músculo (108, 109), permitieron reconocer la existencia de diferentes formas cinéticas de la enzima, distinguibles por su sensibilidad a la activación por Glc-6-P, e interconvertibles a través de fosforilación y defosforilación específicas (100, 103, 104). Este descubrimiento inició una serie de estudios sobre la regulación hormonal y no hormonal de la síntesis del glucógeno, que se describirá en la sección 1.3.2.3.

Respecto al estado de fosforilación covalente de la glucógeno sintetasa, se ha establecido que la fosforilación lleva a una forma enzimática menos activa, cuando se la mide en ausencia de Glc-6-P. No obstante, en presencia del activador, la enzima fosforilada tiene una actividad similar a la

forma defosforilada (100, 103). Por el contrario, el agregado de Glc-6-P produce una estimulación muy baja sobre la forma defosforilada (100, 103).

El concepto de dependencia de Glc-6-P para tener actividad enzimática máxima, originó la nomenclatura de I, por independiente, para la enzima defosforilada, y D, por dependiente, para la forma fosforilada. Algunos autores llaman glucógeno sintetasa a (GSa) a la forma enzimática I, más activa, y glucógeno sintetasa b (GSb) a la forma D, menos activa. Dado que la modificación covalente (fosforilación) produce una inactivación enzimática, se ha propuesto que la nomenclatura correcta sea (o-GSa), para la forma enzimática más activa y no fosforilada (original), y (m-GSb), para la menos activa y modificada (110). Es importante destacar que la forma más activa, GSa, contiene siempre algo de fosfato (0,1 - 0,6 mol/mol subunidad; 103).

El efecto diferencial de Glc-6-P ha permitido utilizar el parámetro cinético llamado relación de actividad (%I). Este parámetro es la relación de las actividades enzimáticas medidas en ausencia y presencia de Glc-6-P, expresada en porcentaje, y disminuye al aumentar la fosforilación de la enzima.

No obstante, dado que se ha demostrado recientemente que la regulación de la glucógeno sintetasa de distintos tejidos de mamíferos involucra una múltiple fosforilación de la enzima (100, 101, 103, 104), el modelo de sólo dos formas enzimáticas, I o GSa, y D o GSb, resulta inadecuado. Consecuentemente, el parámetro %I no puede considerarse como la medida de la fracción molar de la forma defosforilada.

La glucógeno sintetasa tiene una alta afinidad por el glucógeno, que hace que normalmente se la extraiga de los tejidos formando un complejo sedimentable con el polisacárido (98). Esta característica ha sido aprovechada para la purificación de la enzima. Así, la mayoría de los métodos de purificación incluye generalmente, como paso inicial, el aislamiento del complejo enzima-glucógeno, ya sea endógeno o inducido por el agregado de polisacárido, en caso que el contenido del tejido sea bajo.

La glucógeno sintetasa ha sido purificada a partir de casi todos los tejidos de mamíferos, fundamentalmente de músculo, hígado, tejido adiposo, corazón, riñón y placenta (103). La enzima de músculo esquelético de

conejo ha sido la más estudiada, habiéndosela purificado en la forma I casi a homogeneidad en varios laboratorios (111-118).

El análisis de estas preparaciones por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, reveló un polipéptido principal de aproximadamente 85.000 de peso molecular (103, 111, 113, 119, 120), así como también algunas especies menores de alrededor de 68.000 a 75.000 daltons. Dado que estas especies menores pueden generarse "in vitro" por proteólisis parcial de la forma de 85.000 daltons (103, 119, 120), es muy probable que constituyan productos de degradación formados durante el proceso de purificación.

El peso molecular de la glucógeno sintetasa nativa, estudiado mediante diversas técnicas, mostró una gran variación, entre 140.000 y 500.000 daltons (100). Estos datos indican que la proteína es oligomérica, pudiendo existir en distintos grados de agregación cuya formación no ha sido aclarada aún. La forma tetramérica parecería ser realmente el estado nativo de la enzima (103).

Por otra parte, los estudios de secuencia y análisis cuantitativos del extremo N-terminal, demostraron la existencia de un solo tipo de subunidad de peso molecular 85.000 (103).

Respecto a las propiedades cinéticas, los estudios realizados muestran una gran complejidad, debido fundamentalmente a la naturaleza oligomérica de la glucógeno sintetasa, a su regulación hormonal y no hormonal que implica fosforilación covalente de la enzima, y también a la variación del cosustrato aceptor que se utiliza en las reacciones.

En lo referido al dador de restos glucosilo, la enzima de mamíferos es específica para UDP-Glc, ya que ADP-Glc, TDP-Glc o pseudoUDP-Glc pueden actuar como dadores, pero con una eficiencia muchísimo menor (98). La enzima también es altamente específica en cuanto al azúcar transferido, no incorporando galactosa, N-acetilglucosamina o maltosa a partir de los correspondientes nucleótido-azúcares (98).

Aunque en la mayoría de los estudios se ha observado una dependencia hiperbólica de la velocidad de reacción respecto a UDP-Glc, con valores de $S_{0,5}$ entre 0,5 y 1 mM (103), también se han descripto algunos casos de comportamiento no michaeliano, con valores de n de Hill menores que 1, que

indicarían cooperatividad negativa entre las subunidades (112, 118).

Por otra parte, respecto al sustrato aceptor, si bien se ha demostrado que tanto glucosa (121) como maltosa y maltotriosa (122, 123) pueden actuar como aceptores de un resto glucosilo del UDP-Glc, las altas concentraciones requeridas para detectar síntesis significativa del homólogo inmediato superior, sugieren que esta reacción no puede ocurrir "in vivo" (121).

En el caso de los maltooligosacáridos como aceptores, la afinidad de la enzima es mayor que para glucosa o maltosa, aunque respecto al glucógeno es por lo menos dos órdenes de magnitud menor, calculando la concentración en cantidad de grupos no reductores terminales (98).

En cuanto a los "primers" polisacáridicos, su capacidad aceptora depende del grado de ramificación, peso molecular y longitud de las cadenas externas, siendo el glucógeno mejor aceptor que el almidón, nativo o solubilizado (98). El $S_{0,5}$ para el glucógeno depende de la concentración de UDP-Glc, variando entre 3,9 y 5,7 $\mu\text{g/ml}$ para valores de UDP-Glc de 0,67 y 3,3 mM, respectivamente (98).

Respecto a Glc-6-P, que es probablemente el efector más importante de la enzima, actúa disminuyendo el $S_{0,5}$ para UDP-Glc, sin afectar demasiado $V_{m\acute{a}x}$ (100, 103). Además, en presencia del activador, las curvas de saturación de UDP-Glc no michaelianas se vuelven hiperbólicas (112). Los valores de $M_{0,5}$ para Glc-6-P varían entre 2 y 50 μM , dependiendo de la concentración de UDP-Glc a la que se realice la curva de saturación del efector (103).

Otros efectores enzimáticos importantes son ATP, ADP, AMP, UDP y Pi, como inhibidores, y sulfato y Mg^{++} , como activadores (100, 103). Es importante destacar que la presencia de Glc-6-P contrarresta el efecto de los inhibidores.

Por último, como ya hemos mencionado, el estado de fosforilación modifica las propiedades cinéticas de la glucógeno sintetasa, importando tanto el grado como la distribución de los grupos fosfato en los sitios fosforilables de la enzima.

Los trabajos llevados a cabo por Cohen et al. permitieron establecer que la glucógeno sintetasa de músculo puede ser fosforilada "in vitro" en siete residuos de serina de la subunidad, por acción de por lo

menos cinco quinasas de proteínas distintas (104, 119). Se demostró asimismo que todos los sitios se encuentran fosforilados "in vitro" (124).

La organización de los sitios fosforilables sobre la cadena polipeptídica se esquematiza en la Figura 18. La proteína quinasa dependiente de cAMP fosforila los sitios 1a, 1b y 2; la fosforilasa quinasa, el sitio 2; la glucógeno sintetasa quinasa-3, los sitios 3a, 3b y 3c; la glucógeno sintetasa quinasa-4, el sitio 2, y la glucógeno sintetasa quinasa-5, el sitio 5 (104).

En general, la fosforilación aumenta el $S_{0,5}$ para UDP-Glc, disminuye el $M_{0,5}$ para los inhibidores como Pi y ADP, y aumenta el $M_{0,5}$ para Glc-6-P (104). La fosforilación de los sitios 3a, 3b y 3c, ó 2, influye en los parámetros cinéticos más que la del sitio 1a, pero dado que los efectos son aditivos, los cambios son mayores cuando los cinco sitios están fosforilados (104). Por el contrario, la fosforilación de los sitios 1b ó 5 no produce variaciones en las propiedades cinéticas de la enzima (104).

A pesar de no haber sido estudiadas tan exhaustivamente como en el caso de músculo esquelético, las glucógeno sintetetasas de hígado (125-127) y de corazón (128, 129) presentan muchas de las propiedades recién descritas.

1.3.2.1.2. ENZIMA RAMIFICANTE

La formación de la estructura ramificada del glucógeno está determinada por la acción concertada de la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante (Figura 17, reacciones 4 y 5).

En la Figura 19 se esquematiza la acción de la enzima ramificante sobre una sección de un glucano α 1,4 lineal. La enzima cataliza la hidrólisis de una unión α 1,4 no terminal (Figura 19 a), y posteriormente une el oligosacárido liberado a una cadena aceptora α 1,4, a través de una unión glucosídica α 1,6 (Figura 19 b y c; 7). La acción implica, entonces, una transglucosilación, donde lo que se transfiere es una cadena de glucosa (C) de un dador a unceptor (A o B).

"In vivo", el sustrato dador es una cadena externa de glucógeno que ha sido alargada por la glucógeno sintetasa hasta una longitud de 10-12 residuos de glucosa. La cadena aceptora, por su parte, podría ser la misma cadena dadora (Figura 19 b) o una cadena externa vecina (Figura 19 c).

La enzima ramificante fue originalmente descrita por Cori y Cori

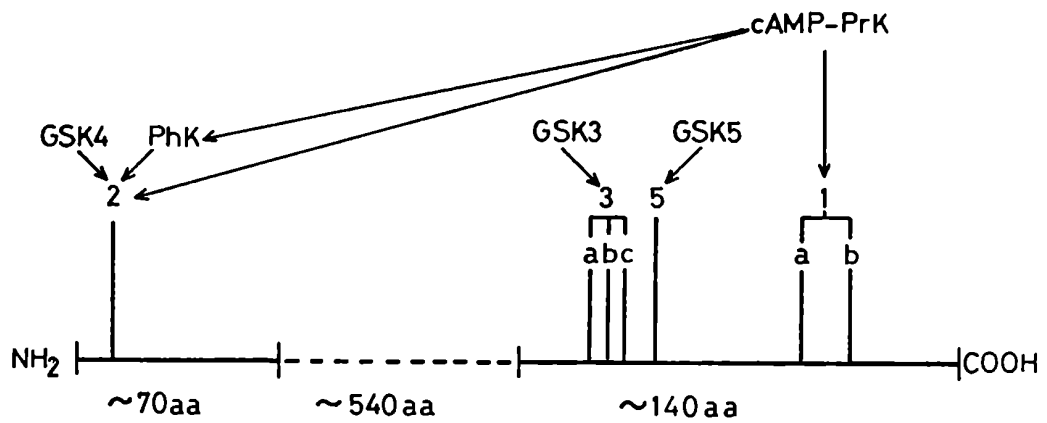


Fig. 18: SITIOS DE FOSFORILACION DE LA GLUCOGENO SINTETASA DE MUSCULO ESQUELETICO DE CONEJO.

cAMP-PrK, quinasa de proteína dependiente de cAMP; PhK, quinasa de fosforilasa; GSK, quinasa de glucógeno sintetasa; aa, aminoácido.

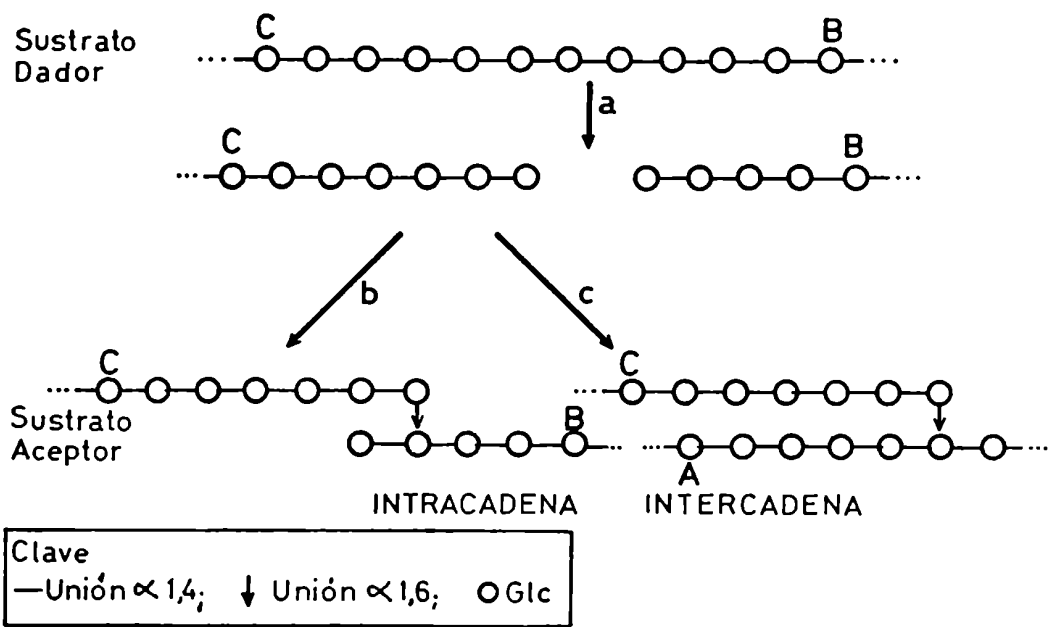


Fig. 19: SINTESIS DE UNIONES GLUCOSIDICAS α 1,6 POR ACCION DE LA ENZIMA RAMIFICANTE.

(130) en extractos de hígado y corazón. La enzima ha sido purificada de hígado (131-133) y de músculo esquelético (134, 135). La enzima es monomérica, y parecería existir en más de una forma en los distintos tejidos (132, 133, 135), habiéndose reportado una especie asociada a RNA en hígado de rata (132). El componente ribonucleoproteico no tendría importancia sobre la actividad enzimática.

El mecanismo de acción de la enzima ramificante de hígado fue estudiado por Verhue y Hers (136). Utilizando glucógeno marcado radioactivamente con (^{14}C)glucosa en las cadenas externas no reductoras, determinaron que la enzima transfería maltohexaosa y, preferencialmente, maltoheptaosa, desde una posición α 1,4 a una unión glucosídica α 1,6. Demostraron asimismo que el oligosacárido es transferido en bloque, y no cada resto glucosilo individualmente.

La enzima ramificante de hígado puede actuar con aceptores como amilosa, amilopectina o dextrina- β -límite de amilopectina (131), siendo los mejores sustratos glucógenos con ramas externas alargadas de al menos 10 ó 12 unidades de glucosa (7).

El mecanismo de síntesis de glucógeno por acción secuencial de las enzimas glucógeno sintetasa y ramificante, se esquematiza en la Figura 20.

1.3.2.2. DEGRADACION

Al igual que la síntesis, la degradación del glucógeno involucra dos etapas:

- a) el acortamiento de las cadenas externas α 1,4, por fosforólisis catalizada por la enzima glucógeno fosforilasa o α -1,4-glucan: ortofosfato glucosil transferasa (EC 2.4.1.1.) (Figura 17, reacción 6), y
- b) la desramificación del polisacárido remanente (dextrina límite de fosforilasa o ψ -dextrina), por acción de la enzima desramificante (EC 3.2.1.33), que posee dos actividades enzimáticas, la oligo-1,4-1,4-glucan transferasa, y la amilo-1,6-glucosidasa (Figura 17, reacción 7).

Existen en mamíferos otras enzimas degradantes del glucógeno, que serán descritas en la sección 1.3.2.2.3. (Figura 17, reacción 8).

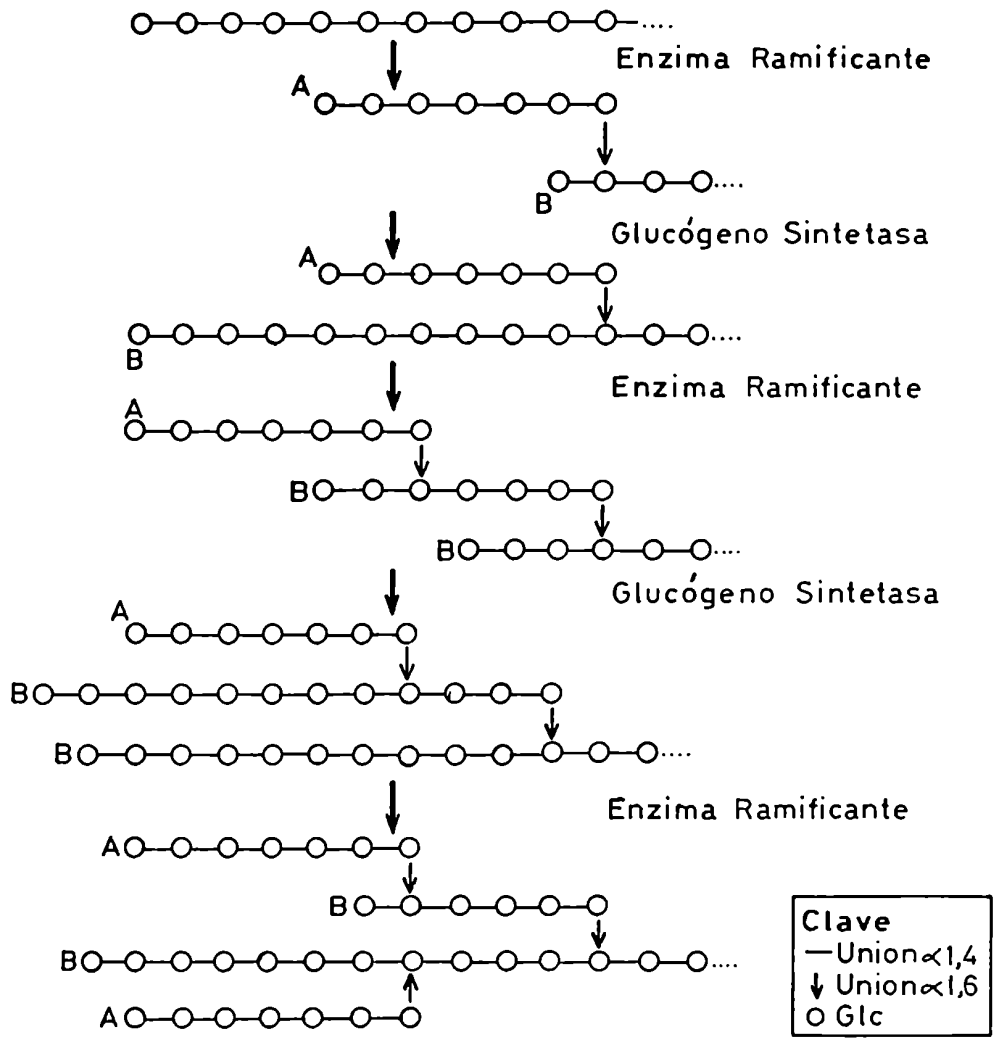
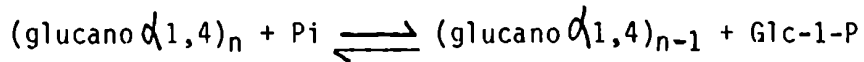


Fig. 20: ACCION SECUENCIAL DE GLUCOGENO SINTETASA Y ENZIMA RAMIFICANTE.

1.3.2.2.1. GLUCÓGENO FOSFORILASA

La fosforilasa cataliza el primer paso en la degradación intracelular del glucógeno, produciendo, en presencia de Pi, la liberación de restos glucosídicos $\alpha_{1,4}$ a partir de los extremos no reductores de las cadenas externas, formándose Glc-1-P según la siguiente reacción:



A pesar de que el equilibrio de esta reacción a pH 6,8 es 0,28, la enzima funciona "in vivo" en el sentido de la degradación del polisacárido, ya que la relación de las concentraciones de Pi a Glc-1-P es mucho mayor que la constante de equilibrio (102).

En cuanto al mecanismo de acción, Walker y Whelan demostraron que la enzima detiene su acción degradativa antes de un punto de ramificación, dejando en las cadenas A y B (Figura 16) 4 restos glucosilo (87). El remanente de la molécula de glucógeno no degradada se conoce como dextrina límite de fosforilasa o ψ -dextrina.

La fosforilasa fue descrita originalmente en músculo, encontrándose que requería AMP para su actividad (137). Posteriormente se demostró la existencia de otra forma enzimática, activa en ausencia de AMP (138).

Al igual que las formas a y b de glucógeno sintetasa (sección 1.3.2.1.1.), ambas formas de fosforilasa son interconvertibles por fosforilación covalente, regulada hormonal y no hormonalmente (102). Esto ocurre tanto en músculo como en hígado (99). Asimismo, la enzima tiene como cofactor al fosfato de piridoxal (7, 102).

La fosforilasa b muscular, que es inactiva en ausencia de AMP, es activada alostéricamente por este nucleótido, y es inhibida por ATP, ADP y Glc-6-P (7, 102). En cambio, en hígado el AMP tiene poco efecto sobre la fosforilasa b, excepto en presencia de Na_2SO_4 , F^- , solventes orgánicos o alta concentración de sustrato (99, 139). La falta de activación por AMP parecería deberse al poco acoplamiento entre el sitio activo y el sitio del activador de la enzima (139).

Por su parte, la fosforilasa a difiere de la forma b por tener un grupo fosfato en la Ser-14 del polipéptido, y por no tener los controles

alostéricos, ya que no presenta requerimiento absoluto de AMP, y no es inhibida apreciablemente por ATP y Glc-6-P, aunque sí por glucosa (102). Las propiedades cinéticas de las formas a de hígado y músculo son similares (99).

En cuanto al tamaño, los estudios originales de la enzima de músculo indicaban que la fosforilasa b tenía la mitad del peso molecular de la forma a. Posteriormente se demostró que la especie a era tetramérica y la b, dimérica, disociándose ambas en las respectivas subunidades por tratamiento con reactivos de grupos -SH (102).

Si bien se postuló entonces que la transformación de la fosforilasa b en a implicaba el pasaje del dímero al tetrámero, actualmente se acepta que las propiedades enzimáticas de la fosforilasa a no se deben a su existencia como tetrámero. Así, en algunas especies y en tejidos como el hígado, la forma a es dimérica, al igual que la correspondiente forma b (99, 102). Más aún, la fosforilasa a de músculo es activable por el glucógeno, que induce el pasaje de tetrámero poco activo, a dímero mucho más activo (140).

En cuanto a las subunidades, por distintos criterios se ha visto que son de un solo tipo. La correspondiente a fosforilasa a de músculo se ha secuenciado totalmente, consistiendo en un polipéptido de 641 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 97.412, que incluye un grupo fosfato, un acetilo y un piridoxal-fosfato (141).

Por último, es importante destacar que existen al menos tres tipos de isoenzimas: M (muscular), L (hepática) y B (cerebro, tejidos fetales y hepatomas) (142). En el caso de corazón de rata, se ha reportado recientemente la existencia de dos formas nativas de fosforilasa b, una que correspondería al tipo M, y otra que sería del tipo B, o bien de tipo específico del corazón (143).

1.3.2.2.2. SISTEMA DESRAMIFICANTE

Como se mencionó anteriormente, la acción de la fosforilasa sobre la molécula de glucógeno deja una Ψ -dextrina límite ramificada. Por lo tanto, para que la fosforilasa pueda seguir degradando el polisacárido, se debe eliminar el punto de ramificación.

La desramificación de la Ψ -dextrina tiene lugar en dos etapas sucesivas (Figura 21) (7). La actividad de oligo-1,4 \rightarrow 1,4 glucan-

transferasa hidroliza una unión α 1,4 de una cadena A y transfiere maltotriosa a una cadena vecina (Figura 21 a), dejando expuesta la glucosa del punto de ramificación. Actúa entonces la amilo-1,6 glucosidasa, que hidroliza la unión α 1,6, liberando glucosa (Figura 21 b).

Puede entonces volver a actuar la fosforilasa, dejando una nueva dextrina límite que será sustrato para el sistema desramificante.

El sistema de desramificación fue purificado originalmente de músculo, sin que se pudieran separar las actividades enzimáticas, sugiriéndose que ambas estarían asociadas a una misma proteína (144). Posteriormente, la enzima se purificó a homogeneidad, comprobándose que es una proteína monomérica de peso molecular 160.000, que tiene las dos actividades enzimáticas (145).

1.3.2.2.3. OTRAS ENZIMAS DEGRADANTES DEL GLUCOGENO

La degradación no fosforolítica del glucógeno puede llevarse a cabo "in vitro" por otros dos tipos de enzimas de mamíferos, las α -amilasas y las α -glucosidasas.

- a) α -amilasa: Esta enzima, cuyo rol fisiológico se desconoce, se encuentra en hígado, sangre, páncreas y saliva. Es una endoenzima que hidroliza uniones glucosídicas α 1,4. Su mecanismo de acción implica dos etapas (146). En la primera, libera maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa, y algo de maltosa, a partir de los extremos no reductores del polisacárido. En la segunda etapa, libera maltosa y oligosacáridos ramificados, por degradación del interior de la molécula.
- b) α -glucosidasa: Las α -glucosidasas ácidas de lisosomas de hígado (147, 148) son exoenzimas que catalizan la hidrólisis de las uniones α 1,4 y α 1,6 glucosídicas, degradando, por lo tanto, completamente el glucógeno a glucosa. Estas enzimas actuarían en la degradación del glucógeno fagocitado por los lisosomas.

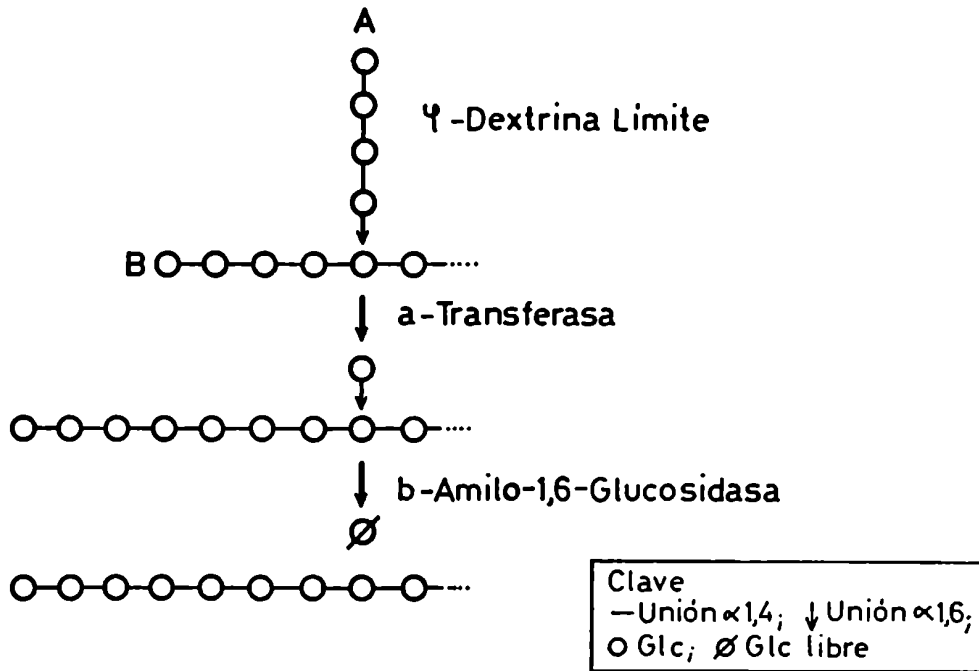


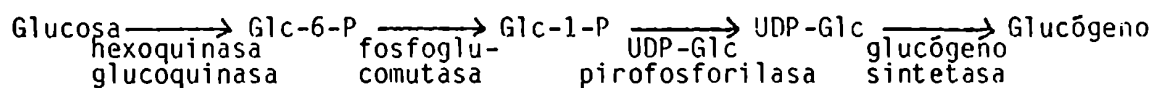
Fig. 21: MECANISMO DE ACCION DEL SISTEMA DESRAMIFICANTE.

1.3.2.3. REGULACION

La mayor parte del glucógeno de mamíferos se encuentra en hígado y músculo esquelético, donde cumple papeles diferentes. El glucógeno es poco utilizado como fuente de energía en el hígado, que consume principalmente ácidos grasos, pero almacena glucosa en forma de glucógeno cuando es abundante, y la libera en beneficio de otros tejidos, especialmente cerebro y eritrocitos, durante el ayuno (99).

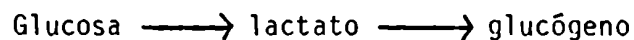
En cambio, en el músculo esquelético, el glucógeno es la principal fuente de energía para la contracción muscular. Cuando el músculo se contrae, el glucógeno es degradado para producir ATP, que mantiene la contracción, formándose además ácido láctico. Gran parte del ácido láctico llegaría al hígado por la circulación, pudiendo convertirse en glucógeno hepático y luego en glucosa sanguínea, o en glucosa sanguínea directamente (149). Dado que una proporción de la glucosa circulante llegaría de vuelta al músculo, se puede considerar este sistema como un ciclo, conocido como ciclo de Cori.

El papel del hígado como regulador de los niveles sanguíneos de glucosa ha sido cuestionado. Se aceptaba generalmente que la glucosa ingerida después de un ayuno era removida de la circulación portal, y convertida en glucógeno según la llamada vía directa, que se esquematiza a continuación (7):



Esta vía de síntesis se contradecía con la observación realizada en muchos laboratorios, de que la glucosa, aún en condiciones suprafisiológicas y en presencia de insulina, es un precursor muy malo para la síntesis de glucógeno, tanto en hígado de rata perfundido como en hepatocitos aislados (150). En cambio, en presencia de glucosa, precursores gluconeogénicos (fructosa o lactato) y ciertos aminoácidos (Ala, Gln), las preparaciones de hígado sintetizan glucógeno a velocidades apreciables (150). Esta observación, conocida como la "paradoja de la glucosa", sugirió que la llamada vía directa puede no tener gran importancia "in vivo".

Estudios realizados recientemente con ratas ayunadas inyectadas con (U-¹⁴C, 3-³H)glucosa, sugirieron que la mayor parte del glucógeno sintetizado en respuesta al carbohidrato exógeno (70-90%) se forma según una vía indirecta (151). La glucosa se metabolizaría primero a nivel de triosa, y la síntesis subsiguiente de glucógeno dependería del flujo de carbono, probablemente lactato, a través de gluconeogénesis. La vía indirecta sería entonces:



La producción de triosa sería extrahepática, probablemente en intestino y/o músculo. Esta hipótesis coincide con la formulación original del ciclo de Cori, mencionada al comienzo de esta sección.

Contradiendo en parte estos estudios, se ha demostrado que la vía de síntesis de glucógeno a partir de glucosa depende del estado metabólico previo del animal (152). Así, en hepatocitos de ratas ayunadas, se observó la síntesis por la vía indirecta, mientras que en células obtenidas de ratas alimentadas, los resultados indicaron el uso de la vía directa. La existencia de la vía directa en hepatocitos en cultivo, indicó además que esta vía puede funcionar "in vivo", no requiriéndose que la ruptura inicial de la glucosa a triosa sea extrahepática.

Durante la alternancia de alimentación y ayuno corto, la glucemia es mantenida dentro de límites normales debido a los grandes cambios que se producen en la velocidad de síntesis y degradación del glucógeno. Estos cambios son controlados estrechamente, a través de mecanismos homeostáticos y hormonales, por la disponibilidad de glucosa en el cuerpo.

Como se ha visto en las secciones anteriores, las etapas limitantes en la síntesis y degradación del glucógeno están catalizadas por la glucógeno sintetasa y la glucógeno fosforilasa, respectivamente. Ambas enzimas existen en dos formas: a, que es activa, y b, que es inactiva en las condiciones iónicas prevalecientes en la célula. Las formas a y b son interconvertibles a través de la fosforilación por quinasas y defosforilación por fosfatasas, tal como se indica en la Figura 22 (99, 104, 149). Esta interconversión está regulada hormonalmente (en músculo, por adrenalina, glucogenolítica, e insulina, glucogenogénica; en hígado, además, por noradrenalina y glucagon, ambas hormonas glucogenolíticas) y no hormonalmente (en músculo, por iones

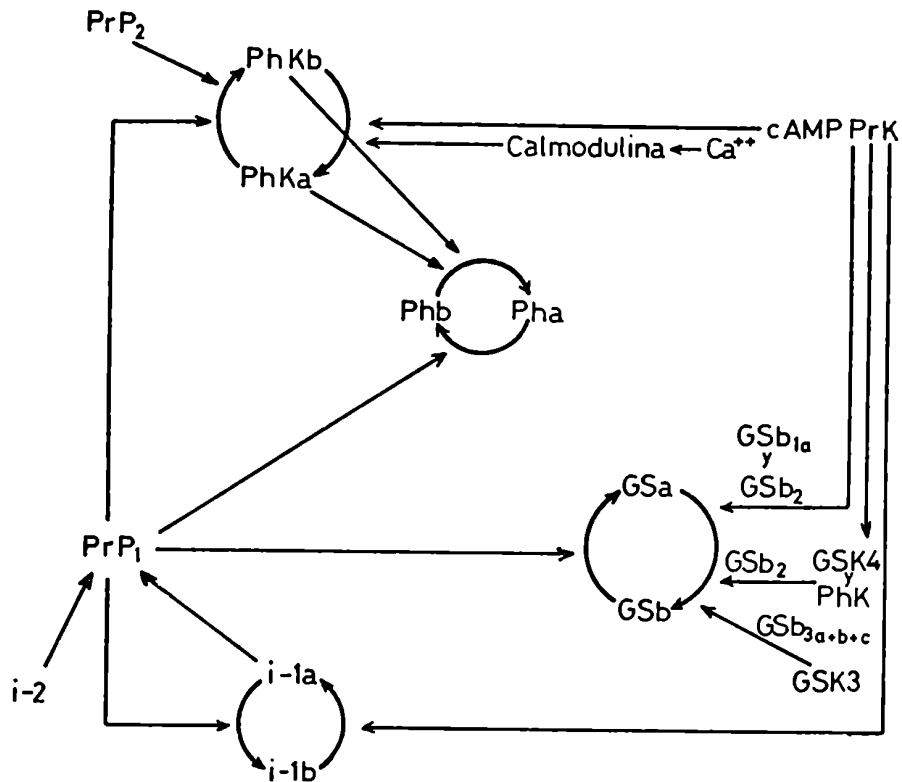


Fig. 22: REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN MUSCULO ESQUELETICO.
 Ph, fosforilasa; PhK, quinasa de fosforilasa; GS, glucógeno sintetasa; GSK, quinasa de glucógeno sintetasa; cAMP-PrK, quinasa de proteína dependiente de cAMP; PrP, fosfatasa de proteína; i, inhibidor de PrP; a, forma activa; b, forma menos activa.

Ca⁺⁺ liberados por estímulo nervioso, glucogenolítico).

La interconversión enzimática está controlada de manera coordinada, de modo que la activación de una de las enzimas es paralela a la inactivación de la otra, jugando la fosforilasa quinasa un papel importante en esta coordinación. En la Figura 23 se esquematiza el control nervioso y hormonal del metabolismo del glucógeno en músculo esquelético.

En animales alimentados normalmente, la glucógeno sintetasa muscular contiene 3 moles de fosfato/mol de subunidad, de los cuales más del 40% está en los sitios 3a + 3b + 3c (Figura 18) (124). Después de administrar adrenalina, la actividad enzimática disminuye, aumentando el contenido de fosfato a 5 moles/mol de subunidad. El aumento se produce fundamentalmente en los sitios 3a, 3b y 3c y 2. Estos resultados indicarían que la glucógeno sintetasa quinasa 3 tiene un papel preponderante en la determinación de las propiedades cinéticas de la glucógeno sintetasa muscular (124). Confirmando estos estudios, recientemente Cohen et al. (153) informaron que la administración de insulina produce una disminución específica del contenido de fosfato en los sitios 3a + 3b + 3c (0,4-0,45 mol/mol subunidad), que se ve acompañada por un aumento en la actividad enzimática. Por lo tanto, aunque se desconoce el mecanismo molecular de la acción de la insulina, el mismo involucraría la glucógeno sintetasa quinasa 3 y también a las fosfatasas 1 y 2A que defosforilan normalmente la glucógeno sintetasa muscular (153).

1.4. ANTECEDENTES RECIENTES Y OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION

1.4.1. SINTESIS "DE NOVO" DE GLUCOGENO

El mecanismo celular operante en la síntesis del glucógeno, esto es, la necesidad de un "primer" para la reacción de la glucógeno sintetasa, planteó desde un primer momento el problema de la síntesis "de novo" de este polisacárido.

Goldenberg demostró en 1962 que una preparación parcialmente purificada de glucógeno sintetasa de músculo de rata podía utilizar maltosa o maltotriosa como aceptores de glucosa de UDP-Glc, para dar los homólogos inmediatos superiores (122). Sin embargo, la alta concentración de aceptores usada y la baja eficiencia de las transferencias permite descartar un papel

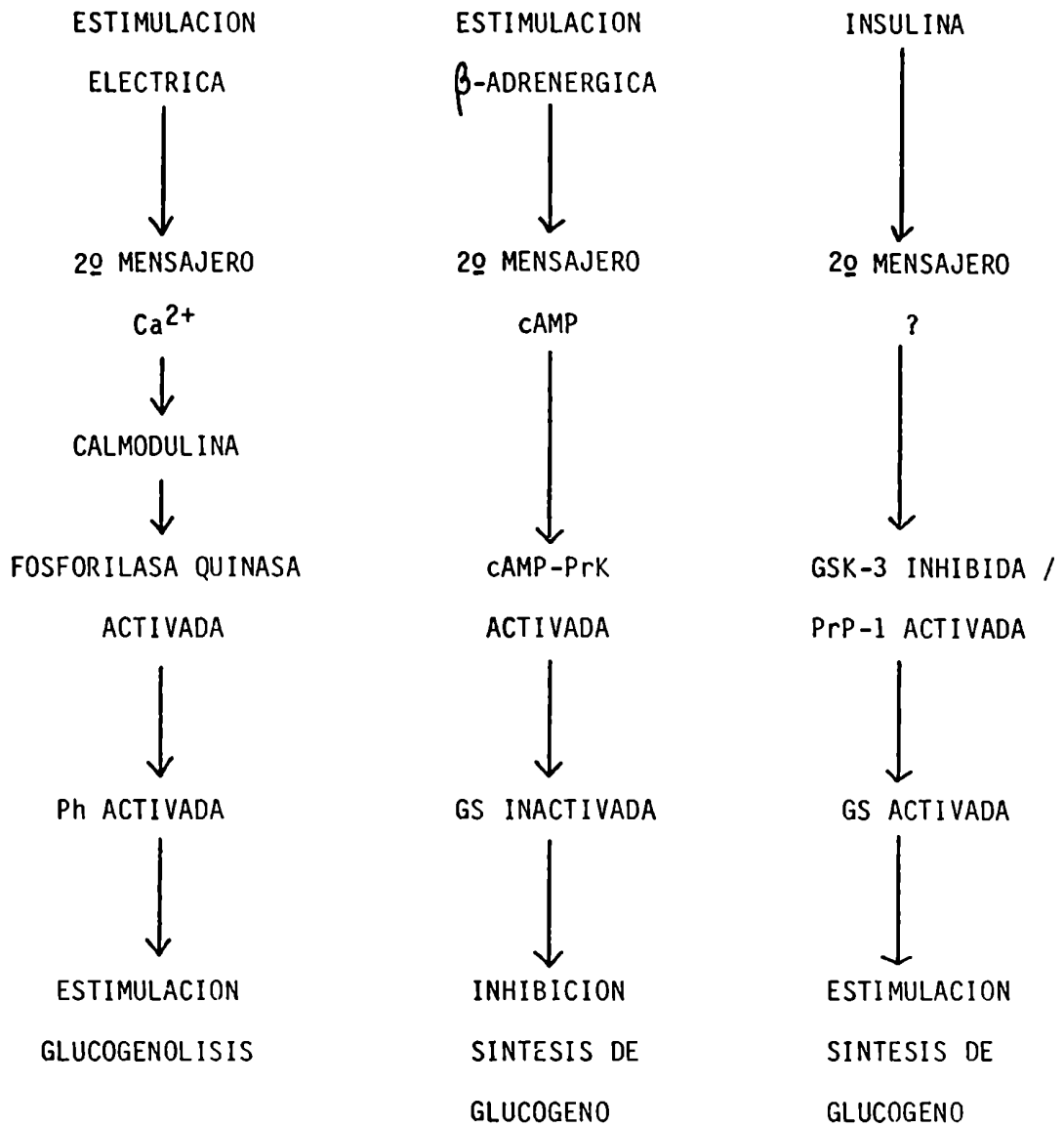


Fig. 23: CONTROL HORMONAL Y NERVIOSO DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN MUSCULO ESQUELETICO.

Abreviaturas como en la Fig. 22.

fisiológico para las mismas. De modo similar, Larner et al. demostraron posteriormente que una preparación altamente purificada de glucógeno sintetasa de músculo de conejo catalizaba la síntesis de maltosa a partir de UDP-Glc y glucosa (121). Nuevamente, la alta concentración de glucosa requerida para observar una síntesis significativa de maltosa, hizo descartar a los propios autores la posibilidad de que la glucógeno sintetasa pudiera utilizar "in vivo" aceptores tan pequeños como glucosa, maltosa, maltotriosa, etc.

El origen del "primer" para la síntesis del glucógeno se había planteado aún antes de describirse la existencia de la glucógeno sintetasa (105). En 1951, Feigin et al. informaron que una preparación de fosforilasa de músculo de conejo era capaz de sintetizar glucógeno en ausencia de aceptor (154). Estos resultados fueron corroborados con posterioridad por Cori et al., utilizando preparaciones más purificadas (155, 156), pero las evidencias fueron dejadas de lado al demostrarse más tarde la existencia de "primer" contaminando el sustrato Glc-1-P usado en la reacción (157).

La fosforilasa también fue involucrada en la síntesis "de novo" del glucógeno en algas azul-verdosas. En base a la demostración de la síntesis del polisacárido catalizada por una isoenzima de fosforilasa en ausencia de "primer" (158), Fredrick postuló la siguiente hipótesis: existiría en algas una enzima, la UDP-Glc: proteína transglucosilasa, que glucosilaría los grupos -OH de los residuos serina de la fosforilasa. Estos residuos glucosilados en la enzima actuarían como "primers" para la fosforilasa, la que los alargaría a partir de Glc-1-P, hasta que tuvieran el largo adecuado como para ser sustratos de la UDP-Glc: glucosiltransferasa.

Por otra parte, un mecanismo distinto fue propuesto por Gahan y Conrad, quienes estudiaron la síntesis "de novo" del glucógeno en la bacteria Aerobacter aerogenes (159). Estos investigadores encontraron que una fracción purificada de glucógeno sintetasa, libre de glucógeno, catalizaba la síntesis de polisacárido en ausencia de aceptor exógeno. Esta reacción, que era muy lenta, era estimulada notablemente por una proteína presente en el sobrenadante de 105.000 x g de los cultivos. A partir de los resultados obtenidos en experimentos de pulso y "chase", concluyeron que durante la síntesis "de novo" el polisacárido crecía por el extremo reductor, y propusieron entonces

que el aceptor inicial sería la propia glucógeno sintetasa. El esquema biosintético "de novo" sería entonces similar al descrito para los dextranos (sección 1.2.3.2., Fig. 14).

Dentro de los estudios pioneros sobre el mecanismo de iniciación de la biosíntesis del glucógeno se destacan los trabajos de Krisman et al. En ese laboratorio se demostró inicialmente que una fracción microsomal de hígado de rata, libre de glucógeno endógeno, catalizaba la transferencia de restos glucosilo a partir de UDP-(¹⁴C)Glc a un compuesto insoluble en TCA (160, 161). Esta transferencia requería alta concentración de sales, y ocurría sólo en ausencia de aceptor, ya que al agregar glucógeno durante la incubación, la totalidad de la marca se incorporaba a una fracción soluble en TCA e insoluble en etanol. Por otra parte, en cuanto al compuesto insoluble en TCA, la radioactividad era solubilizada por tratamiento ácido suave, así como también por tratamiento con enzimas amilolíticas o proteolíticas, indicando que el compuesto sintetizado consistía en glucanos α 1,4 unidos a proteína. Posteriormente, Krisman y Barengo confirmaron que este proteoglucano era un intermediario en la síntesis del glucógeno ya que, reincubando la fracción insoluble en TCA, sintetizada a partir de UDP-(¹⁴C)Glc en concentración μ M, con UDP-Glc mM y enzima ramificante, la marca radioactiva se recuperaba en un compuesto que por distintos criterios se comportaba como glucógeno (162). En base a estas evidencias experimentales se postuló el modelo para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno que se esquematiza en la Fig. 24. El mecanismo involucraría dos etapas: en la primera (A), catalizada por una enzima nueva llamada glucógeno sintetasa iniciadora, se formarían glucanos α 1,4 unidos a una proteína aceptora. En la segunda etapa (B), los glucanos del proteoglucano así formado servirían como aceptores para la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante, sintetizándose moléculas de glucógeno unidas a proteína. Este modelo es apoyado por estudios realizados en otros sistemas. La síntesis "in vitro" de glucanos α 1,4 unidos a proteína ha sido reportada en sistemas tales como Escherichia coli (163, 164), Neurospora crassa (165) y retina de vaca (166). En todos estos casos, la principal evidencia de la unión carbohidrato-proteína reside en la precipitabilidad por TCA de los glucanos sintetizados, y en la sensibilidad de estos compuestos al tratamiento con enzimas proteolíticas.

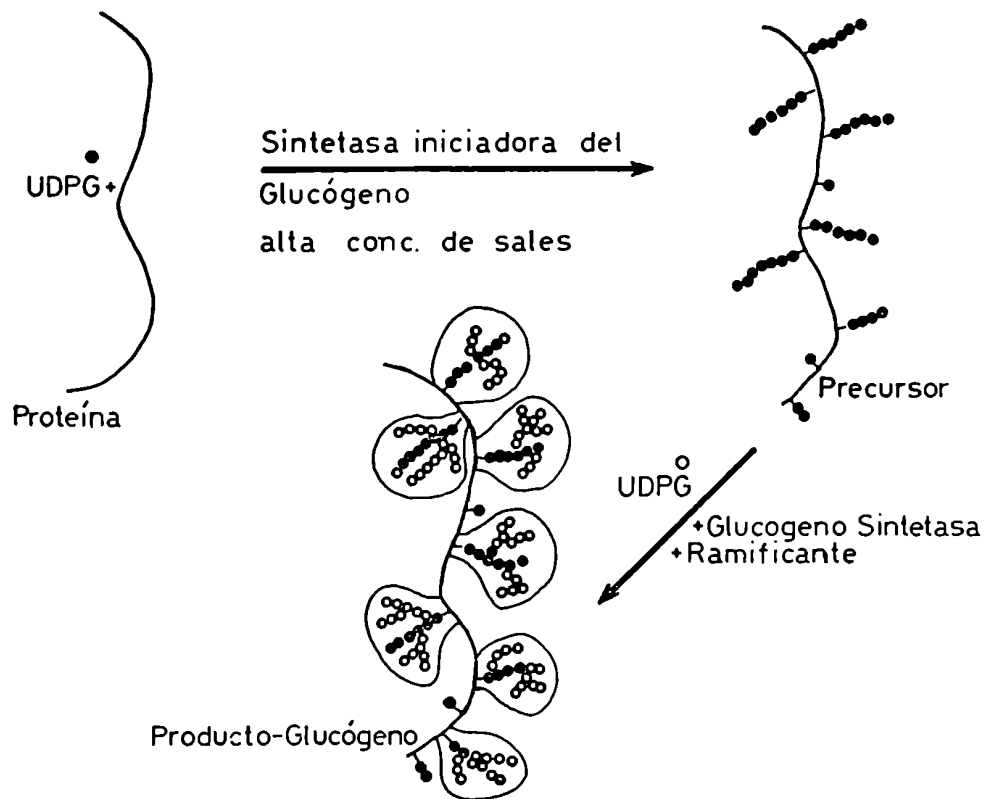


Fig. 24: MODELO DE KRIVAN PARA LA INICIACION DE LA BIOSINTESIS DEL GLUCOGENO.

La existencia de una proteína unida al glucógeno sugerida en este modelo se relaciona con un viejo problema referido al método de extracción del polisacárido. Algunos investigadores habían demostrado que los tejidos contenían dos formas de glucógeno. Una de ellas, el "lioglucógeno", era fácilmente extraíble con agua o TCA diluido, mientras que el glucógeno remanente, "desmoglucógeno", sólo se podía extraer por digestión con solución alcalina caliente (167). Se postuló que esta última fracción era insoluble en TCA debido a la presencia de proteína unida al polisacárido. Estas observaciones fueron objetadas por Roe et al., quienes sugirieron que las dos fracciones de glucógeno eran un artificio del método de extracción con TCA (168). A pesar de las objeciones, la existencia de desmoglucógeno ha sido reportada en músculo cardíaco de rata (169), hígado de rata (170), músculo esquelético de conejo (171), retina de vaca (166), así como en el hongo Ascobolus furfuraceus (173). En los casos de músculo esquelético y retina se ha sugerido que el aminoácido involucrado en la unión proteína-polisacárido sería tirosina (171, 172).

Si bien el mecanismo esquematizado en la Figura 24 fue planteado inicialmente para la síntesis "de novo" del glucógeno, Krisman y Barengo han sugerido que probablemente todos los polisacáridos se inicien unidos a una estructura distinta del propio polímero (164). En tal sentido, las proteínas parecerían ocupar un lugar preponderante como aceptores para la síntesis "de novo" de polisacáridos. Ya se han descrito los casos de los glicosaminoglicanos (sección 1.2.1.2.) o del manano (sección 1.2.2.2.), que existen "in vivo" como proteoglicanos. Otro ejemplo sería el de los dextranos (sección 1.2.3.2.), en el que el aceptor proteico sería la propia enzima, teniendo el proteoglicano una existencia transitoria.

El almidón es otro polisacárido que parece iniciarse unido a una proteína. Slabnik y Frydman demostraron que una fosforilasa de papa era capaz de sintetizar polisacárido en ausencia de "primer", y sugirieron que esta isoenzima actuaría transfiriendo residuos glucosilo a partir de Glc-1-P a la propia molécula enzimática, creando de ese modo su propio aceptor (173a). Preiss et al. (174) aislaron distintas isoenzimas de la ADP-Glc: α 1,4 glucan- α 1,4 glucosil transferasa de hojas de espinaca, una de las cuales catalizaba la síntesis de polisacárido en ausencia de aceptor. Esta trans-

ferencia requería alta concentración de sales y era estimulada por agregado de albúmina. Si bien inicialmente los autores postularon que la transferencia observada implicaba la formación de un proteoglucano (174), en un trabajo posterior demostraron la existencia de "primer" contaminando la preparación enzimática (175). La alta concentración salina era requerida entonces para aumentar la afinidad de la enzima por el aceptor contaminante y permitir que la síntesis tuviera lugar. Una conclusión similar fue propuesta por Whelan y col. para justificar la síntesis en ausencia de aceptor observada por ellos en maíz dulce (176). Por el contrario, los estudios llevados adelante por Cardini et al. indican que en tubérculo de papa (177-179) se puede sintetizar "in vitro" una glucoproteína específicamente a partir de UDP-Glc. Esta glucoproteína sería posteriormente usada como aceptor para el alargamiento de los glucanos α 1,4 a partir de ADP-Glc, UDP-Glc o Glc-1-P, constituyendo un intermediario en la síntesis del almidón. Evidencias similares han sido reportadas en maíz (180). En cuanto a la unión glucosil-aminoácido, estos autores han demostrado la existencia de glucosa unida a serina o treonina, sugiriendo que las cadenas precursoras del almidón crecerían sobre dichos residuos (181).

Por otra parte, se ha encontrado que otros polisacáridos, como el paramilón (glucano β 1,3) de Euglena gracilis (182) o el glucano β 1,2 cíclico de Agrobacterium tumefaciens (183) se sintetizan "de novo" unidos a proteína. En el caso de A. tumefaciens, el glucano cíclico es un exopolisacárido que sería sintetizado como polímero lineal unido covalentemente a una proteína de la membrana interna bacteriana y que, al llegar a un largo de cadena de 17-24, se liberaría de la proteína y simultáneamente se ciclaría (183).

1.4.2. OBJETIVOS DE ESTA TESIS

Como ya hemos mencionado, Bartley y Dean (169) demostraron la existencia de glucógeno unido a proteína en corazón de rata. De acuerdo con sus observaciones, alrededor del 50% del glucógeno extraíble por agua a 100°C parecía estar unido a proteína dado que era insoluble en TCA. Por otra parte, aproximadamente 25% del glucógeno seguía unido a péptidos aún después de digestión con solución alcalina caliente. Las fracciones de glucógeno insoluble podían ser solubilizadas por incubación con enzimas proteolíticas.

Estos resultados, si bien no demostraban una unión covalente entre polisacárido y proteína, sugerían una fuerte asociación de ambos, e indicaban que el músculo cardíaco de rata podía constituir un sistema apropiado para estudiar la síntesis "de novo" del glucógeno.

El objetivo de este trabajo de tesis fue, entonces, tratar de elucidar el mecanismo de iniciación de la biosíntesis del glucógeno en músculo cardíaco de rata. En base a las evidencias obtenidas "in vitro" por Krisman et al. en hígado de rata (160-162) y E. coli (163, 164), y a los datos de extracción de glucógeno reportados por Bartley y Dean (169), se intentó demostrar que en corazón de rata el glucógeno se sintetiza "de novo" unido a un aceptor proteico.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. SUSTRATOS Y ENZIMAS AUXILIARES

2.1.1. SUSTRATOS RADIOACTIVOS

(^{14}C)glucosa 1-fosfato (220 Ci/mol) fue adquirido en New England Nuclear. GDP-(^{14}C)glucosa (277 Ci/mol) provino de Amersham Searle.

Los siguientes compuestos radioactivos fueron preparados por Susana Raffo, Marta Eirin y Marta Bravo (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"), a partir de (U- ^{14}C)glucosa, proveniente de New England Nuclear:

- UDP-(^{14}C)glucosa (329 Ci/mol), preparada según el método de Thomas et al. (184), con ligeras modificaciones.
- ADP-(^{14}C)glucosa (90 Ci/mol), preparada según lo descripto por Recondo et al. (185).
- (^{14}C)glucosa 6-fosfato (329 Ci/mol), preparada según la técnica de Slein (186).

Todos los compuestos fueron utilizados en los ensayos directamente o después de diluirlos con los respectivos sustratos no radioactivos (Sigma), llevándolos a las actividades específicas que se indiquen en cada caso.

(^{14}C)glucógeno se preparó utilizando glucógeno libre de proteínas (ver sección 2.1.3.) como sustrato en una reacción enzimática GS-1, como la descripta en la sección 2.3.1. La actividad específica final fue de 140.000 cpm/mg de glucógeno.

2.1.2. ENZIMAS AUXILIARES

Las siguientes enzimas provinieron de las fuentes mencionadas a continuación: proteasa tipo VIII P5380 (subtilisina; libre de actividad amilolítica, ver sección 2.3.3.), α -amilasa bacteriana tipo IIA A6380, α -amilasa insoluble A5386 y amiloglucosidasa A7255, de Sigma Chemical Co.; β -amilasa de cebada, de Mann Res. Lab.

2.1.3. PREPARACION DE GLUCOGENO LIBRE DE PROTEINAS

Se tomaron 10 mg de glucógeno de hígado de conejo (tipo III, Sigma) y se agregó 0,9 ml de KOH 33%, calentando a 100°C durante 20 min. Después de la digestión alcalina, se precipitó el glucógeno por agregado de 0,2 ml de etanol 96%, recogiendo el precipitado por centrifugación. El glucógeno se disolvió en 0,1 ml de agua y se agregó luego 0,5 ml de TCA 10%. El sobrenadante se separó por centrifugación, y el glucógeno se reprecipitó por agregado de 1,5 volúmenes de etanol 96%. Después de separar el precipitado por centrifugación, el glucógeno se redisolvió en agua y se reprecipitó dos veces más. El precipitado final de glucógeno se disolvió en agua hasta una concentración de 10 mg/ml.

2.2. PREPARACION DE ENZIMA

2.2.1. OBTENCION DE SEDIMENTOS DE 100.000 y 150.000 x g

Se utilizaron ratas Wistar cuyo peso oscilaba entre 200 y 300 g. Se mantuvo a los animales en ayuno durante 3 días y luego se les inyectó intraperitonealmente 20 unidades de insulina bovina (Ely Lilly)/animal. Después de 1 h los animales fueron decapitados. Alternativamente, las ratas fueron alimentadas normalmente según una dieta común de laboratorio, hasta ser sacrificadas. No se observaron diferencias significativas en cuanto al rendimiento o las propiedades de las preparaciones enzimáticas obtenidas según ambos procedimientos.

Inmediatamente después de la decapitación, se extrajeron los corazones y se los colocó en una solución que contenía sacarosa 0,25 M, EDTA-Na pH 7,0 5 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM (solución A), mantenida a 0-4°C. Se utilizaron 60-100 g de tejido por cada preparación (100 ratas).

Antes de ser homogeneizados, los corazones fueron mantenidos durante 48 h a 0-4°C cubiertos por solución A, la que se renovó varias veces. Posteriormente, los corazones se cortaron tratando de dejar sólo el músculo, y se eliminaron cuidadosamente los coágulos de sangre mediante una pinza, a fin de evitar la contaminación con α -amilasa sanguínea.

El músculo fue homogeneizado entonces en dos volúmenes (v/v músculo) de solución A que contenía PMSF 1 mM (Solución B), utilizando un homogeneizador Sorvall Omnimixer a velocidad máxima. Este y todos los pasos subsiguientes se realizaron a 0-4°C.

El homogenato se centrifugó durante 20 min a 25.000 x g en una centrífuga refrigerada marca Sorvall. El sedimento obtenido se lavó con un volumen (v/v original) de solución B, reuniéndose los sobrenadantes de ambos pasos (Extracto crudo).

El extracto crudo se centrifugó durante 3 h a 100.000 x g en una centrífuga refrigerada marca Beckman (Modelo L5-50 o L8-80), y el sedimento resultante se resuspendió en solución A, a una concentración final de proteínas de 50-80 mg/ml (fracción P₁₀₀).

El sobrenadante de 100.000 x g se centrifugó luego a 150.000 x g durante 3 h, y el sedimento obtenido se resuspendió del mismo modo que P₁₀₀ (fracción P₁₅₀).

Las fracciones P₁₀₀ y P₁₅₀ fueron guardadas a -20°C, manteniéndose las actividades enzimáticas en forma estable durante varios meses.

2.2.2. PURIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTETASA

2.2.2.1. A PARTIR DE SEDIMENTOS DE 150.000 x g

La fracción P₁₅₀ de la que se partió se obtuvo siguiendo el esquema descrito en el punto 2.2.1., con la excepción de que el extracto crudo se centrifugó directamente a 150.000 x g durante 3 h, a fin de obtener un mayor rendimiento proteico. El sedimento así obtenido se resuspendió mediante homogeneización en un homogeneizador vidrio-teflón, en glicina 50 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 5 mM, glicerol 25% (v/v) y PMSF 1 mM, ajustado a pH 8,0 con NaOH (buffer C). A esta fracción se la denominó Sed₁₅₀.

La posterior purificación de la fracción Sed₁₅₀ consistió en los siguientes pasos:

- a) Cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa. La misma se llevó a cabo según se detalla en la sección 2.7.4. Las fracciones que presentaron actividad enzimática se juntaron según se indica en la Figura 43 (D1 y D2), y se dializaron exhaustivamente contra buffer C.

b) Cromatografía en columna de ω -amino butil agarosa. Las fracciones D1 y D2 (Fig. 43) se cromatografiaron en columnas de ω -amino butil agarosa, en las condiciones descritas en la sección 2.7.5. Las fracciones con actividad enzimática se juntaron según se indica en la Figura 44 (D1A y D2A) y se dializaron exhaustivamente contra buffer C.

Las distintas fracciones se guardaron fraccionadas a -70°C , manteniéndose la actividad enzimática en forma estable durante varios meses.

La tabla de purificación correspondiente a este protocolo se presenta en la Tabla XVII.

2.2.2.2.A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE 25.000 x g

La fracción sobrenadante de 25.000 x g se obtuvo según lo descrito en la sección 2.2.1. con las siguientes modificaciones. Después de mantener los corazones durante 48 h a $0-4^{\circ}\text{C}$, los mismos fueron homogenizados en dos volúmenes (v/v músculo) de buffer que contenía glicina 50 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 5 mM, glicerol 25% (v/v) y PMSF 1 mM, ajustado a pH 8,6 con NaOH (buffer D). El homogenato se centrifugó durante 30 min a 11.000 x g, y el sedimento se reextrajo con un volumen (v/v original) de buffer D. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se juntaron (Extracto crudo) y se centrifugaron durante 30 min a 25.000 x g. Se descartó el sedimento, y el sobrenadante (Fracción Sob₂₅) se purificó posteriormente por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa y ω -amino butil agarosa, según se detalla en las secciones 2.7.4. y 2.7.5., respectivamente.

La fracción enzimática purificada (fracción D1A) se concentró por ultrafiltración a través de una membrana PM30 (Amicon Co). La fracción D1A concentrada se guardó fraccionada a -70°C , manteniéndose la actividad enzimática en forma estable durante varios meses.

Esta fracción era semejante a la fracción D1A preparada a partir de sedimentos de 150.000 x g (sección 2.2.2.1) en cuanto a la actividad específica, cinética y activación por Glc-6-P de las actividades enzimáticas GS-1 y GS-2.

Esta preparación se utilizó en los experimentos descritos en las secciones 3.7.2.2.1., 3.7.2.2.2. y 3.8.

2.3.MEDICION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

2.3.1.ENSAYO EN PRESENCIA DE "PRIMER". INCORPORACION DE GLUCOSA A GLUCOGENO (ACTIVIDAD GS-1).

La actividad de glucógeno sintetasa se ensayó según lo descrito por Rothman y Cabib (187), con algunas modificaciones.

Las mezclas de incubación contenían: glicina-NaOH pH 8,6 100 mM, EDTA-Na pH 8,8 25 mM, DTT 5 mM, glucógeno 1% (p/v), Glc-6-P 9 mM, UDP-(¹⁴C) 1 mM (400 cpm/nmol) y 5-500 µg de proteína enzimática, en un volumen total de 0,1 ml.

Las incubaciones se realizaron a 37°C, durante los tiempos indicados en cada caso. Después de la incubación, las reacciones se detuvieron por agregado de 0,9 ml de KOH 33%, y los tubos se calentaron a 100°C durante 15 min. El glucógeno se precipitó entonces por agregado de 1,5 ml de etanol 96%, separándose el precipitado por centrifugación. El glucógeno se redisolvió en 0,5 ml de agua y se reprecipitó por adición de 1 ml de etanol 96%. La precipitación fue favorecida mediante el agregado de 2-3 gotas de solución saturada de acetato de amonio. El precipitado final de glucógeno (Fracción KOH-EtOHpp), recogido por centrifugación, se disolvió en 0,2 ml de agua, se transfirió a un vial de centelleo y se contó la radioactividad con solución de Bray (188), en un contador de centelleo líquido Packard (modelo 2002 o 3003) o Beckman (modelo LS 8100).

Una unidad de actividad enzimática corresponde a la incorporación de 1 µmol de glucosa a partir de UDP-Glc al glucógeno (Fracción KOH-EtOHpp) por minuto. La relación de actividad de glucógeno sintetasa (%I) se refiere al cociente de las actividades enzimáticas medidas en ausencia y presencia de Glc-6-P 9 mM.

2.3.2.ENSAYO EN AUSENCIA DE "PRIMER". INCORPORACION DE GLUCOSA A PROTEINA (ACTIVIDAD GS-2)

La incorporación de glucosa en ausencia de glucógeno se determinó como se describe a continuación. Las mezclas de incubación contenían: Mes pH 6,5

100 mM, EDTA-Na pH 7,0 25 mM, DTT 5 mM, UDP-(¹⁴C)Glc 4 μM (700 cpm/pmol) y 5-500 μg de proteína enzimática, en un volumen total de 0,1 ml.

Después de incubar a 37°C durante los tiempos que se indiquen en cada caso, las reacciones se detuvieron por agregado de 0,5 ml de TCA 10% frío. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 6.000 rpm en una centrífuga refrigerada marca Sorvall, separándose dos fracciones: un precipitado proteico y una fracción soluble en ácido.

El precipitado proteico se lavó dos veces con 0,5 ml de TCA 10% frío, y finalmente con 0,5 ml de n-butanol. El precipitado final (Fracción TCA_{pp}) se transfirió a un vial de centelleo, y se contó la radioactividad con solución de Bray (188) en un contador de centelleo líquido.

Por otra parte, a la fracción soluble en ácido se le agregó 1 mg de glucógeno como "carrier", y luego 1,5 volúmenes de etanol 96%, y se procedió como se describió para el ensayo GS-1. El precipitado final de glucógeno (Fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp}) se disolvió en 0,2 ml de agua, se transfirió a un vial de centelleo y se midió su radioactividad con solución de Bray (188) en un contador de centelleo líquido.

Una unidad de actividad enzimática corresponde a la incorporación de 1 pmol de glucosa a partir de UDP-Glc a la fracción TCA_{pp} por minuto, calculada después del período "lag" de la reacción.

En los casos en que se indique, las mezclas de incubación se procesaron según el método de los papeles de filtro tratados con TCA (189). Brevemente, después de la incubación las mezclas fueron adsorbidas sobre papeles Whatman N° 4 (3 x 4 cm) pretratados con TCA 20%, introduciendo los mismos en forma de rollito en los tubos. Una vez adsorbida toda la mezcla de reacción, los papeles se retiraron de los tubos y se colocaron durante 10 min en un vaso de precipitados conteniendo TCA 10% frío (10 ml/papel), con agitación ocasional. Estos lavados se repitieron tres veces. Posteriormente, los papeles se lavaron dos veces con acetona, y finalmente se secaron bajo corriente de aire caliente. Cada papel se introdujo en forma de rollo en un vial de centelleo, y se le midió la radioactividad (Fracción W₄-TCA) con solución centelleadora de 0,4% Omnifluor (Packard) en tolueno.

2.3.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD AMILOLITICA

Se determinó usando 50 μg de (^{14}C)-glucógeno libre de proteínas (7.000 cpm) como sustrato en una mezcla de reacción de actividad GS-2, en la que se había omitido UDP-(^{14}C)Glc. Después de la incubación, se agregaron 0,5 ml de TCA 10% frío, y las mezclas se siguieron procesando como se describió para el ensayo GS-2 (sección 2.3.2.). Se determinó la radioactividad en el precipitado final de glucógeno (Fracción TCAsol-EtOHpp).

Para la determinación de actividad amilolítica en la preparación de proteasa (subtilisina), la enzima se incubó durante 48 h con (^{14}C)-glucógeno, en las condiciones descritas en la sección 2.6.1. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de la mezcla, y se les agregó 3 volúmenes de etanol en presencia de acetato de amonio. Se determinó la radioactividad presente en las fracciones soluble e insoluble en alcohol. En las condiciones descritas, no hubo liberación de (^{14}C)glucosa del precipitado etanólico, indicando que la subtilisina estaba libre de actividad amilolítica.

2.4. RECUPERACION DE MUESTRAS RADIOACTIVAS

2.4.1. FRACCION TCApp

Una vez determinada la radioactividad presente en la fracción TCApp, es posible recuperar la muestra a fin de reusarla. Para ello, se retiró de los viales con una pipeta Pasteur la mayor cantidad posible de líquido centelleador, tratando de no traspasar partículas de precipitado. El líquido remanente se agitó en Vortex a fin de resuspender la totalidad del precipitado, y se traspasó a un tubo. El líquido residual se separó por centrifugación, y los precipitados se lavaron varias veces con metanol, hasta eliminar el olor y la fluorescencia características de la mezcla de Bray (como mínimo se realizaron 5 lavados). Finalmente se hicieron dos lavados con éter, y los precipitados se secaron bajo corriente de aire frío.

2.4.2. PAPELES DE FILTRO TRATADOS CON TCA

Un procedimiento similar se llevó a cabo para recuperar muestras radioactivas de papeles W₄-TCA. En este caso, una vez finalizados los lavados con metanol (10 ml/papel), se hicieron dos lavados con acetona y los papeles se secaron posteriormente bajo corriente de aire frío.

2.5. TRATAMIENTOS QUIMICOS

2.5.1. HIDROLISIS ACIDA SUAVE

2.5.1.1. FRACCION TCApp

La fracción TCApp se resuspendió en 0,2 ml de HCl 0,1 o 0,01 N, según se indique, y se calentó a 100°C durante los tiempos indicados en la sección Resultados. Después de la hidrólisis, se enfrió el tubo en baño de hielo, se neutralizó con NaOH, y se le agregó proteína "carrier" y 0,5 ml de TCA 10% frío. Después de centrifugar, el precipitado resultante se lavó con 0,2 ml de TCA 10% frío, juntándose ambos sobrenadantes. El precipitado se lavó finalmente con n-butanol, se transfirió a un vial de centelleo, y se contó la radioactividad remanente con solución de Bray (188).

La fracción soluble en ácido se extrajo varias veces con 1 ml de éter para eliminar el TCA, y se llevó luego a sequedad bajo presión reducida. El residuo se resuspendió tres veces en 0,2 ml de piridina anhidra, llevando a seco cada vez. Finalmente, se resuspendió en 0,2 ml de piridina anhidra, se centrifugó y se separaron las sales de la fracción soluble. Esta última se llevó a sequedad, se resuspendió en 0,2 ml de agua, se transfirió a una planchuela de vidrio, y se secó bajo corriente de aire frío. Las sales precipitadas se trataron de manera similar. En ambos casos se determinó la radioactividad presente en las muestras, leyendo las mismas en un contador de flujo.

Alternativamente, la fracción TCApp se resuspendió en 0,5 ml de HCl 0,01 N, y se calentó a 100°C durante los tiempos indicados en la sección Resultados. A continuación, se agregaron 2,5 ml de cloroformo: metanol (3:2)

y se recuperó la fase superior. La interfase proteica se lavó dos veces con cloroformo: metanol: H₂O (1:16:16), juntándose los lavados con la fase superior de la primera partición. Esta fracción se transfirió a una planchuela de vidrio, se secó bajo corriente de aire, y se determinó su radioactividad en un contador de flujo.

2.5.1.2. PAPELES DE FILTRO TRATADOS CON TCA

Una vez recuperadas las muestras W₄-TCA como se indicó en la sección 2.4.2., se introdujeron los rollitos en tubos de ensayo y se agregó HCl 0,1 o 0,01 N, según se indique, hasta cubrirlos. Los tubos se calentaron a 100°C durante distintos tiempos, y luego se colocaron inmediatamente en un baño de hielo. Los papeles se retiraron entonces de los tubos, y se lavaron con TCA y acetona de forma similar a la descrita en la sección 2.3.2. Finalmente, los papeles se secaron y se contó la radioactividad remanente con líquido centelleador tolueno-omnifluor.

2.5.2. PERMETILACION E HIDROLISIS TOTAL DE LA FRACCION TCA_{pp}

La fracción TCA_{pp} proveniente de una reacción GS-2 incubada durante 120 min (28.000 cpm), se recuperó como se indicó en 2.4.1., y se sometió a hidrólisis en presencia de HCl 0,1 N durante 10 min, como se describió en 2.5.1.1. Después de reprecipitar la mezcla con TCA 10% frío, se separó la fracción soluble en ácido. La misma se extrajo cinco veces con 0,5 ml éter, y se llevó a sequedad bajo presión reducida. El residuo, que contenía los compuestos liberados por la hidrólisis ácida suave, fue sometido a permetilación e hidrólisis total por el Dr. Roberto Couso, siguiendo la técnica descrita en la referencia 64.

Las muestras permetiladas se analizaron por cromatografía en capa delgada (ver Sección 2.7.2.).

2.6. TRATAMIENTOS ENZIMATICOS

2.6.1. DIGESTION ENZIMATICA DEL COMPUESTO TCApp

La fracción TCApp, proveniente de una incubación o recuperada después de medir la radioactividad, se incubó con las siguientes enzimas, en las condiciones que se detallan a continuación (volumen final 0,1 ml):

- a) α -amilasa: Tris-HCl pH 7,4 0,1 M, CaCl_2 5 mM y 0,2-0,3 unidades de α -amilasa.
- b) β -amilasa: Tris-HCl pH 7,4 0,1 M, y 0,5-1 mg de β -amilasa.
- c) Amiloglucosidasa: Tris-HCl pH 7,4 0,1 M, y 2,5-3 unidades de amiloglucosidasa.

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 48 h bajo vapores de tolueno. Después de 24 h se agregó la misma cantidad de buffer y enzima.

- d) Proteasa: Tris-HCl pH 7,4 0,1 M, CaCl_2 5 mM, y 0,5-1 mg de subtilisina (libre de amilasa).

La incubación se llevó a cabo bajo vapores de tolueno durante 7 días a 37°C, agregándose cada 24 h la misma cantidad de enzima, buffer, y CaCl_2 .

En todos los casos las reacciones se detuvieron por agregado de 0,5 ml de TCA 10% frío, y las mezclas se procesaron según se describió para la hidrólisis ácida (2.5.1.1.). Se determinó entonces la radioactividad remanente en la fracción TCApp, y en las fracciones soluble e insoluble en piridina anhidra.

Las fracciones solubles en piridina anhidra correspondientes a los tratamientos con α o β -amilasas y amiloglucosidasa, se analizaron por cromatografía en papel (2.7.1.), mientras que las fracciones soluble e insoluble en piridina anhidra correspondientes a la digestión proteolítica, se sometieron a electroforesis en papel (2.8.1.).

2.6.2. DIGESTION DE LA GLUCOGENO SINTETASA CON α -AMILASA INSOLUBLE

La fracción enzimática D1A, obtenida como en 2.2.2.2., (0,1 ml, 380 mg de proteína) fue incubada durante 1 h a 37°C con 3 unidades de α -amilasa insoluble en buffer Mes pH 6,5 0,1 M. Después de la incubación, se agregó 0,1 ml del mencionado buffer, y la mezcla se centrifugó a 8.000 rpm durante 20

min. El sobrenadante fue separado cuidadosamente, tratando de evitar la contaminación con la enzima inmovilizada, y se usó posteriormente como fuente enzimática.

2.7. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

2.7.1. CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Las muestras a ser analizadas se sembraron en papel Whatman N°1 o su equivalente Schleicher y Schuell 2043a. La cromatografía se realizó en forma descendente, usando n-butanol - piridina - agua (4:3:4) (190) como solvente de corrida. La duración de la cromatografía fue de 48-72 h.

Los compuestos radioactivos se detectaron mediante el pasaje de las tiras cromatográficas por un radiocromatógrafo marca Packard (modelo 7202).

Alternativamente, los cromatogramas fueron cortados en tiras de 1 cm de largo, y se determinó la radioactividad de cada tira sumergiéndola en solución centelleadora de 0,4% Omnifluor (Packard) en tolueno, y contándola con un contador de centelleo.

Como standard interno de azúcares, se utilizó una mezcla de maltooligosacáridos, obtenidos por hidrólisis parcial de amilosa (191), los que fueron detectados con el reactivo alcalino de nitrato de plata (192).

2.7.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

La misma se realizó en placas de silicagel de base de vidrio (SG 60, Merck), utilizando como solvente de corrida benceno-acetona-amoniaco-agua (150:600:4,5:9).

Los compuestos radioactivos se detectaron mediante autorradiografía de las placas. Los standards usados (2,3 dimetil glucosa, 2,3,6 trimetil glucosa y 2,3,4,6 tetrametil glucosa) fueron provistos por el Dr. Roberto Couso, y se detectaron por calentamiento a 120°C de las placas, después de vaporizar las mismas con H₂SO₄ 5% en etanol.

2.7.3. FILTRACION EN GELES

Se utilizaron columnas de Sephadex G-75 (Pharmacia). Las condiciones específicas de cada cromatografía se indicarán en los casos particulares en la sección Resultados. El volumen de exclusión (V_0) y el volumen total (V_t) de las columnas, se determinaron por los volúmenes de elución del azul dextrano y del CoCl_2 , respectivamente.

2.7.4. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA

La fracción a cromatografiar se sembró en una columna de DE-52 (Whatman Ltd) equilibrada con buffer C (2.2.2.1.) o D (2.2.2.2.). Después de sembrada, la columna se lavó con buffer de equilibrio y las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl en buffer de equilibrio.

El buffer de equilibrio, el tamaño de las columnas, la velocidad de flujo, y el volumen y concentración del gradiente aplicado, se indicarán en cada caso particular en la sección Resultados.

Las fracciones de interés se juntaron según se indique en cada caso, y se dializaron exhaustivamente contra el buffer de equilibrio de la columna.

2.7.5. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ω -AMINO BUTIL AGAROSA

Las condiciones particulares de la cromatografía en ω -amino butil agarosa (Sigma) serán detalladas en la sección Resultados.

2.8. METODOS ELECTROFORETICOS

2.8.1. ELECTROFORESIS EN PAPEL

El análisis electroforético se llevó a cabo en papel Whatman N°1 o su equivalente Schleicher y Shuell 2043a. Los buffers de corrida fueron: acetato de piridina pH 6,5 1,2 M, o carbonato de amonio pH 9,0 0,2 M. La duración de las corridas fue de 2 h, aplicándose 22-25 V/cm.

La posición de los compuestos radioactivos se detectó en un radiocromatógrafo marca Packard (modelo 7202).

2.8.2.ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

2.8.2.1.GELES NO DISOCIANTES

La electroforesis en condiciones nativas se llevó a cabo en geles que contenían 5, 5,5 o 6% de acrilamida (p/v), según se indique en cada caso, y Tris 0,1 M, EDTA 2 mM, ácido bórico 0,1 M, pH 8,3 (buffer E). La relación de acrilamida: bis-acrilamida usada fue de 37,5:1. Los geles se armaron en los aparatos Bio Rad modelo 220 (gel plano, 120 x 140 x 1,5 mm) o modelo 150 A (gel cilíndrico, 0,5 x 11,5 cm).

En los casos en que los geles se utilizaron para detectar la actividad de glucógeno sintetasa "in situ" (2.8.2.1.1.), se realizó una precorrida con buffer E durante 15 min a 30 mA/gel plano o 4 mA/gel cilíndrico).

Las muestras se sembraron directamente en los geles, diluídas en glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v). El volumen de las muestras sembradas varió entre 50 y 150 μ l. La corrida electroforética se realizó a 4°C con buffer E, a 10 mA/gel plano o 2 mA/gel cilíndrico. La duración de la electroforesis se indicará en cada caso particular.

2.8.2.1.1.DETECCION DE GLUCOGENO SINTETASA EN GELES NO DISOCIANTES

Después de la corrida electroforética, la posición de la glucógeno sintetasa se detectó según el siguiente procedimiento:

a)Incubación: Los geles se incubaron durante distintos tiempos a 37°C en una mezcla que contenía DTT 5 mM, EDTA 20 mM, Glc-6-P 10 mM, glucógeno 1% (p/v), Glicina-NaOH pH 8,6 50 mM, y UDP-Glc 10 mM o UDP-(¹⁴C)Glc 7 μ M (700 cpm/pmol). La incubación se realizó en tubos de ensayo colocados horizontalmente, de modo de cubrir los geles con el mínimo volumen de mezcla de reacción. Después de la incubación, las mezclas se decantaron y se guardaron a -20°C para su reutilización. Los geles se lavaron entonces con abundante agua corriente.

b)Detección: Los geles incubados con UDP-Glc no radioactivo se colocaron en una solución que contenía I₂ 0,26%, IK 2,6%, buffer acetato pH 4,7 0,1 M. Los polisacáridos sintetizados aparecieron como bandas marrones o azules, depen-

diendo del largo del glucano α 1,4 formado. Los geles se destiñeron y mantuvieron posteriormente en ácido acético 7%. En esta solución, las bandas retuvieron su color durante varios meses. Cuando fue necesario, los geles se tiñeron nuevamente, recuperando la intensidad original de las bandas.

En el caso de los geles incubados con UDP-(^{14}C)Glc, los polisacáridos radioactivos sintetizados se detectaron mediante la fluorografía del gel, como se describe en la sección 2.8.2.5.

2.8.2.1.2. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES EN GELES NO DISOCIANTES

El método usado fue el desarrollado por Hedrick y Smith (193), con algunas modificaciones. Se polimerizaron geles cilíndricos nativos de 5, 5,5 y 6% de acrilamida, y en cada uno de ellos se sembraron 40 μl de una solución que contenía 30 μg de albúmina sérica bovina cristalina (Sigma) en buffer D (2.2.2.2.) y azul de bromofenol 0,002% (p/v).

En condiciones nativas, la albúmina se asocia en distintos grados, existiendo, además del monómero, otros isómeros de tamaño tales como dímero, trímero, etc.

Después de la corrida electroforética, los geles se tiñeron para detectar proteínas (2.8.2.3.). Se visualizaron, en todos los casos, cuatro bandas netas, que debían corresponder al monómero, dímero, trímero y tetramero, respectivamente. Se determinó entonces, en cada gel, el R_f correspondiente a cada banda, y se graficaron los valores de los R_f de cada isómero versus la concentración de acrilamida. Como se observa en la Figura 25, para cada isómero se obtuvo una recta, y todas las rectas se intersectaron en un punto, corroborando que todas las bandas representaban isómeros de tamaño. Finalmente, se sacó la pendiente de cada recta, y se graficó el peso molecular de cada isómero (PM monómero: 67.000) en función de la pendiente de la recta correspondiente (Fig. 25). Dicha gráfica es lineal y puede usarse como curva de calibración de peso molecular para cualquier proteína, siempre que se haya corrido de modo similar a la albúmina.

Por lo tanto, para determinar el peso molecular de la glucógeno sintetasa nativa, se sembró en geles no disociantes de 5, 5,5 y 6% de acrilamida la fracción D1A (ver 2.2.2.2.), y después de la corrida electroforética, se determinó la posición de la banda enzimática según se describió en la sec-

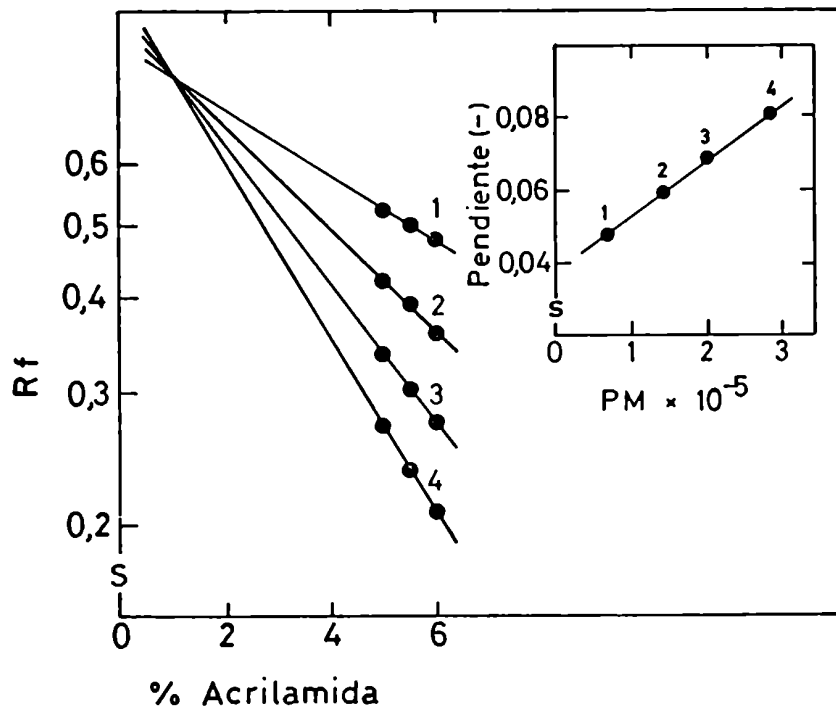


Fig. 25: CURVAS DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE PESO MOLECULAR EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NO DISOCIANTES.

Las condiciones se detallan en la Sección 2.8.2.1.2.

1, 2, 3 y 4: monómero, dímero, trímero y tetrámero de albúmina, respectivamente (PM monómero: 67.000).

ción 2.8.2.1.1. Se obtuvieron así los valores de R_f correspondientes a las bandas de cada gel, y los datos se procesaron como se describió para la albúmina.

2.8.2.2. GELES DISOCIANTES EN PRESENCIA DE SDS

Los geles se prepararon en un aparato Bio Rad modelo 220 (gel plano, 120 x 140 x 1,5 mm), según lo descrito por Laemmli (194). Los geles más comunmente utilizados fueron 7,5% (p/v) de acrilamida, pH 8,8 (gel separador) y 3% (p/v) de acrilamida, pH 6,8 (gel espaciador).

Las muestras a analizar fueron dializadas contra agua y luego liofilizadas, o bien fueron llevadas a sequedad bajo corriente de aire caliente, según se indique en cada caso particular. En ambos casos, las muestras se disolvieron por calentamiento durante 5 min a 100°C en una mezcla desnaturante que contenía SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 20% (v/v), Tris HCl pH 6,8 0,01 M y azul de bromofenol 0,002% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a intensidad de corriente constante de 7 mA durante 15 h, con enfriamiento mediante circulación de agua. El buffer de corrida usado fue Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3.

2.8.2.2.1. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES EN GELES DISOCIANTES CON SDS

Las proteínas marcadoras utilizadas para la determinación de pesos moleculares en geles desnaturantes fueron: miosina (músculo de conejo, PM subunidad: 205.000); β -galactosidasa (E. coli, PM subunidad: 116.000); fosforilasa b (músculo de conejo, PM subunidad: 97.400); albúmina (Plasma bovino, PM: 66.000); albúmina (huevo, PM: 45.000); anhidrasa carbónica (eritrocitos bovinos, PM: 29.000); tripsinógeno (páncreas bovino, PM: 24.000); β -lactoglobulina (leche bovina, PM subunidad: 18.400) y lisozima (clara de huevo, PM: 14.300). Todas estas proteínas provinieron de Sigma Chemical Co. (MW-SDS-70 y MW-SDS-200 Kit).

Los pesos moleculares de las proteínas en estudio se determinaron por interpolación en la curva de calibración, obtenida al graficar log PM de las proteínas marcadoras en función de los correspondientes R_f .

2.8.2.3.DETECCION DE PROTEINAS

Las proteínas se detectaron mediante tinción de los geles con el reactivo de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma), según lo descrito por Weber y Osborn (195).

2.8.2.4.DETECCION DE CARBOHIDRATOS

La presencia de carbohidratos se detectó tiñendo los geles con el reactivo del ácido periódico/Schiff (PAS), según el método de Fairbanks et al. (196).

2.8.2.5.DETECCION DE RADIOACTIVIDAD

Los geles que contenían muestras radioactivas fueron sometidos a fluorografía, según lo descrito por Chamberlain (197). Para ello, los geles se lavaron exhaustivamente con agua, y luego se colocaron durante 1 h en una solución de salicilato de sodio 1 M. Los geles fueron secados entonces sobre papel Whatman 3 MM en un secador de geles marca Bio Rad (modelo 224). Una vez secos, los geles fueron expuestos a -70°C a películas preflasheadas de rayos X (Kodak X-Omat S). Las placas se revelaron utilizando drogas comerciales.

2.9.OTRAS TECNICAS

2.9.1.DETERMINACION DE PROTEINAS

La misma se realizó según el método de Lowry et al. (198), utilizando albúmina sérica bovina cristalina como patrón.

2.9.2.DETERMINACION DE GLUCOGENO

La concentración de glucógeno se determinó mediante el método de Krisman (88), utilizando el reactivo de iodo- CaCl_2 .

3.RESULTADOS Y DISCUSION

Como se mencionó en la sección 1.4.2., el objetivo de esta tesis doctoral fue la demostración de la síntesis de glucanos α 1,4 unidos a proteína, y su papel como intermediarios en la síntesis del glucógeno de músculo cardíaco de rata.

El modelo de Krisman para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno (Fig. 24), postula dos etapas:

- a) La síntesis "de novo" de glucanos α 1,4 unidos a un aceptor proteico, catalizada por la glucógeno sintetasa iniciadora, y
- b) la utilización de estos glucanos como sustratos de la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante, para dar moléculas de glucógeno unidas a proteína.

Por lo tanto, si este modelo es correcto, al medir la actividad de transferencia de glucosa a partir de UDP-Glc a aceptor endógeno en ausencia de glucógeno, se puede estar midiendo tanto la iniciación sobre sitios libres del aceptor proteico, como el alargamiento de glucanos preexistentes, mediado por la glucógeno sintetasa.

En consecuencia, en este tipo de estudios se han definido dos ensayos enzimáticos. La actividad GS-1 (sección 2.3.1.) corresponde a la medición clásica de la glucógeno sintetasa, esto es, la transferencia de glucosa a partir de UDP-Glc al glucógeno agregado exógenamente. Esta reacción se mide como la incorporación de (^{14}C)glucosa al precipitado etanólico obtenido después de la digestión alcalina de la mezcla de incubación (reacción KOH-EtOHpp).

Por su parte, la actividad GS-2 (sección 2.3.2.) corresponde a la transferencia de glucosa de UDP-Glc a aceptor endógeno, medida como la incorporación de radioactividad a una fracción insoluble en TCA 10% (fracción TCApp), que correspondería a la síntesis de glucanos unidos a proteína (proteoglucanos).

Si hubiera endógenamente glucanos no unidos a proteína, sería de esperar que la glucosa se incorporara a una fracción soluble en ácido y precipitable por alcohol (fracción TCAsol-EtOHpp). Lo mismo ocurriría si el aceptor endógeno fuera proteico, pero los glucanos sintetizados sobre el mismo crecerían mucho en relación con la porción proteica o se liberarían de la misma

por acción de enzimas amilolíticas, o bien si la proteína del proteoglicano se hidrolizara por proteólisis. Por lo tanto, en el ensayo GS-2 también se debe considerar la incorporación correspondiente a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp}.

Por último, es importante tener en cuenta que el ensayo GS-2 puede representar también una forma de medición de la actividad de glucógeno sintetasa.

3.1. OBTENCIÓN DE PREPARACIONES ENZIMÁTICAS ESTABLES

A fin de poder estudiar y caracterizar el sistema enzimático de iniciación de síntesis de glucógeno era necesario, en primer lugar, disponer de preparaciones enzimáticas que tuvieran un bajo contenido de glucógeno.

Se probó inicialmente preparar la enzima a partir de corazones de animales ayunados durante tres días e inyectados con insulina 1 h antes de morir, lo cual tenía un efecto glucogenolítico en el caso de hígado (161). Sin embargo, este tratamiento no produjo diferencias significativas con respecto a las preparaciones obtenidas a partir de animales alimentados normalmente.

En cambio, sí se observó una disminución en el contenido de glucógeno al preincubar los corazones enteros en solución de homogeneización durante 48 h a 4°C, antes de su procesamiento. En estas condiciones, haciendo la centrifugación diferencial que se describió en 2.2.1. (excepto que no se agregaba PMSF durante la preparación), se logró incorporar glucosa a partir de UDP-(¹⁴C)Glc a una fracción insoluble en TCA (fracción TCA_{pp}), utilizando como fuente enzimática tanto P₁₀₀ (sedimento entre 25.000 y 100.000 x g) como P₁₅₀ (sedimento entre 100.000 y 150.000 x g).

Como se observa en la Tabla VII, la preincubación produjo un notable descenso en el contenido de glucógeno de la fracción P₁₅₀ (10 veces), mientras que la proteína disminuyó a la mitad. La caída en la concentración de glucógeno se correlacionó con una gran disminución de la incorporación de glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} (90%). De modo semejante, la fracción P₁₀₀ obtenida después de la preincubación presentaba un mayor contenido de glucógeno que P₁₅₀ y, paralelamente, una mayor incorporación de glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} (Tabla VII).

Si bien se había logrado disminuir el glucógeno presente en la fracción P₁₅₀, estas preparaciones, al igual que la fracción P₁₀₀, eran muy inestables, por lo que se debía preparar enzima muy frecuentemente. Este

Tabla VII: EFECTO DE LA PREINCUBACION DE LOS CORAZONES.

FRACCION ENZIMATICA	PREINCUBACION 48 h 4°C	GLUCOGENO		ACT. RELATIVA GS-2 (%)	
		µg/ml	µg/mg prot.	TCApp	TCAzol-EtOHpp
P ₁₅₀		380	5,0	100 (4)	100 (56,6)
	+	37	1,1	125	12
P ₁₀₀	+	204	7,6	75	32

Las fracciones enzimáticas se obtuvieron según se describió en 2.2.1., con la omisión de PMSF. En el caso indicado (-), los corazones se procesaron inmediatamente después de extraídos.

Los ensayos GS-2 se incubaron durante 40 min a 37°C, con UDP-(¹⁴C)Glc 1 mM (1580 cpm/nmol).

Los valores entre paréntesis indican las actividades específicas (nmol glucosa/mg proteína).

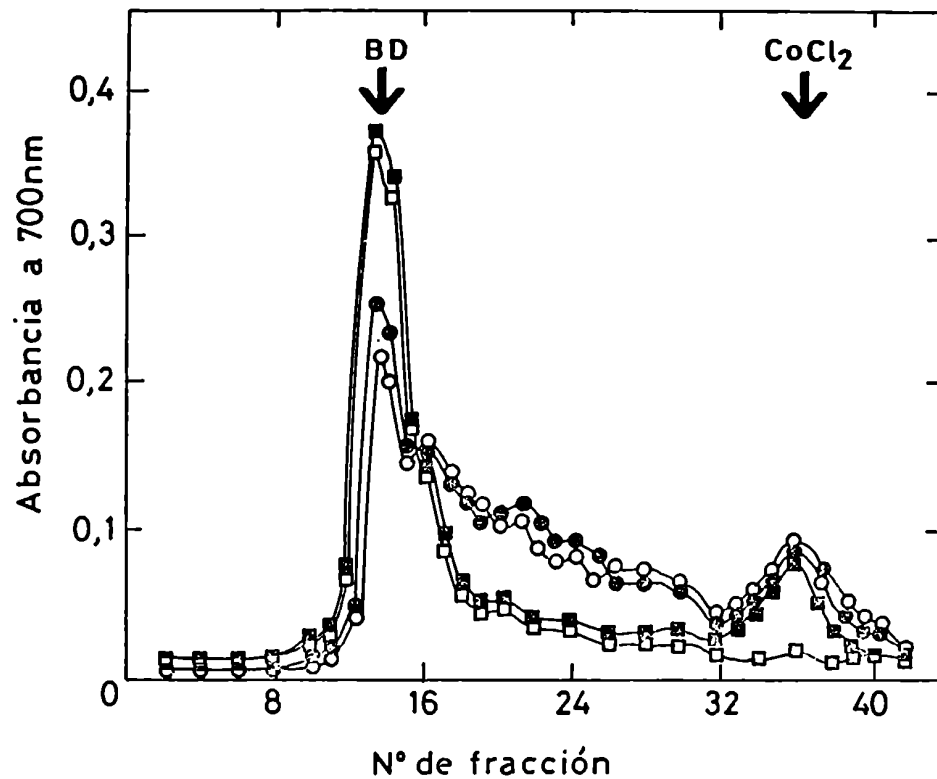


Fig. 26: ACTIVIDAD PROTEOLITICA ENDOGENA DE LA FRACCION P₁₅₀.

Una mezcla de reacción de GS-2 (0,2 ml; 1,2 mg P₁₅₀) se incubó durante 60 min a 37°C y se sembró en una columna de Sephadex G-75 (1,2 x 25,5 cm), equilibrada con buffer Mes 0,1 M pH 6,5. Se eluyó con el mismo buffer, recoigiéndose fracciones de 0,5 ml. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de cada fracción y se determinó en ellas la concentración de proteínas (●).

(○) Se omitió UDP-Glc durante la incubación; (■) control sin incubar; (□) P₁₅₀ (1,2 mg) en buffer Mes 0,1 M pH 6,5.

B.D.: Azul dextrano.

hecho dificultaba los estudios, ya que en el caso de P₁₅₀ tanto la incorporación total de la radiomarca, como su distribución entre las fracciones TCA_{pp} y TCA_{sol}-EtOH_{pp}, variaba de preparación en preparación. En cuanto a P₁₀₀, si bien la actividad específica total era variable, siempre era mayor la incorporación de radioactividad en la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp}.

Dado que se han descripto numerosas actividades proteolíticas en músculo cardíaco de rata (199), se pensó que las mismas podían causar la inestabilidad y variabilidad de las preparaciones enzimáticas. En consecuencia, se estudió la actividad de proteasa endógena mediante el experimento que se resume en la Figura 26. Cuando la fracción P₁₅₀ fue cromatografiada en una columna de Sephadex G-75, toda la proteína eluyó en el excluido de la columna. Lo mismo ocurrió cuando se sembró una mezcla de reacción de GS-2 sin incubar (el pico que eluye en el V_t representa al EDTA de la mezcla de reacción, que interfiere con la coloración de Lowry). En cambio, cuando la mezcla de reacción de GS-2 fue incubada a 37°C durante 60 min, en ausencia o presencia de UDP-Glc, una fracción significativa de la proteína se incluyó en la columna, revelando la existencia de una actividad proteolítica.

En base a estas evidencias, se decidió agregar PMSF, inhibidor de proteasas de serina, durante la preparación enzimática, tal como se describió en la sección 2.2.1. Como se muestra en la Tabla VIII, el agregado de PMSF produjo una estimulación de la incorporación de glucosa a la fracción TCA_{pp} en ambas fracciones enzimáticas, siendo mayor en el caso de P₁₀₀. Por otra parte, mientras que para P₁₀₀ la incorporación a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} representaba 15% de la actividad total, en el caso de P₁₅₀ esta última alcanzaba al 75%. El PMSF produjo, entonces, un aumento de la actividad enzimática, y a la vez, una distribución diferente de la misma.

Por otra parte, cuando se estudió el contenido de glucógeno de ambas fracciones, se observó que en ambas había polisacárido en concentraciones menores a las cuantificables con el método colorimétrico usado (88).

La fracción P₁₀₀, por lo tanto, fue elegida como fuente enzimática. Estas preparaciones eran bastante estables, lo que permitió encarar el estudio del sistema.

Tabla VIII: EFECTO DEL AGREGADO DE PMSF DURANTE LA PREPARACION ENZIMATICA.

FRACCION ENZIMATICA	PMSF 1 mM AGREGADO DURANTE LA HOMOGENEIZACION	ACTIVIDAD RELATIVA GS-2 (%)	
		TCA _{app}	TCA _{sol-EtOHpp}
P ₁₀₀		100 (4)	100 (5)
	+	325	40
P ₁₅₀	-	100 (5)	100 (4)
	+	160	600

Las fracciones se obtuvieron como se detalló en 2.2.1., omitiendo PMSF según se indica. Las actividades enzimáticas se midieron como en la Tabla VII. Los valores entre paréntesis indican las actividades específicas (nmol glucosa/mg proteína).

3.1.1. DISCUSION

En esta sección se describieron las distintas etapas que llevaron a la obtención de preparaciones enzimáticas estables.

El primer problema que se debió superar fue la alta concentración de glucógeno de las preparaciones, lo cual representaba una obvia interferencia en el estudio de la síntesis "de novo" del polisacárido.

Si bien la glucógeno sintetasa y la fosforilasa están sometidas a un control hormonal que determina la concentración del glucógeno en los tejidos (ver 1.3.2.3.; Fig. 23), los estudios llevados a cabo en músculo cardíaco de rata indican que, en este caso, el contenido del polisacárido parecería mantenerse independientemente de ese control. Así por ejemplo, mientras que la adrenalina promueve la conversión in vivo de fosforilasa b en fosforilasa a tanto en músculo cardíaco como esquelético, sólo provoca un efecto glucogenolítico en este último (200). Por lo tanto, en músculo cardíaco la activación de la fosforilasa no provocaría obligatoriamente una degradación significativa del glucógeno, desconociéndose el mecanismo operante.

De modo similar, la inyección o infusión continua de ratas con insulina, si bien produce un marcado aumento en la proporción de glucógeno sintetasa I cardíaca, no afecta consecuentemente la concentración de glucógeno (200, 201)

Por otra parte, el hecho de que la administración de insulina en animales ayunados no modifique el contenido de glucógeno del corazón, por contraposición a la disminución observada en hígado de rata (161), concuerda con el reporte de que la perfusión con insulina de corazones aislados, en ausencia de glucosa, no produce variaciones en el contenido de glucógeno cardíaco (202).

La disminución del glucógeno cardíaco observada como consecuencia de la preincubación de los corazones a 4°C antes de su homogeneización (Tabla VII), probablemente se deba a un efecto de anoxia, como el descrito por Huijing et al. en corazones de rata aislados y perfundidos in vitro con buffer gaseado con He-CO₂ (201). Estos autores observaron que en un período de perfusión de 10 min con los gases indicados, el glucógeno disminuyó al 6% del contenido original. El efecto no se modificó por el agregado de glucosa al líquido de

perfusión. En nuestro caso, tampoco se puede descartar la acción de enzimas de tipo amilolítico, que degradarían el glucógeno durante la preincubación.

El hecho de que la disminución en el contenido de glucógeno de la fracción P₁₅₀ se haya correlacionado con una gran caída en la incorporación de glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} (Tabla VII), sugirió que en este caso, la radioactividad incorporada en esta fracción correspondía a la transferencia de glucosa de UDP-Glc al glucógeno endógeno. Esto se confirmó por el hecho de que P₁₀₀ contenía más glucógeno que P₁₅₀, y al mismo tiempo, incorporaba más glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} (Tabla VII). Estos datos permitieron confirmar que el glucógeno, aun cuando estuviera contaminando la preparación y actuando como "primer" para la glucógeno sintetasa, era soluble en TCA, y por lo tanto, el compuesto insoluble en TCA debía ser distinto, al menos en parte, del glucógeno.

La presencia de proteasa endógena activa en las condiciones de ensayo de GS-2 (Fig. 26), está de acuerdo con la descripción de actividades proteolíticas en músculo cardíaco de rata (199). Su responsabilidad en la inestabilidad de las preparaciones enzimáticas se demostró por el hecho de que esta situación se revirtió con el agregado de un inhibidor de proteasas, el PMSF. Este último produjo un notable aumento de la transferencia total de glucosa tanto en P₁₀₀ como en P₁₅₀ (Tabla VIII).

Dado que la mayor actividad específica de GS-2 se encontró en P₁₀₀, se siguió trabajando con esta fracción enzimática.

Es importante notar que, dado que el agregado de PMSF produjo la disminución del glucógeno presente en P₁₀₀ y P₁₅₀, el gran aumento de incorporación de glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} observado con P₁₅₀ (Tabla VIII), no se debió en este caso a la presencia de polisacárido en la preparación. Este resultado se discutirá más adelante, cuando se trate la probable relación precursor-producto entre los compuestos de las fracciones TCApp y TCA_{sol}-EtOH_{pp} (sección 3.2.8.).

3.2. PROPIEDADES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA RESPONSABLE DE LA INCORPORACION DE GLUCOSA A LA FRACCION TCApp EN AUSENCIA DE "PRIMER"

3.2.1. PROPIEDADES CINETICAS. CURVA DE UDP-Glc Y CURVA DE TIEMPO

Cuando se estudiaron las curvas de velocidad de GS-2 en función de la concentración de UDP-Glc, se observó una cinética compleja, con un gráfico de Lineweaver-Burk no lineal (Fig. 27 A) que podía interpretarse tanto indicando una cinética alostérica con cooperatividad positiva, como siendo el resultado de varias rectas con distinta pendiente. En consecuencia, estos datos no permitieron establecer si la síntesis del compuesto insoluble en TCA era catalizada por más de una enzima o por una enzima alostérica.

Es importante destacar que a las distintas concentraciones de UDP-Glc estudiadas, las correspondientes curvas de tiempo presentaron un período "lag" de actividad que variaba con la concentración (Fig. 28), y también con la preparación. La actividad GS-2, por lo tanto, se tuvo que corregir en cada caso descontando el "lag" a partir del cual la cinética era lineal, lo que no siempre fue fácil de establecer con exactitud.

Como se observa en la Fig. 27 B, de todas las concentraciones de UDP-Glc ensayadas, la de 14 μM fue la que produjo la mayor incorporación de marca radioactiva, lo cual interesaba para la posterior caracterización del compuesto radiomarcado. Por esta razón, se eligió esta concentración para realizar parte de los estudios presentados en esta tesis.

La Figura 29 muestra las curvas de incorporación de glucosa a las fracciones TCApp y TCAsol-EtOHpp en función del tiempo, para concentraciones de UDP-Glc iguales a 14 μM y 4 μM . Cuando la actividad GS-2 se midió con UDP-Glc 14 μM , se observó la incorporación de glucosa tanto a la fracción TCApp (80%) como a la TCAsol-EtOHpp (20%). En ambas fracciones la incorporación se detectó después de un período "lag", que variaba entre 10 y 30 min para TCApp, y era mayor de 30 min para TCAsol-EtOHpp. Por el contrario, cuando los ensayos se hicieron con UDP-Glc 4 μM , no se detectó marca radioactiva en la fracción TCAsol-EtOHpp, aun a tiempos largos de incubación.

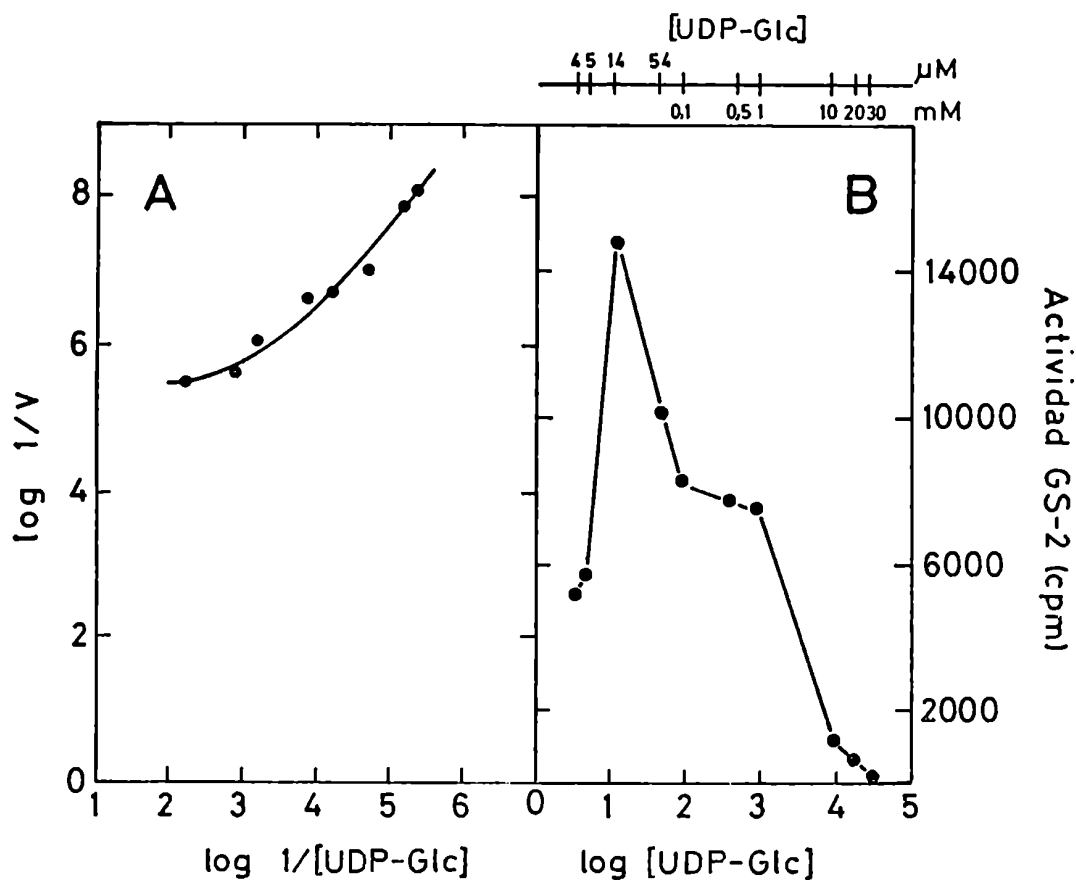


Fig. 27: EFECTO DE LA CONCENTRACION DE UDP-Glc SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2.

A) Gráfico de Lineweaver Burk. Las mezclas de incubación fueron las descritas en 2.3.2. (0,5 mg P₁₀₀) con excepción de la concentración de UDP-Glc. 1/ UDP-Glc se expresó en M^{-1} y 1/v en $\text{min} \cdot \text{M}^{-1}$.

B) Incorporación de (¹⁴C)glucosa a la fracción TCApp en función de la concentración de UDP-Glc expresada en μM , para 20 min de incubación.

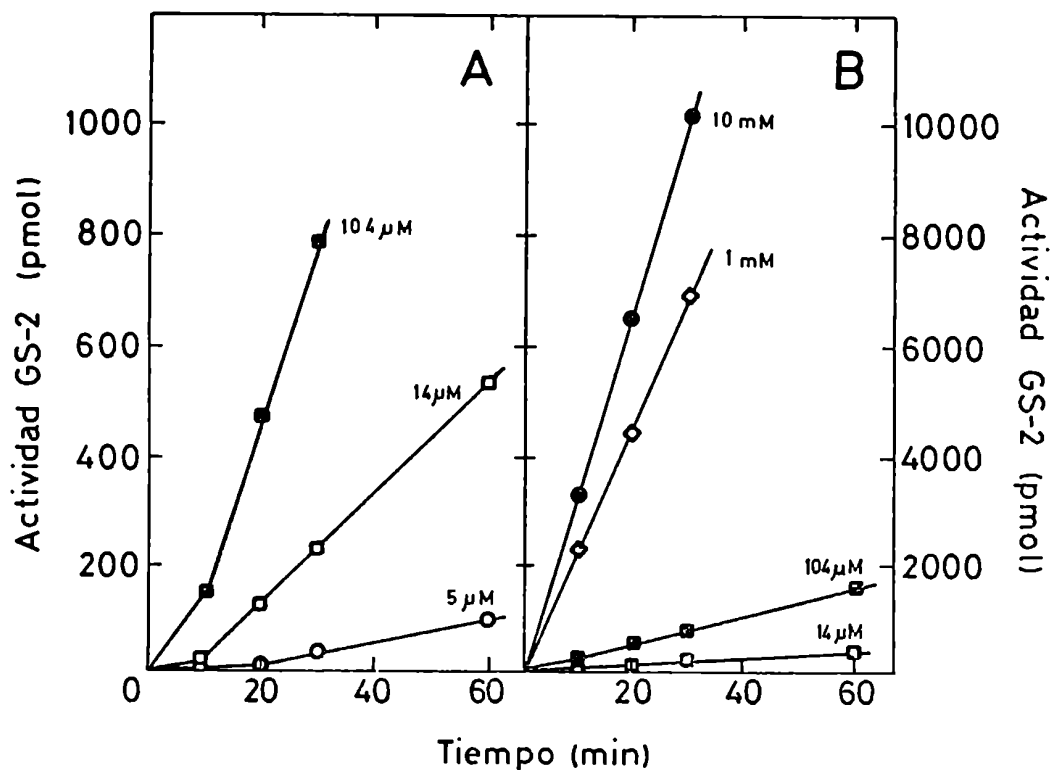


Fig. 28: CURVAS DE TIEMPO DE ACTIVIDAD GS-2 PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES DE UDP-Glc.

Las mezclas de incubación fueron las descritas en 2.3.2. (0,5 mg P₁₀₀), con excepción de la concentración de UDP-Glc. En todos los casos se agregaron 400 pmol de UDP-(¹⁴C)Glc (430 cpm/pmol) y se completó con el nucleótido-azúcar frío hasta la concentración indicada en cada caso. Las mezclas se incubaron por los tiempos indicados y se procesaron hasta obtener la fracción TCAp.

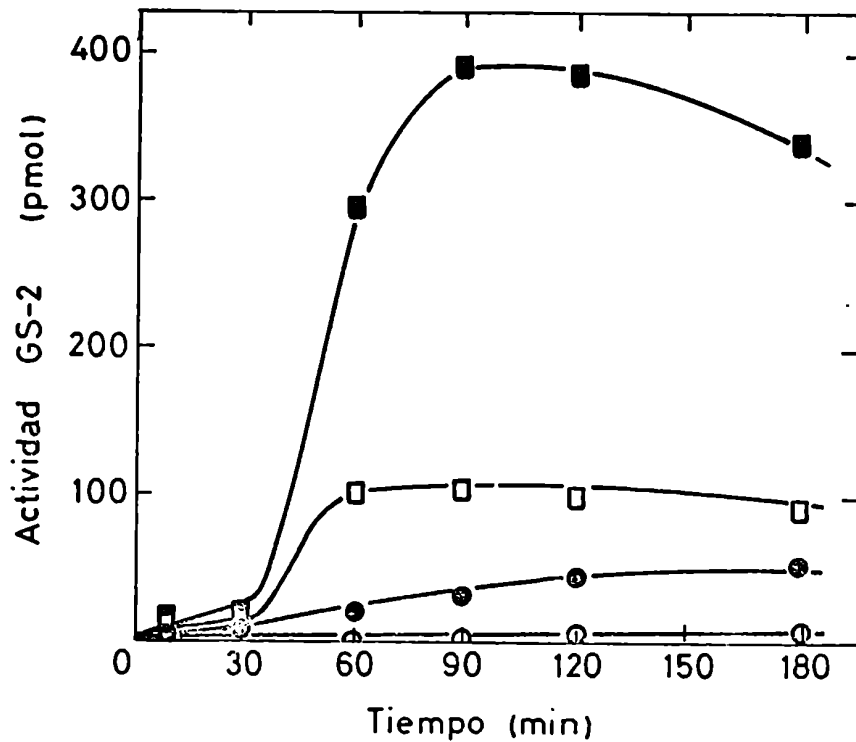


Fig. 29: CURVA DE TIEMPO DE INCORPORACION DE GLUCOSA A LAS FRACCIONES TCAp Y TCAol-EtOHp.

Las mezclas de reacción de GS-2 (0,5 mg P₁₀₀) se incubaron durante los tiempos indicados con UDP-(¹⁴C)Glc 14 μM (■ □, 120 cpm/pmol) ó 4 μM (● ○, 430 cpm/pmol). Los símbolos llenos indican la fracción TCAp y los abiertos TCAol-EtOHp.

3.2.2. RELACION PRECURSOR-PRODUCTO ENTRE LAS FRACCIONES TCA_{pp} Y TCA_{sol}-EtOH_{pp}.

A fin de estudiar la posibilidad de que la radiomarca soluble en TCA se originara a partir de la fracción TCA_{pp}, se realizó una incubación en dos etapas. Una mezcla de reacción de GS-2 se incubó durante 60 min con UDP-(¹⁴C)Glc 14 μ M, y se cromatografió luego en una columna de Sephadex G-75 (Fig. 30). El material radioactivo excluido, que era precipitable por TCA y que contenía proteína, se reincubó posteriormente con enzima fresca y UDP-Glc 1 mM no radioactivo. Como se observa en la Tabla IX, alrededor del 70% de la radioactividad originalmente insoluble en TCA se solubilizó durante la reincubación, indicando que la radiomarca insoluble en ácido era precursora de la que aparecía en la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp}.

Por otra parte, el hecho de que la reincubación en ausencia de nucleótido-azúcar solubilizara sólo el 27% de (¹⁴C)glucosa de la fracción TCA_{pp} (Tabla IX), indicó que para que el compuesto insoluble en TCA se transformara en soluble, debía incorporar previamente cierta cantidad de restos glucosilo de UDP-Glc.

3.2.3. EFECTO DE LA PREINCUBACION

Después de preincubar las mezclas de reacción de GS-2 en ausencia de nucleótido-azúcar, la adición de UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M (Fig. 31) o 14 μ M (Fig. 32) llevó a la desaparición o disminución de los correspondientes "lags" de incorporación a la fracción TCA_{pp}.

En cuanto a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp}, en el caso de UDP-Glc 14 μ M la preincubación produjo un efecto similar (Fig. 32), mientras que con UDP-Glc 4 μ M, después de la preincubación se detectó en esa fracción alrededor de 10% de la radioactividad total incorporada.

El efecto estimulador de la preincubación es independiente de la presencia de EDTA durante la misma (Fig. 31). Por el contrario, se requiere DTT. Como se muestra en la Tabla X, su omisión produjo una disminución de cerca del 90% de la actividad del control sin preincubar. Esta inhibición no se debió a una inactivación enzimática irreversible, ya que el agregado de DTT

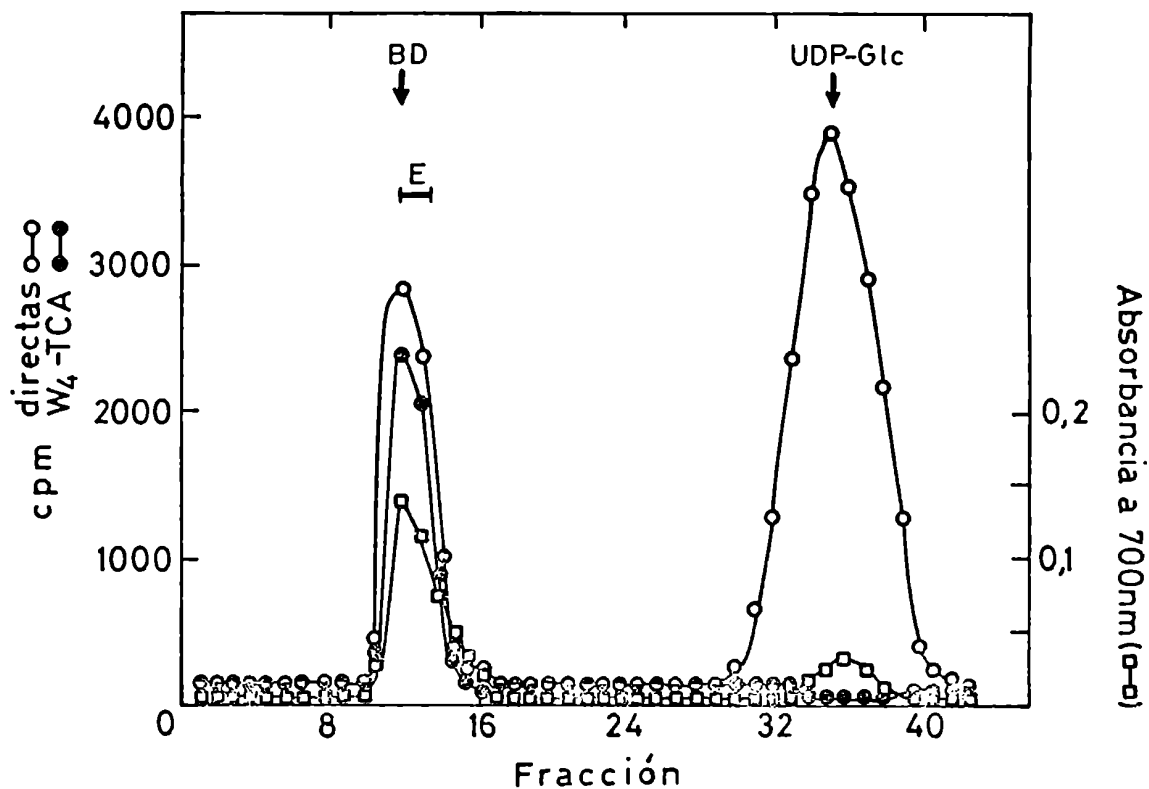


Fig. 30: CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-75 DE LA MEZCLA DE REACCION DE GS-2. Una mezcla de reacción de GS-2 (0,2 ml; 1 mg P₁₀₀) se incubó durante 60 min a 37°C con UDP-(¹⁴C)Glc 14 μM (120 cpm/pmol) y se sembró en una columna de Sephadex G-75 (1,2 x 25,5 cm), equilibrada con acetato de piridina 0,2 M pH 6,5. La proteína se eluyó con el mismo buffer, recogiendo fracciones de 0,5 ml. Se tomaron alícuotas de 50 μl de cada fracción y se determinó en ellas la concentración de proteínas (□), la radioactividad total (○), y la radioactividad precipitable en papeles de filtro W₄-TCA (●). Las fracciones correspondientes al V₀ se juntaron según se indica (E). B.D.: Azul dextrano.

Tabla IX: RELACION PRECURSOR-PRODUCTO DE LAS FRACCIONES TCA_{pp} Y TCA_{sol}-EtOH_{pp}.

TIEMPO DE REINCUBACION (min)	UDP-Glc 1 mM	cpm en	
		TCA _{pp}	TCA _{sol} -EtOH _{pp}
0	+	3200 (100)	0
40	+	860 (33)	1740
	-	2000 (73)	800

El pico E de la Fig. 30 se llevó a sequedad bajo presión reducida y se resuspendió en 0,1 ml Mes 0,1 M, pH 6,5. Se tomaron alícuotas de 10 μ l (4000 cpm) y se reincubaron durante los tiempos indicados en las condiciones de ensayo de GS-2, con 0,5 mg de enzima P₁₀₀, en ausencia o presencia de UDP-Glc 1 mM. Las mezclas se procesaron según se describió para el ensayo de GS-2. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de radioactividad reprecipitada por TCA.

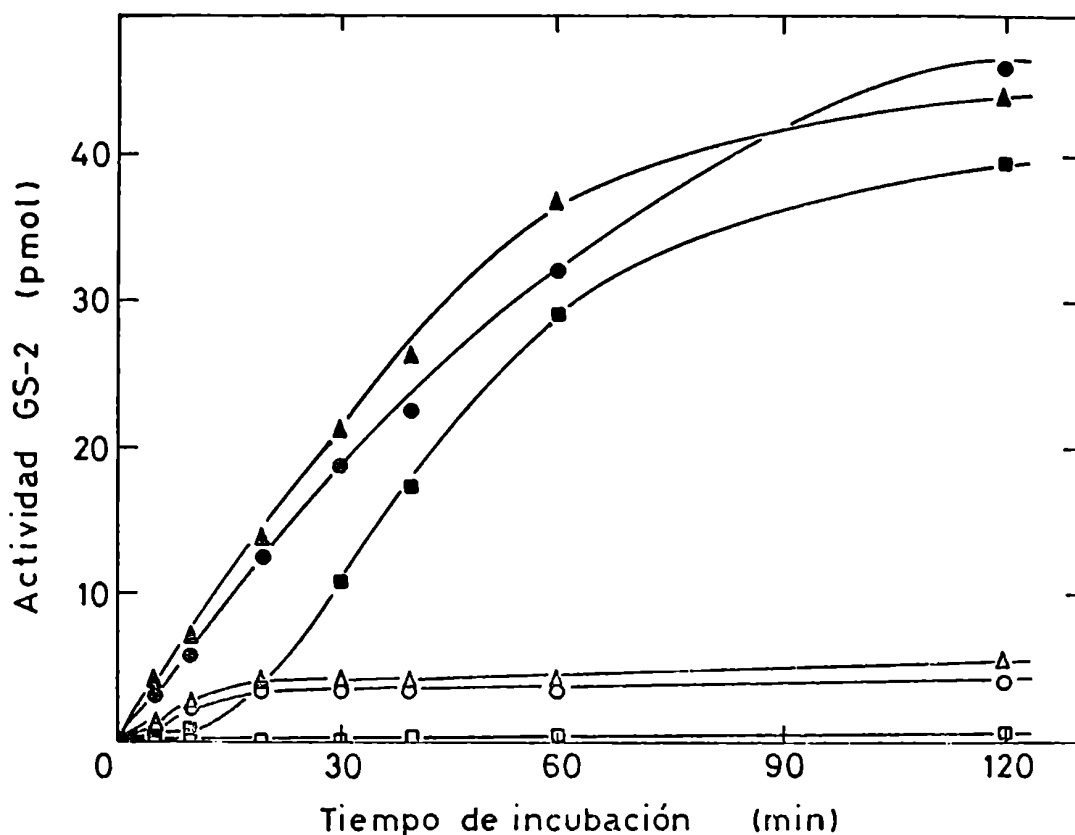


Fig. 31: EFECTO DE LA PREINCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2 MEDIDA CON
UDP-Glc 4 μ M.

Las mezclas de reacción de GS-2 (0,5 mg P₁₀₀) se incubaron durante los tiempos indicados con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M (■ □, 430 cpm/pmol). En ▲△, las mezclas se preincubaron durante 20 min a 37°C en ausencia de nucleótido-azúcar, y después se agregó UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M. En ●○, se omitieron EDTA y UDP-Glc durante la preincubación, y se agregaron luego en la incubación. Los símbolos llenos indican la incorporación en la fracción TCApp y los abiertos en la TCAzol-EtOHpp.

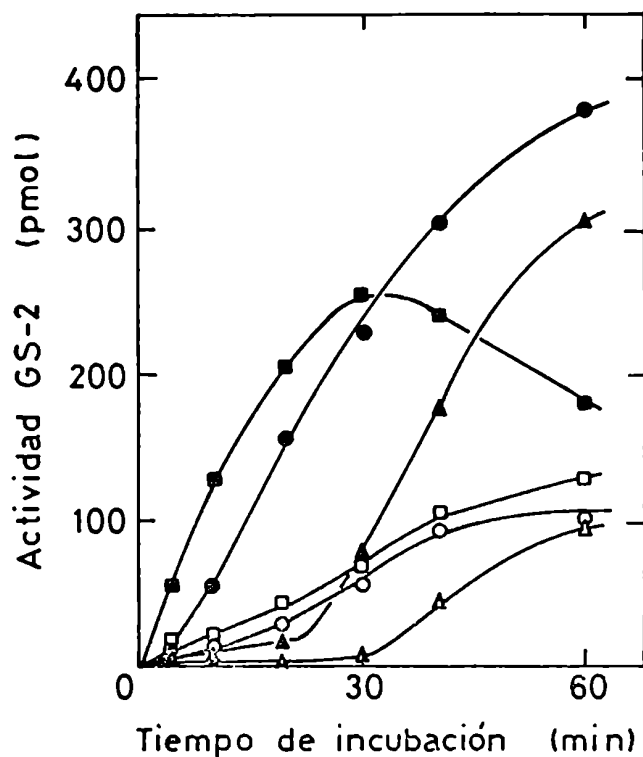


Fig. 32: EFECTO DE LA PREINCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2 MEDIDA CON
UDP-Glc 14 μ M.

Las mezclas de reacción de GS-2 (0,5 mg P₁₀₀) se incubaron durante los tiempos indicados con UDP-(¹⁴C)Glc 14 μ M (▲ △, 120 cpm/pmol). En ● ○, las mezclas se preincubaron durante 30 min a 37°C en ausencia de nucleótido-azúcar, el que se agregó durante la incubación. En ■ □, las mezclas se preincubaron durante 30 min con UDP-Glc 10 μ M y luego se agregó UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M (430 cpm/pmol).

Los símbolos llenos indican la fracción TCApp y los abiertos la fracción TCAsol-EtOHpp.

Tabla X: EFECTO DE LA PREINCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2.

PREINCUBACION	INCUBACION	ACTIVIDAD GS-2 (pmoles en TCApp)
No preincubada	S.C.	7
S.C. - UDP-Glc	+ UDP-(¹⁴ C)Glc 4 μM	18
S.C. - UDP-Glc - DTT	+ UDP-(¹⁴ C)Glc 4 μM	0,8
	+ UDP-(¹⁴ C)Glc 4 μM + DTT 5 mM	4
S.C. - UDP-Glc - DTT - EDTA	+ UDP-(¹⁴ C)Glc 4 μM	0,4
	+ UDP-(¹⁴ C)Glc 4 μM + DTT 5 mM + EDTA 50 mM	5

Mezclas de reacción de GS-2 (0,5 mg P₁₀₀) fueron preincubadas durante 20 min y luego incubadas durante 30 min a 37°C, con las omisiones y agregados indicados en cada caso.

S.C.: Sistema completo; (-): omisión; (+): agregado.

después de la preincubación revirtió parcialmente la caída de la actividad GS-2.

La desaparición del "lag" de incorporación a la fracción TCA_{pp} se verificó también al preincubar las mezclas de reacción con UDP-Glc 10 μ M no radioactivo (Fig. 32). En este caso la velocidad inicial fue todavía mayor que la obtenida cuando las mezclas se preincubaron en ausencia de nucleótido-azúcar. Sin embargo, a tiempos de incubación más largos, la incorporación de glucosa cayó al 50% de los valores del control. Respecto a la incorporación soluble en ácido, la misma fue lineal desde un principio (Fig. 32). Si bien la incorporación final fue superior a la del control, la diferencia no representó la caída de radioactividad de la fracción TCA_{pp}.

3.2.4. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

Cuando se estudió el efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad GS-2, se observó un comportamiento dependiente de la concentración de UDP-Glc. Así, con 14 μ M la actividad total fue proporcional hasta 1 mg de proteína, y la relación de incorporación a las fracciones TCA_{pp} y TCA_{sol}-EtOH_{pp} se mantuvo constante (Fig. 33 A).

Por el contrario, cuando los ensayos se hicieron con UDP-Glc 1 mM no hubo dependencia lineal de la actividad para las concentraciones de proteína ensayadas (Fig. 33 B). A partir de 1 mg de proteína, la incorporación total se mantuvo constante, y por otra parte, se invirtió la relación de transferencia de glucosa a ambas fracciones. A la mayor concentración estudiada, la incorporación a la fracción TCA_{pp} disminuyó, mientras que siguió aumentando en TCA_{sol}-EtOH_{pp}.

3.2.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Como se observa en la Figura 34, la actividad GS-2 es dependiente de la temperatura, manifestándose en un rango estrecho entre 23°C y 37°C. Mientras que el óptimo para la incorporación de glucosa a la fracción TCA_{pp} fue de 37°C, el correspondiente a TCA_{sol}-EtOH_{pp} fue de 30°C. En los dos casos, la actividad cayó rápidamente a ambos lados del óptimo, siendo totalmente inactiva a partir de 40°C.

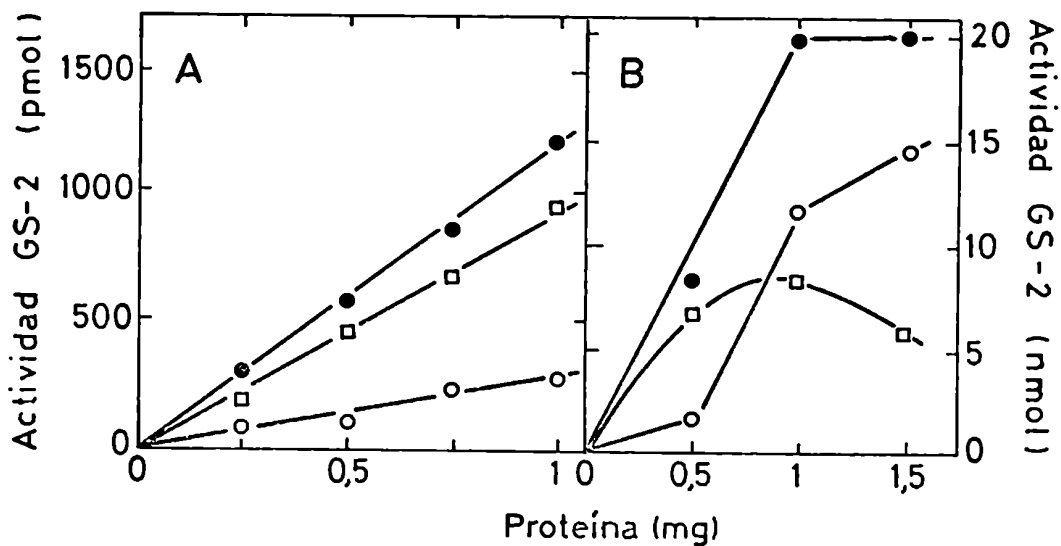


Fig. 33: EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2.
 A) Las mezclas de incubación fueron las descritas en 2.3.2. con UDP-(¹⁴C)Glc 14 μ M (120 cpm/pmol) y las cantidades de P₁₀₀ indicadas. El tiempo de incubación fue de 60 min.
 □, fracción TCApp; ○, fracción TCAsol-EtOHpp; ●, ambas fracciones.
 B) Las mezclas de incubación fueron las descritas en 2.3.2. con UDP-(¹⁴C)Glc 1 mM (1530 cpm/nmol) y las cantidades de P₁₀₀ indicadas. El tiempo de incubación fue de 30 min.
 Los símbolos son iguales que en A).

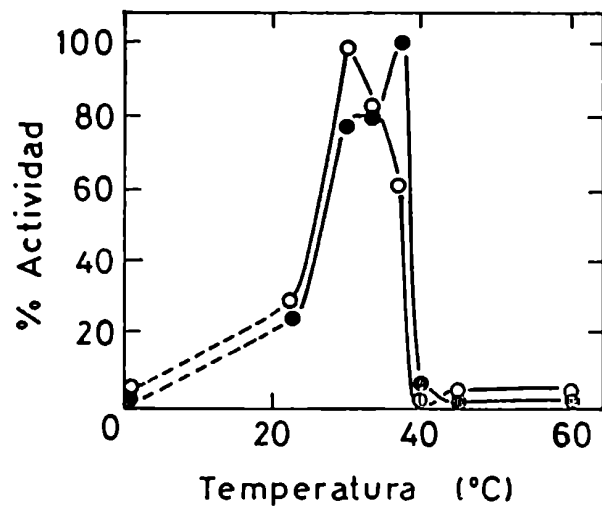


Fig. 34: CURVA DE TEMPERATURA DE LA ACTIVIDAD GS-2.

Las mezclas de incubación fueron las descritas en 2.3.2., con 0,5 mg P₁₀₀ y UDP-(¹⁴C)Glc 14 μM (120 cpm/pmol). Las incubaciones se realizaron a las temperaturas indicadas durante 60 min. Los símbolos llenos indican la fracción TCAp (100% = 300 pmol), y los abiertos TCAol-EtOHpp (100% = 79 pmol).

3.2.6.EFECTO DEL AGREGADO DE GLUCOGENO

En la Tabla XI se puede observar que el agregado de glucógeno a las mezclas de incubación produjo una inversión en la distribución de la radiomarca incorporada durante la reacción GS-2. Esto ocurrió independientemente de la concentración de UDP-Glc.

Por otra parte, la incorporación total de glucosa fue mayor (entre 2 y 5 veces, según la concentración de UDP-Glc), indicando que el glucógeno exógeno era mejor cosustrato para la transferencia que el aceptor endógeno.

Es importante destacar que cuanto mayor fue la concentración de glucógeno agregado, menor fue la incorporación en la fracción TCApp (Tabla XI). Por lo tanto, la radioactividad presente en esta fracción no era el resultado de la precipitación inespecífica de (^{14}C) glucógeno no unido a proteína, sintetizado durante la reacción.

La Figura 35 muestra las curvas de tiempo de actividad de glucógeno sintetasa (GS-1), medida como la incorporación de glucosa a partir de UDP-Glc a polisacárido exógeno (fracción KOH-EtOHpp). A las concentraciones de "primer" ensayadas (0,01%, 0,1% y 1%) y UDP-Glc 1 mM, se observó que la reacción no presentaba "lag" de actividad.

3.2.7.PROPIEDADES COMPARATIVAS DE LA ACTIVIDAD GS-2 CON LA ACTIVIDAD DE INCORPORACION DE GLUCOSA A GLUCOGENO EXOGENO (GS-1)

3.2.7.1.EFECTO DEL DITIOTREITOL

La actividad GS-2 requiere la presencia de grupos -SH, independientemente de la concentración de UDP-Glc utilizada (Tabla XII). Sin embargo, el efecto fue más marcado a baja concentración del nucleótido-azúcar.

Por el contrario, cuando se estudió el comportamiento de la actividad en presencia de glucógeno (GS-1), se vio que mientras que con UDP-Glc 4 μM la ausencia de DTT provocaba una disminución de 80% respecto del control, con UDP-Glc 1 mM sólo disminuía 25% (Tabla XII).

Tabla XI: EFECTO DEL GLUCOGENO SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2.

MEZCLA DE REACCION	GLUCOGENO (%)	ACTIVIDAD GS-2	
		TCA _{app}	TCA _{sol-EtOHpp}
		pmol/h	
S.C. UDP-Glc 4 μ M	0	42 (95)	2
	0,01	17 (9)	171
	1	2 (1)	198
S.C. UDP-Glc 14 μ M	0	345 (86)	56
	0,01	73 (12)	547
	1	12 (2)	784
S.C. UDP-Glc 1 mM		pmol/0,5 h	
	0	9439 (74)	3368
	0,01	7661 (27)	20489
	1	1305 (3)	40141

Los ensayos se realizaron como en 2.3.2., con 0,5 mg P₁₀₀ y UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M (430 cpm/pmol), 14 μ M (120 cpm/pmol), ó 1 mM (1580 cpm/nmol). El glucógeno se agregó según se indica.

Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de glucosa incorporada en la fracción TCA_{app} (100% = TCA_{app} + TCA_{sol-EtOHpp}).

S.C.: sistema completo.

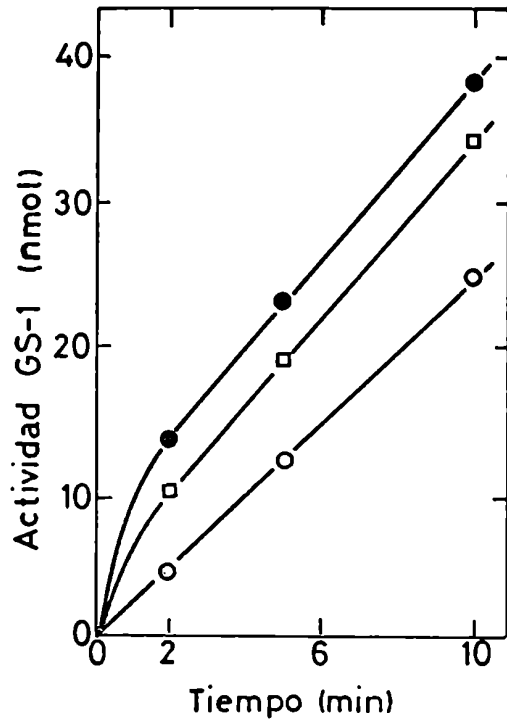


Fig. 35: CURVA DE TIEMPO DE ACTIVIDAD GS-1.
Las mezclas de incubación fueron las descritas en 2.3.1., con excepción de la concentración de glucógeno (○, 0,01%; □, 0,1%; ●, 1%). Se emplearon 0,5 mg de P₁₀₀ y UDP-(¹⁴C)Glc 1 mM (1580 cpm/nmol) por ensayo.

Tabla XII: EFECTO DEL DTT SOBRE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2.

MEZCLA DE REACCION	ACTIVIDAD GS-2		ACTIVIDAD GS-1 KOH-EtOHpp	
	TCApp	TCAso1-EtOHpp	Glucógeno 0,01%	Glucógeno 1%
	pmol/h		pmol/10 min	
S.C. UDP-Glc 4 μ M	39	0	44	194
	- DTT 0,5	0	6	40
S.C. UDP-Glc 14 μ M	345	56	ND	ND
	- DTT 9	0	ND	ND
S.C. UDP-Glc 1 mM	pmol/0,5 h		nmol/10 min	
	9439	3368	ND	38
	- DTT 841	0	ND	29

Los ensayos se realizaron según se describió en 2.3.1. y 2.3.2. para GS-1 y GS-2, con 0,5 mg P100, y las concentraciones de UDP-(¹⁴C)Glc indicadas. El glucógeno se agregó y el DTT se omitió según se indica.
S.C.: sistema completo; ND: no determinado.

3.2.7.2. ESPECIFICIDAD DEL NUCLEOTIDO-AZUCAR

Las actividades GS-1 y GS-2 son específicas para UDP-Glc, ya que ni ADP-Glc ni GDP-Glc fueron dadores para ambas reacciones. Esto se verificó tanto usando como sustratos los respectivos nucleótido- (^{14}C) glucosa como haciendo competir UDP- (^{14}C) Glc $14 \mu\text{M}$ con un exceso (10 mM) de nucleótido-azúcares no radioactivos.

3.2.7.3. EFECTO DEL pH

En la Figura 36 se muestran las curvas de actividad GS-1 y GS-2 en función del pH. Mientras que el óptimo para la incorporación de glucosa a la fracción TCApp fue de 6,5, la transferencia al glucógeno exógeno mostró su óptimo de actividad alrededor de pH 7,5. En el caso de GS-2, la actividad enzimática cayó rápidamente al 50% a ambos lados del óptimo, mientras que GS-1 se mantuvo activa en un rango más amplio.

3.2.7.4. EFECTO DE ACTIVADORES E INHIBIDORES

Como se observa en la Tabla XIII, la presencia de alta concentración de EDTA, KF o CH_3COOK , produjo la estimulación de la actividad GS-2, mientras que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Na_2SO_4 la inhibieron totalmente, aun en presencia de EDTA.

De las sales ensayadas, el EDTA produjo la mayor activación (Tabla XIII). Por otra parte, el efecto estimulador de esta sal dependió de la concentración de UDP-Glc, siendo menor a mayor concentración del nucleótido-azúcar (Tabla XIV).

Respecto a la actividad en presencia de glucógeno (Tabla XIII), sólo el EDTA produjo estimulación, ya que KF no alteró la actividad, y CH_3COOK la activó o inhibió ligeramente, dependiendo de la concentración de glucógeno usada. Por su parte, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Na_2SO_4 también resultaron inhibidores de la actividad GS-1.

Al igual que con la actividad GS-2, la activación por EDTA dependió de la concentración de UDP-Glc usada en el ensayo GS-1. Así, en presencia de UDP-Glc 1 mM sólo se produjo un aumento de 30% respecto al control (Tabla XIV). Por otra parte, la estimulación con EDTA fue más notoria a baja con-

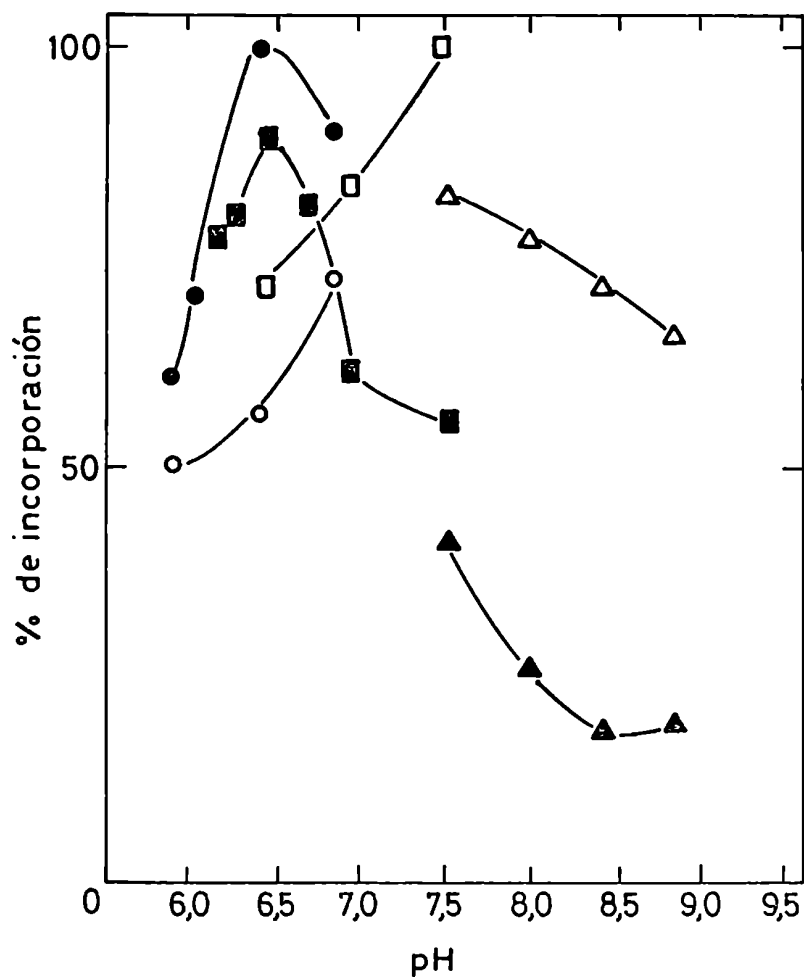


Fig. 36: CURVA DE pH DE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2.

Las mezclas de reacción (0,5 mg P_{100}) fueron las descritas en 2.3.1. y 2.3.2. para GS-1 (símbolos abiertos) y GS-2 (símbolos llenos), respectivamente, con excepción del buffer usado (0,1 M). Los tiempos de incubación fueron de 1 h (GS-2) ó 10 min (GS-1). Los resultados se expresan relativos a la máxima actividad (100%).

● ○, Mes; ■ □, Mops; ▲ △, glicilglicina/NaOH.

Tabla XIII: EFECTO DE SALES SOBRE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2.

S A L A G R E G A D A	A C T I V I D A D R E L A T I V A (%)		
	GS-2 TCApp	GS-1 KOH-EtOHpp	
		Glucógeno	
		0,01 %	1%
Ninguna	100 (8)	100 (6)	100 (40)
EDTA	488	517	233
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	17	8
Na ₂ SO ₄	12	18	20
KF	288	100	103
CH ₃ COOK	288	50	138
EDTA + (NH ₄) ₂ SO ₄	4	17	10
EDTA + Na ₂ SO ₄	25	33	33

Las mezclas de reacción fueron las descritas en 2.3.1. y 2.3.2. para GS-1 y GS-2, excepto que no contenían EDTA. Se usaron 0,5 mg P₁₀₀ y UDP-(¹⁴C)Glc 4 μM (430 cpm/pmol). Las sales se agregaron a una concentración de 100 mM. Los valores entre paréntesis indican las actividades de los controles (GS-2, pmol/h; GS-1, pmol/10 min).

Tabla XIV: EFECTO DEL EDTA SOBRE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2.

MEZCLA DE REACCION	ACTIVIDAD GS-2		ACTIVIDAD GS-1 KOH-EtOHpp Glucógeno 1%
	TCA _{pp}	TCA _{sol-EtOHpp}	
	pmol/h		pmol/10 min
S.C. UDP-Glc 4 μM	39 (100)	0	194 (100)
- EDTA	8 (21)	0	75 (39)
S.C. UDP-Glc 14 μM	345 (100)	56	ND
- EDTA	133 (39)	5	ND
	pmol/0,5 h		nmol/10 min
S.C. UDP-Glc 1 mM	9439 (100)	3368	38 (100)
- EDTA	5321 (56)	2117	29 (77)

Los ensayos se realizaron como en 2.3.1. y 2.3.2. para GS-1 y GS-2 con 0,5 mg P₁₀₀ y las concentraciones de UDP-(¹⁴C)Glc indicadas. El EDTA se omitió según se indica.

Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de actividad respecto a S.C.

S.C.: sistema completo; ND: no determinado.

concentración de glucógeno (Tabla XIII).

En la Tabla XV se muestra el efecto del agregado de distintos compuestos sobre las actividades GS-1 y GS-2. Si bien los nucleótidos de adenina y uridina, así como NADP, inhibieron ambas transferencias en distinto grado, en el caso de ADP el efecto fue mucho más marcado con la actividad en ausencia de glucógeno.

El agregado de Glc-6-P, en cambio, produjo una notable estimulación de ambas actividades enzimáticas, siendo menor el efecto con la actividad en presencia de glucógeno 1%.

Por último, el agregado de 1,5-D-gluconolactona, 2-deoxiglucosa o glucosamina, no alteró mayormente las actividades estudiadas.

3.2.8. DISCUSION

En esta sección hemos estudiado algunas propiedades de la reacción de transferencia de restos glucosilo de UDP-Glc a un compuesto insoluble en TCA en ausencia de glucógeno (actividad GS-2).

A fin de poder discutir algunos de los resultados que se han presentado, debemos tener en cuenta que, como se demostrará más adelante, durante la reacción en estudio se sintetizan glucanos α 1,4 unidos a proteína (proteoglucanos), los que son detectados por la aparición de (^{14}C)glucosa insoluble en TCA 10%.

Como se mencionó anteriormente, la solubilidad en TCA de los proteoglucanos dependerá del tamaño de las cadenas glucosídicas en relación con la porción proteica: el compuesto será insoluble en ácido cuando los glucanos sean cortos y no interfieran en la interacción proteína-proteína; por el contrario, será soluble cuando las cadenas glucosídicas sean lo suficientemente largas como para impedir la precipitación. Por otra parte, la degradación del proteoglucano por acción de enzimas proteolíticas o amilolíticas produciría la solubilización de marca radioactiva originalmente insoluble en TCA, falseando los datos de síntesis de glucanos unidos a proteína.

Por lo tanto, los datos sobre las propiedades de la reacción deben interpretarse teniendo en cuenta estos factores.

El tipo de cinética compleja observada al estudiar la reacción GS-2 en función de la concentración de UDP-Glc (Fig. 27), sugirió varias explica-

Tabla XV: ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2.

MEZCLA DE REACCION	ACTIVIDAD RELATIVA (%)		
	GS-2 TCApp	GS-1 KOH-EtOHpp Glucógeno	
		0,01%	1%
Sistema completo	100 (39)	100 (31)	100 (93)
+ 1,5-D-glucono- lactona	69	52	127
+ 2-deoxiglucosa	100	87	128
+ NADP	10	26	28
+ glucosamina	69	64	131
+ Glc-6-P	300	442	185
+ UMP	5	6	18
+ UDP	0,5	3	8
+ UTP	0,5	3	9
+ AMP	20	15	52
+ ADP	3	13	33
+ ATP	3	6	14

Las mezclas de reacción fueron las descritas en 2.3.1. y 2.3.2. para GS-1 y GS-2, con 0,5 mg P₁₀₀ y UDP-(¹⁴C)Glc 4 μM (430 cpm/pmol). Las adiciones se realizaron a una concentración de 10 mM.

Los valores entre paréntesis indican las actividades del sistema completo (GS-2, pmol/h; GS-1, pmol/10 min).

ciones no excluyentes entre sí. Una de ellas es que la síntesis del compuesto insoluble en TCA sería catalizada por una enzima alostérica. Alternativamente, el producto medido en la fracción TCApp involucraría la acción de más de una actividad enzimática, que podría ser tanto sintetizante como degradante de uniones glucosídicas α 1,4. En este caso, las enzimas podrían diferir en el Km para UDP-Glc, o bien en el tipo de aceptor sobre el que actúan, esto es, el largo de cadena de los glucanos unidos a proteína que les sirven de sustratos.

El modelo de iniciación de biosíntesis del glucógeno propuesto por Krisman (Fig. 24) postula la existencia de dos tipos de reacciones de transglucosilación. La primera implica la síntesis de la unión glucosil-aminoácido, y la segunda, la formación de uniones glucosídicas α 1,4. Dada la diferencia entre ambas reacciones, es de esperar que la enzima que inicia la cadena sea específica para esa reacción, y por lo tanto, no actúe en la síntesis de uniones glucosídicas α 1,4. Esta misma especulación se aplicaría aun en el caso de que la unión aminoacil-azúcar involucrara a un azúcar distinto de la glucosa: la enzima que transfiriera el primer resto glucosilo de la cadena tendría que reconocer como aceptor algo distinto a un residuo de glucosa. En este sentido, el mecanismo sería semejante al descrito para la iniciación de los proteoglicanos (Fig. 14).

Dado que, como se ha demostrado en músculo esquelético, la glucógeno sintetasa puede utilizar glucosa (121), maltosa o maltotriosa (122) como aceptores, pero a concentraciones muy superiores a las fisiológicas, es de esperar que exista al menos otra glucosil transferasa que actúe in vivo entre la enzima iniciadora de la cadena y la glucógeno sintetasa.

Por lo tanto, el tipo de cinética observada (Fig. 27) podría interpretarse en función del modelo de Krisman, que involucra la participación de más de una actividad enzimática.

Sin embargo, es importante considerar que el cosustrato aceptor de la reacción, es decir, los glucanos del proteoglucano, se van modificando a medida que transcurre el ensayo. Goldemberg demostró con la glucógeno sintetasa muscular que, considerando la misma concentración de extremos no reductores de distintos maltosacáridos, y dándole el valor de 1 a la velocidad observada con glucógeno, la actividad relativa en presencia de malto-

tetraosa a maltohexaosa era 1/500, de maltotriosa, 1/5000, y de maltosa 1/14000 (122). Estos datos sugieren que, aun cuando el ensayo GS-2 refleje la actividad de una sola enzima, la glucógeno sintetasa, a medida que se alargue la cadena glucosídica, el proteoglucano será un mejor aceptor para la transglucosilación. Esta explicación justifica tanto el tipo de cinética observada en función de la concentración de UDP-Glc (Fig. 27), como los períodos "lag" presentados por la actividad GS-2 en función del tiempo, para bajas concentraciones de UDP-Glc (Figs. 28 y 29).

El "lag" de incorporación a la fracción TCApp concuerda con lo reportado para otros sistemas de iniciación de síntesis de glucógeno, tales como músculo de conejo (155), Aerobacter aerogenes (159), hígado de rata (161) y E. coli (203), o de almidón, como la fosforilasa de papa, particulada (181) o soluble (204). En todos estos casos se planteó que el período de latencia reflejaba la necesidad de sintetizar un aceptor más apropiado para la reacción.

En el caso específico de este trabajo de tesis, se observó que el período "lag" variaba con las distintas preparaciones, y que aumentaba con el envejecimiento de la enzima. Estos hechos sugirieron que las preparaciones enzimáticas tenían proteoglucanos presintetizados, y que la variación del "lag" indicaba la diferencia en el largo de los glucanos preexistentes. En este sentido, en E. coli se demostró que el período "lag" de una preparación aumentaba con el envejecimiento de la misma, al tiempo que disminuía el glucano endógeno unido a proteína, debido a la presencia de una actividad amilolítica endógena (203).

En consecuencia, dado que los estudios de la reacción GS-2 y de sus productos se realizaron a tiempos mayores que los respectivos "lags", el sistema estudiado en el presente trabajo de tesis no representó la iniciación de la síntesis del glucógeno, sino el alargamiento de los intermediarios glucosídicos unidos a proteína, mediado por la glucógeno sintetasa.

Si bien la formación de un aceptor más eficiente para la glucógeno sintetasa requiere una reacción dependiente de UDP-Glc, tal como lo demuestra la desaparición del "lag" al aumentar la concentración de nucleótido-azúcar (Fig. 28) o al preincubar las mezclas de reacción en presencia del mismo (Fig. 32), el efecto de la preincubación en ausencia de UDP-Glc (Figs. 31 y

32) sugiere un mecanismo alternativo. Dado que aun con el agregado de UDP-Glc 0,1 mM se observó un período de latencia (Fig. 28), es poco probable que el mencionado efecto se deba a la presencia de nucleótido-azúcar contaminando la preparación enzimática. Una posible explicación podría ser la activación por proteólisis, ya sea de la enzima o del aceptor. Esto no ocurre en hígado de rata, donde la desaparición del "lag" tiene lugar sólo al preincubar en presencia de UDP-Glc (161).

El hecho de que la radioactividad en la fracción TCAsol-EtOHpp apareciera con un "lag" mayor que en la fracción TCApp (Fig. 29, UDP-Glc 14 μ M) sugirió la posibilidad de que la radiomarca originalmente insoluble en ácido pasase posteriormente a la fracción TCAsol-EtOHpp. Esto se confirmó con un experimento de pulso y "chase" en dos etapas, en el que el material radiomarcado insoluble en TCA, aislado por cromatografía en Sephadex G-75 (Fig. 30), se reincubó con un exceso de nucleótido-azúcar frío y enzima fresca; la mayor parte de la radiomarca insoluble en TCA pasó a ser soluble después de la reincubación (Tabla IX).

Como se mencionó anteriormente, la solubilización puede explicarse tanto por degradación amilolítica o proteolítica del proteoglucano, como por aumento de la porción glucosídica frente a la proteína. De estas posibilidades, solo la amilólisis justifica el hecho de que, aún después de que comenzara a aparecer radiomarca soluble en ácido, se siguiera incorporando (14 C)glucosa a la fracción TCApp (Fig. 29, UDP-Glc 14 μ M), ya que en los otros casos se esperaría una caída abrupta en la incorporación al compuesto insoluble. En consecuencia, en este estudio, el ensayo GS-2 representó la medición conjunta de por lo menos dos actividades enzimáticas: la glucógeno sintetasa y una actividad amilolítica.

La existencia de una actividad amilolítica endógena se comprobó mediante la determinación directa de la misma, midiendo el glucógeno remanente después de incubar una cantidad determinada de polisacárido con la fracción P₁₀₀: después de 24 h a temperatura ambiente el glucógeno agregado desapareció por completo.

El requerimiento de UDP-Glc para que la solubilización tuviera lugar (Tabla IX) indicó que el compuesto insoluble en TCA tenía que incorporar previamente cierta cantidad de residuos de glucosa. Esto refleja entonces la

necesidad de un determinado largo de cadena glucosídica por parte de la enzima amilolítica, y explica la falta de incorporación a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} en presencia de UDP-Glc 4 μ M (Fig. 29). Esto justifica también el hecho de que después de la preincubación, haya aumentado la incorporación a partir de UDP-Glc 4 μ M a la fracción TCA_{pp} (reflejando probablemente la síntesis de glucanos más largos), y paralelamente haya aparecido marca radioactiva en la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} (Fig. 31).

Otra evidencia de la existencia de una actividad degradante del proteoglucano, que podría ser la actividad amilolítica antes mencionada, está dada por el hecho de que, muy frecuentemente, al cromatografiar las mezclas de incubación en columnas de Sephadex G-75, como en la Fig. 30, la radioactividad precipitable por TCA disminuía en función del tiempo pasado después de la corrida cromatográfica. Esto indicaba, como en el caso de E. coli (203), la existencia de una enzima degradante que actuaba, aun a 0-4°C, sobre el proteoglucano con el que cocromatografiaba.

Como se vio en la sección 3.1., el agregado de PMSF durante la preparación de la enzima produjo una notable estimulación de la actividad independiente de "primer" presente en la fracción P₁₅₀, aumentando fundamentalmente la incorporación de glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} (Tabla VIII). Dado que en esta fracción el polisacárido endógeno era indetectable con el método colorimétrico usado (88), el mencionado aumento no podía deberse a la transferencia de restos glucosilo a glucógeno no unido a proteína. Por el contrario, probablemente esta fracción tuviera una gran actividad de síntesis de glucanos α 1,4 unidos a proteína, dando como resultado un gran crecimiento de la porción glucosídica y, en consecuencia, la solubilización del proteoglucano. Alternativamente, en esta fracción podría haber una mayor degradación del proteoglucano, y por lo tanto una gran provisión de "primers" solubles para la glucógeno sintetasa.

En cuanto a la dependencia que muestra la distribución de la incorporación de glucosa a las fracciones soluble e insoluble en TCA, en función de la concentración de UDP-Glc y proteínas (Fig. 33), los datos reflejan, una vez más, la complejidad del sistema en estudio, que involucra más de una actividad enzimática, y representa el balance entre el largo de los glucanos sintetizados, su solubilidad en TCA, y su capacidad de ser sustratos para la

degradación amilolítica.

Por otra parte, el hecho de que la incorporación a las fracciones TCA_{pp} y TCA_{sol}-EtOH_{pp} tuviera óptimos de temperatura distintos (37°C y 30°C, respectivamente; Fig. 34), podría reflejar la diferencia entre los óptimos de la glucógeno sintetasa y la enzima amilolítica.

Como se ha discutido en la sección 3.1.1., la presencia de glucógeno endógeno en la preparación enzimática producía un aumento en la incorporación de glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp} durante el ensayo GS-2 (Tabla VIII). Un efecto similar se observó al agregar polisacárido exógeno (Tabla XI): independientemente de la concentración de UDP-Glc ensayada, el agregado de glucógeno inhibió la incorporación de (¹⁴C)glucosa al compuesto insoluble en TCA, pero aumentó notablemente la correspondiente a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp}. Estos resultados coinciden con los obtenidos en hígado de rata (161) y *E. coli* (203), y reflejan la competencia por la glucógeno sintetasa de dos tipos de "primers" diferentes: uno, que contiene proteína, es insoluble en TCA, mientras que el otro, el glucógeno agregado, es un mejor sustrato, y permanece soluble en ácido.

La detección de (¹⁴C)glucosa en la fracción TCA_{pp} aun en presencia de "primer" exógeno (Tabla XI) podría reflejar la actividad de una α 1,4 glucosil transferasa distinta de la glucógeno sintetasa, y específica para el alargamiento inicial del proteoglucano, cuya existencia putativa ha sido discutida anteriormente en esta sección. Sin embargo, dado que la mencionada incorporación disminuye al aumentar el polisacárido exógeno (Tabla XI), esta hipótesis parece poco probable.

Alternativamente, tal como se mencionó al comienzo de la sección Resultados y anteriormente en esta discusión, es más lógico suponer que los ensayos GS-1 y GS-2 reflejan dos formas distintas de medir una misma enzima, la glucógeno sintetasa, y que el efecto en discusión se debe a la activación de la glucógeno sintetasa por una baja concentración de glucógeno, de modo similar a lo descrito para la fosforilasa (140).

Por otra parte, la cinética de la reacción de incorporación de (¹⁴C)glucosa al polisacárido exógeno (Fig. 35), confirmó la mayor efectividad del glucógeno como sustrato de la glucógeno sintetasa, ya que en su presencia la reacción ocurrió sin período "lag". Esto también se verificó cuando se

analizó la incorporación de (^{14}C)glucosa a la fracción TCAsol-EtOHpp de un ensayo GS-2 realizado en presencia de glucógeno exógeno (datos no mostrados). Estas observaciones coinciden con lo reportado para la síntesis "de novo" de glucógeno catalizada por extractos de músculo de conejo (155), de A. aerogenes (159) y de hígado de rata (162). En el primer caso se demostró que el sistema era tan sensible al agregado de "primer", que 3 $\mu\text{g/ml}$ de glucógeno abolían totalmente el período de latencia observado en ausencia de polisacárido.

Aun cuando los ensayos GS-1 y GS-2 representen la medición de la glucógeno sintetasa, el estudio comparativo de ambas actividades no debe revelar obligadamente propiedades similares, ya que como se mencionó anteriormente, esta enzima es muy sensible a la variación del sustrato aceptor. Esto se confirmó por el hecho de que en muchos casos, como se verá a continuación, el comportamiento de la glucógeno sintetasa durante el ensayo GS-1 en presencia de glucógeno 0,01% se aproximó más a lo reflejado por la actividad GS-2, que a la misma actividad GS-1 con glucógeno 1%.

Respecto del nucleótido-azúcar dador, ambos ensayos demostraron especificidad para UDP-Glc, comparada con ADP-Glc y GDP-Glc. Esto concuerda con la aceptada especificidad de la glucógeno sintetasa de distintos tejidos de mamíferos (98), la cual también puede usar como sustrato a ADP-Glc, pero con una eficiencia mucho menor. Así, por ejemplo, en músculo de conejo, a igualdad de concentración, TDP-Glc reacciona a una velocidad igual a 1/20 de la correspondiente a UDP-Glc (205).

En cuanto al efecto de DTT (Tabla XII), mientras que el ensayo GS-2 mostró una dependencia absoluta de grupos -SH, independientemente de la concentración de UDP-Glc, en el ensayo GS-1 este requerimiento disminuyó al aumentar la concentración de nucleótido-azúcar o glucógeno. Así, en tanto que en presencia de glucógeno 1%, la ausencia de DTT representó una inhibición de 80% del control con UDP-Glc 4 μM , con UDP-Glc 1 mM el ensayo se inhibió sólo 25%. Estos datos indican que la glucógeno sintetasa tiene grupos -SH esenciales para la actividad enzimática, los cuales son protegidos por la unión del glucógeno o de UDP-Glc a sus respectivos sitios enzimáticos. El requerimiento de grupos -SH para la actividad de la glucógeno sintetasa fue demostrado por Kornfeld y Brown en músculo de conejo (205). Estos autores

comprobaron que al almacenar la enzima en ausencia de grupos -SH se perdía la actividad enzimática, la cual podía recuperarse por agregado de cisteína, glutatión o 2-mercaptoetanol. Por otra parte, la preincubación de una enzima activa con p-hidroximercuribenzoato llevaba a la inactivación total de la preparación, indicando directamente la presencia de grupos -SH esenciales para la actividad de la glucógeno sintetasa.

Tal como se vio en la sección 3.2.3., la estimulación de la actividad GS-2 por la preincubación en ausencia de nucleótido-azúcar (Figs. 31 y 32), dependía de la presencia de DTT, ya que su omisión producía una inhibición de 90% de la actividad del control sin preincubar (Tabla X). Este efecto no era irreversible, ya que el agregado posterior de DTT durante la incubación revertía parcialmente la inhibición. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Sacristán y Rosell-Pérez en músculo cardíaco de rata (206). Estos autores demostraron que al preincubar los extractos en presencia de 2-mercaptoetanol, la actividad de glucógeno sintetasa I, medida en ausencia de Glc-6-P, aumentaba en función del tiempo de preincubación (aproximadamente 10 veces en 60 min). Los autores concluyeron, en base a datos adicionales, que durante la preincubación se producía la transformación de la glucógeno sintetasa de la forma D a la I, mediada por la glucógeno sintetasa D-fosfatasa presente en la preparación. Por lo tanto, aun cuando el efecto estimulador de la preincubación en ausencia de UDP-Glc (Figs. 31 y 32) podría deberse a una activación proteolítica de la enzima o del aceptor, tal como hemos discutido anteriormente, los resultados comentados recientemente sugieren una explicación alternativa. Así, la fracción P₁₀₀ podría tener actividad de glucógeno sintetasa D-fosfatasa, la que, en presencia de grupos -SH, transformaría la glucógeno sintetasa D presente en I, y por lo tanto, al incubar posteriormente la mezcla con UDP-Glc se observaría una estimulación del ensayo GS-2.

En cuanto al efecto comparativo de distintas sales, mientras que la actividad GS-2 se estimuló por el agregado de EDTA, KF o CH₃COOK, sólo el EDTA activó el ensayo GS-1 (Tabla XIII). La estimulación de la actividad GS-1 fue mayor cuanto menor la concentración del glucógeno, pareciéndose más al comportamiento de la enzima en el ensayo en ausencia de polisacárido (Tabla XIII). Por otra parte, en ambos ensayos la magnitud de la activación dependió

de la concentración de UDP-Glc, siendo menor a mayor concentración del nucleótido-azúcar (Tabla XIV).

En el modelo de iniciación de la biosíntesis del glucógeno esquematizado en la Figura 24, se ha postulado que la dependencia de alta concentración salina refleja una propiedad diferencial de la enzima involucrada en la iniciación respecto de la glucógeno sintetasa. Estas conclusiones se basaron en el hecho de que en hígado de rata, el ensayo llevado a cabo en presencia de glucógeno 1% y UDP-Glc 1 mM era independiente de la presencia de EDTA (162). Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis referidos al comportamiento del ensayo GS-1 en presencia de bajas concentraciones de glucógeno y/o UDP-Glc (Tablas XIII y XIV), indican que el efecto salino involucra a la glucógeno sintetasa.

Es interesante destacar que Sacristán y Rosell-Pérez encontraron que la conversión de la glucógeno sintetasa de corazón de rata de la forma D a la I durante la preincubación con 2-mercaptoetanol, podía inhibirse con el agregado de ATP-Mg⁺⁺ durante la preincubación; esta inhibición era a su vez revertida totalmente por el agregado de EDTA (206). Los autores interpretaron estos datos como indicando la presencia en la preparación de una actividad de glucógeno sintetasa quinasa, que actuaba inactivando por fosforilación tanto a la forma D como a la I. Dado que en nuestro caso, el efecto estimulador de la preincubación en ausencia de UDP-Glc fue independiente de la presencia de EDTA (Fig. 31), es poco probable que la activación causada por esta sal se debiera a sus propiedades como quelante de cationes, requeridos por alguna enzima inactivante de la reacción (por ejemplo, una quinasa).

Si bien la inhibición producida por (NH₄)₂SO₄ y Na₂SO₄ sobre GS-1 y GS-2 (Tabla XIII) sugirió, una vez más, que ambos ensayos involucraban la misma enzima, la glucógeno sintetasa, estos resultados se contradicen con lo descrito por Thomas et al. para la enzima de corazón bovino (207). Estos autores encontraron que Na₂SO₄ no afectaba a la glucógeno sintetasa D (aun a una concentración de 145 mM) mientras que activaba a la forma I, de modo similar a Glc-6-P y otros aniones divalentes, inorgánicos u orgánicos. La V_{máx} obtenida era igual para todos los activadores, en tanto que lo que variaba eran los respectivos A_{0,5}; el correspondiente a Glc-6-P, 5 μM, era el menor de todos los activadores ensayados. Por otro lado, la presencia con-

junta de dos activadores resultaba inhibitoria, indicando que la activación afectaba al mismo sitio enzimático. Así, Na_2SO_4 14 mM resultaba activador a bajos niveles de Glc-6-P, e inhibidor a concentraciones mayores. Un efecto similar fue descrito para la glucógeno sintetasa D de hígado de rata: la presencia de Na_2SO_4 10 mM inhibía en un 80% la estimulación producida por Glc-6-P (208). En consecuencia, la inhibición por sulfato de la glucógeno sintetasa (Tabla XIII) podría interpretarse como reflejando la contaminación de la preparación enzimática con Glc-6-P, pero dado que este efecto se observó también con preparaciones purificadas de la enzima (ver sección 3.5.), esta explicación parece poco probable.

Es importante notar que en el caso de la glucógeno sintetasa de levadura, el sulfato se comporta como inhibidor cuando se lo agrega a una concentración de 100 mM, y como activador, a 10 mM (187). Dado que en el presente trabajo de tesis no se ensayó el efecto a concentraciones menores que 100 mM, es posible que, también en este caso, el sulfato se comporte como un activador de la glucógeno sintetasa.

La respuesta frente al sulfato marca otra diferencia entre el sistema de corazón y lo observado en hígado de rata (161) y E. coli (203). En ambos casos el sulfato a alta concentración produjo una estimulación de la actividad en ausencia de "primer", resultando incluso más efectivo que el EDTA como activador. En corazón, por el contrario, la inhibición por sulfato se mantuvo aun en presencia de EDTA (Tabla XIII).

Por otra parte, mientras que en hígado de rata (161) y E. coli (203), la actividad GS-2 mostró un requerimiento absoluto de alta concentración salina, en el músculo cardíaco dicha actividad se detectó aún en ausencia de sales (Tablas XIII y XIV).

El requerimiento de alta concentración salina fue demostrado además para la actividad de almidón sintetasa independiente de "primer" presente en hojas de espinaca (175) y en maíz dulce (176), así como también para la síntesis "de novo" catalizada por la glucógeno sintetasa de E. coli (209,210). En todos estos casos se sugirió que las preparaciones enzimáticas contenían glucanos no unidos a proteína, y que la alta concentración salina era requerida para aumentar la afinidad de la sintetasa por el "primer" endógeno, y permitir así que la aparente síntesis "de novo" tuviera lugar. Dado que en

el caso de corazón la actividad independiente de "primer" se detectó aun en ausencia de sales (Tablas XIII y XIV), y que además, las sales ensayadas tuvieron un efecto muy distinto, inhibiendo en algunos casos (Tabla XIII), y activando en diferente grado, según la concentración de UDP-Glc, en otros (Tabla XIV), es poco probable que la activación por sales se debiera, en el presente trabajo de tesis, a la hipótesis recién mencionada.

El agregado de distintos activadores e inhibidores (Tabla XV) mostró, al igual que en el caso del EDTA, un comportamiento similar entre el ensayo GS-1 con baja concentración de glucógeno y el ensayo GS-2. Esto fue más notorio en el caso de gluconolactona y glucosamina, ya que mientras que ambos compuestos inhibieron por igual los ensayos antes mencionados, resultaron ligeramente estimuladores de la actividad GS-1 en presencia de glucógeno 1% (Tabla XV). Es interesante destacar que los datos referidos a gluconolactona contrastan con la inhibición total reportada para la glucógeno sintetasa de hígado de rata (211) y de E. coli (212).

Por otra parte, la inhibición provocada en ambos ensayos por los nucleótidos de uridina y adenina (Tabla XV) coincidió con lo observado por otros autores para la glucógeno sintetasa I de corazón bovino (207), e I y D de hígado (208) y músculo de rata (100, 103, 213).

En cuanto a la estimulación por Glc-6-P (Tabla XV), dado que la fracción P₁₀₀ representaba una enzima muy poco purificada, dicho efecto podía deberse no sólo a la activación de la glucógeno sintetasa I (100, 103), que es la forma enzimática medida en ausencia de activador, sino también a la presencia adicional de enzima en la forma D, tal como se ha discutido anteriormente al tratar el efecto del DTT durante la preincubación.

En relación con este aspecto, Huijing et al. (201) y Sacristán y Rosell-Pérez (206) demostraron que la relación de actividad (%I) de la glucógeno sintetasa de músculo cardíaco de rata variaba de animal en animal (entre 8 y 70%), correlacionándose de forma inversamente proporcional al contenido de glucógeno del tejido. Dado que la fracción P₁₀₀ no tenía glucógeno detectable por el método colorimétrico usado (ver sección 3.1.), es probable que la glucógeno sintetasa se encontrara fundamentalmente en la forma I, y por lo tanto, que el efecto de Glc-6-P se debiera principalmente a la activación de esta forma enzimática.

Respecto a las diferencias observadas en los óptimos de pH de ambos ensayos (Fig. 36), la misma no es indicativa de que las actividades GS-1 y GS-2 representen distintas enzimas. Thomas et al. (207) demostraron que el pH óptimo para la glucógeno sintetasa I de corazón bovino dependía de la presencia de activadores, pasando de 7,0 en ausencia de efectores, a 7,9 en presencia de Glc-6-P o Na_2SO_4 . Dado que el glucógeno podría tener un efecto activador sobre la enzima, tal como lo hemos discutido anteriormente en esta sección, la diferencia de los óptimos de pH podría deberse a la ausencia de polisacárido en el ensayo GS-2. Alternativamente, el corrimiento hacia la zona ácida en el ensayo GS-2 podría reflejar la menor actividad, en ese rango de pH, de la enzima degradante del proteoglucano.

3.3. PROPIEDADES DE LOS PRODUCTOS RADIOACTIVOS INSOLUBLES EN TCA SINTETIZADOS DURANTE LA REACCION GS-2

Los compuestos radioactivos insolubles en TCA, sintetizados por la fracción P₁₀₀ a partir de UDP-(¹⁴C)Glc durante el ensayo GS-2, fueron sometidos a tratamientos enzimáticos y químicos, a fin de poder caracterizar su estructura.

3.3.1. TRATAMIENTOS ENZIMATICOS. AMILOLISIS Y PROTEOLISIS

Como se observa en la Tabla XVI, la incubación con enzimas degradantes de uniones glucosídicas α 1,4, del compuesto TCApp sintetizado en un ensayo GS-2 con UDP-(¹⁴C)Glc 14 μM , produjo la solubilización de la mayor parte de la radioactividad originalmente insoluble en TCA.

Los productos radioactivos liberados por los tratamientos con α -amilasa, β -amilasa y amiloglucosidasa, cocromatografiaron con standards de maltosacáridos, maltosa y glucosa, respectivamente (Fig. 37).

Por otra parte, la digestión del compuesto TCApp con proteasa libre de amilasa, solubilizó 70% de la radioactividad (Tabla XVI). Los productos radioactivos solubilizados no se movieron del lugar de siembra cuando se los sometió a electroforesis en papel, tanto en condiciones neutras como alcalinas.

Tabla XVI: DIGESTION ENZIMATICA DEL COMPUESTO INSOLUBLE EN TCA.

TRATAMIENTO ENZIMATICO	RADIOACTIVIDAD REPRECIPITADA CON TCA DESPUES DEL TRATAMIENTO (%)
Ninguno	95
α -amilasa	20
β -amilasa	48
Amiloglucosidasa	24
Subtilisina	27

Las condiciones de los tratamientos fueron las descritas en 2.6.1. Los controles se realizaron omitiendo las enzimas durante la incubación. Las fracciones TCA_{pp} tratadas provenían de una incubación de 60 min con UDP-(¹⁴C)Glc 14 μ M.

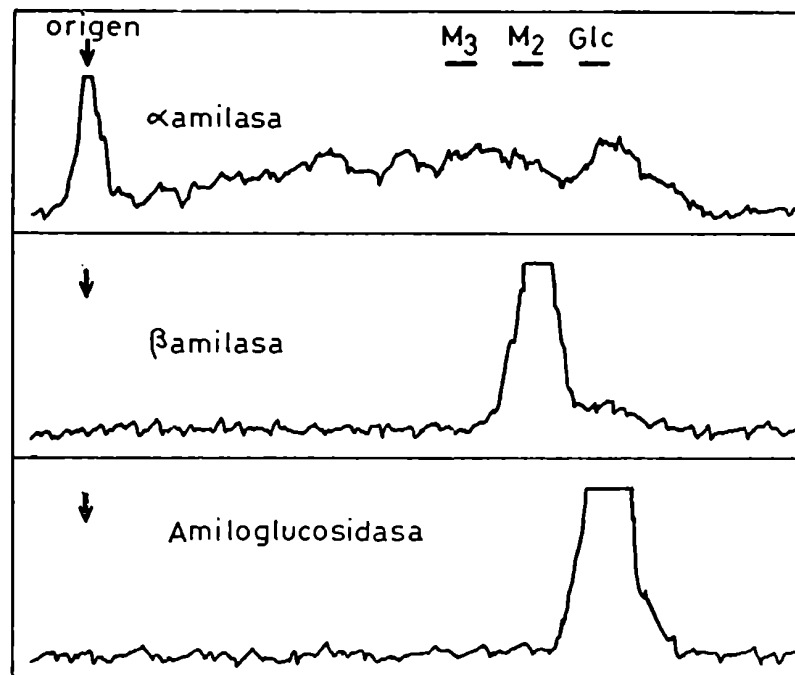


Fig. 37: CROMATOGRAFIA DE LOS PRODUCTOS SOLUBILIZADOS POR ENZIMAS AMILOLITICAS.

Los productos solubilizados durante los tratamientos con α - y β -amilasa y amiloglucosidasa (Tabla XVI) se cromatografiaron en papel con n-butanol/ piridina/agua (4:3:4), como se describi6 en 2.7.1.
 Glc, glucosa; M₂, maltosa; M₃, maltotriosa.

3.3.2. TRATAMIENTOS QUIMICOS

3.3.2.1. HIDROLISIS ACIDA SUAVE

El compuesto radioactivo insoluble en TCA, producto de la reacción GS-2, es sensible a la hidrólisis ácida suave. Como se observa en la Figura 38, el tratamiento con HCl 0,01 N (pH 2) durante 15 min a 100°C de las fracciones TCApp sintetizadas durante distintos tiempos de incubación con UDP-(¹⁴C) Glc 4 μM, produjo la liberación de 60-70% de la radioactividad originalmente insoluble en ácido. Los productos liberados se recuperaron en la fase acuosa de una partición con cloroformo-metanol-agua (3:2:1). El porcentaje de liberación se mantuvo más o menos constante en los compuestos sintetizados a partir del período "lag".

El análisis por cromatografía en papel de los compuestos liberados mostró que, independientemente de la duración del ensayo GS-2, aun en las muestras correspondientes al período "lag", sólo se detectaba un pico radioactivo en el origen de la siembra, que aumentaba con el tiempo de incubación (Fig. 39).

El estudio de la cinética de la hidrólisis ácida con HCl 0,01 N (pH 2), mostró que el 50% de la radioactividad liberada a la fase acuosa de la partición cloroformo-metanol-agua (3:2:1) aparecía entre los 30 segundos y 1 minuto de hidrólisis (Figura 40). Este $t_{1/2}$ fue el mismo para los productos correspondientes tanto a 30 como a 60 minutos de incubación.

La misma cinética de hidrólisis con HCl 0,01 N se verificó cuando se midió la radioactividad remanente en el compuesto insoluble en TCA. Como se observa en la Figura 41 A, la hidrólisis ácida a pH 2 produjo la liberación de 70% de la radioactividad originalmente insoluble en ácido, con un $t_{1/2}$ (tiempo de desaparición del 50% de la radioactividad liberada) entre 30 segundos y 1 minuto.

Por otra parte, cuando el compuesto insoluble en TCA resistente a la hidrólisis con HCl 0,01 N, fue tratado con HCl 0,1 N, se liberó alrededor de 70% de la radioactividad remanente del tratamiento a pH 2, con un $t_{1/2}$ cercano a 2 min (Fig. 41 A). Como resultado de ambas hidrólisis secuenciales se produjo la liberación de 90% de la radiomarca original, con un

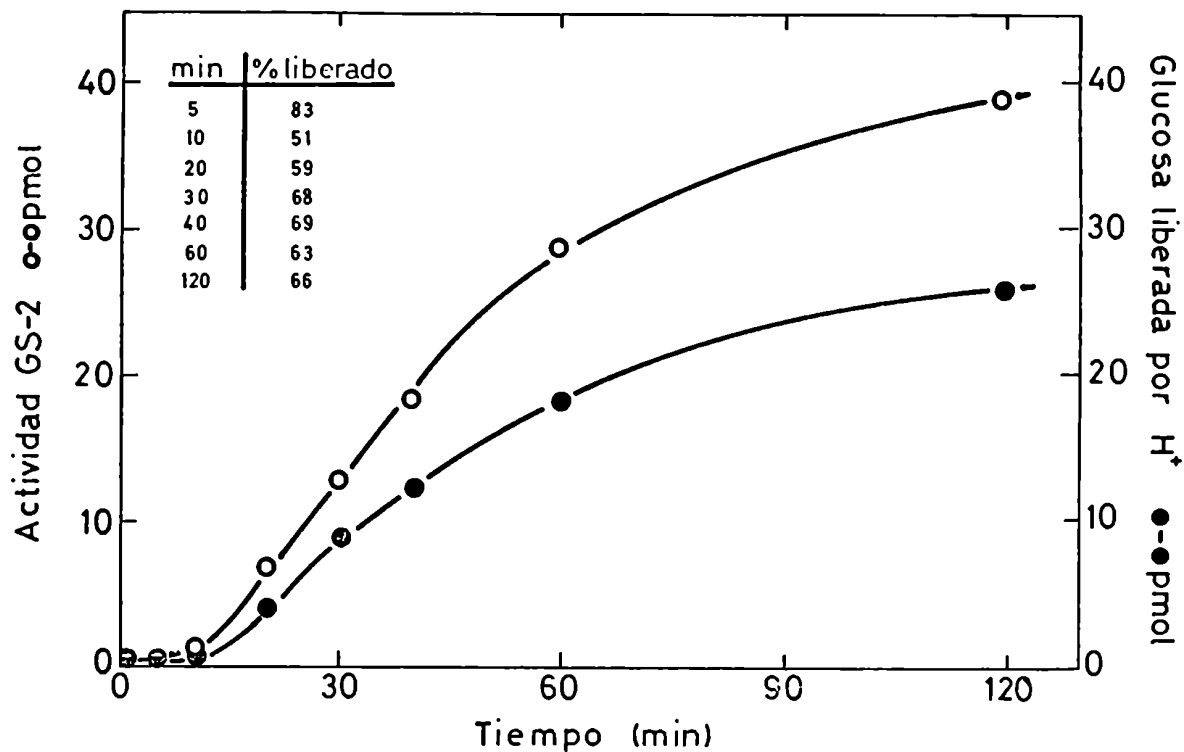


Fig. 38: HIDROLISIS ACIDA SUAVE (pH 2,0) DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE GS-2.

Mezclas de reacción de GS-2 (0,5 mg P₁₀₀) se incubaron por duplicado con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μM (430 cpm/pmol) durante los tiempos indicados y se procesaron hasta obtener la fracción TCAp (Sección 2.3.2.). En una de las series se midió la radioactividad (○). Los duplicados se sometieron a hidrólisis con HCl 0,01 N durante 15 min a 100°C y posterior partición con cloroformo/metanol/agua (3:2:1), tal como se indicó en 2.5.1.1., midiéndose la radioactividad liberada a la fase superior (●).

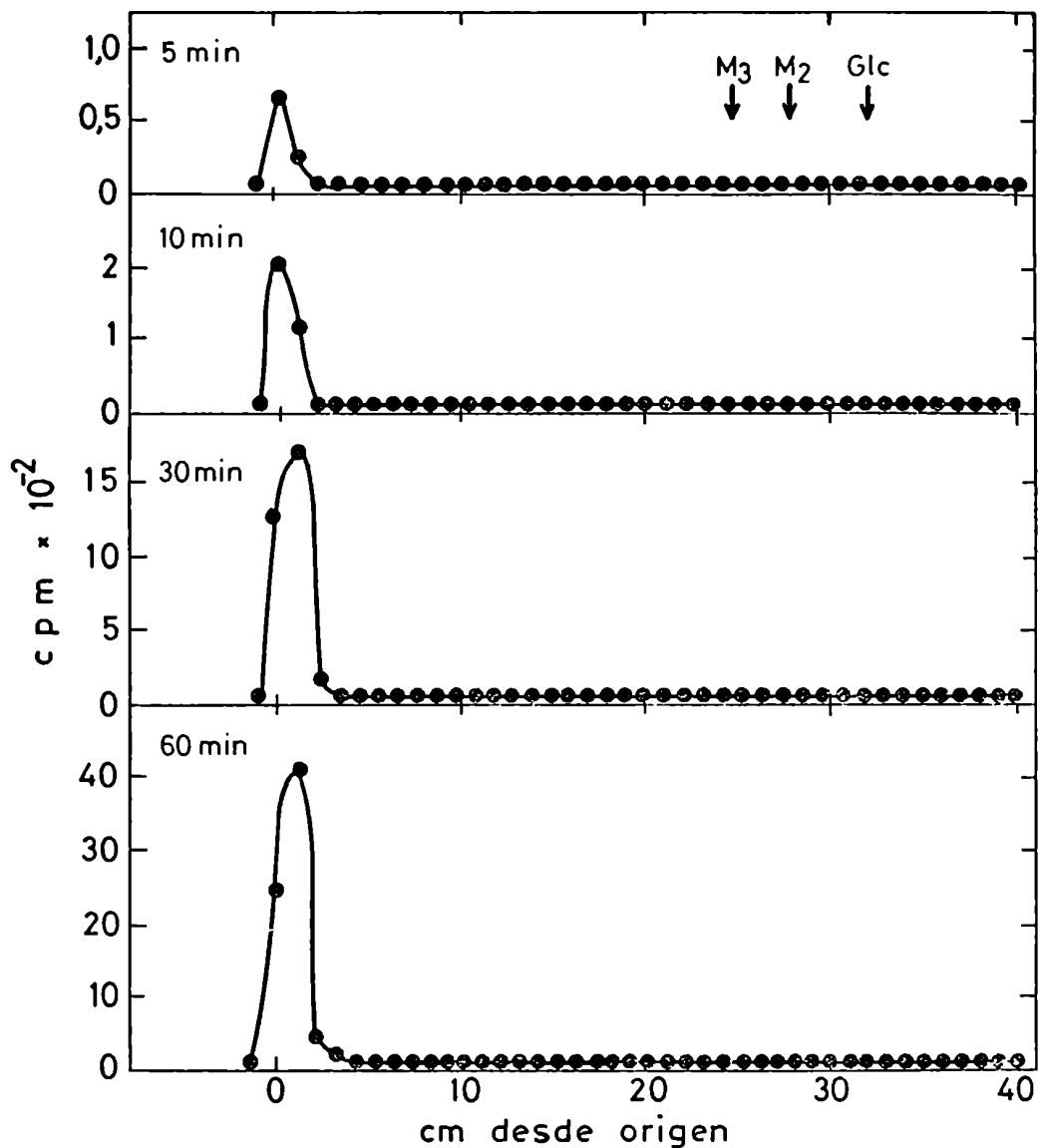


Fig. 39: CROMATOGRAFIA DE LOS PRODUCTOS LIBERADOS POR HIDROLISIS ACIDA SUAVE (pH 2,0).

Los productos liberados a la fase acuosa (Fig. 38) se cromatografiaron en papel con n-butanol/piridina/agua (4:3:4) como se describió en 2.7.1. Glc, glucosa; M₂, maltosa; M₃, maltotriosa.

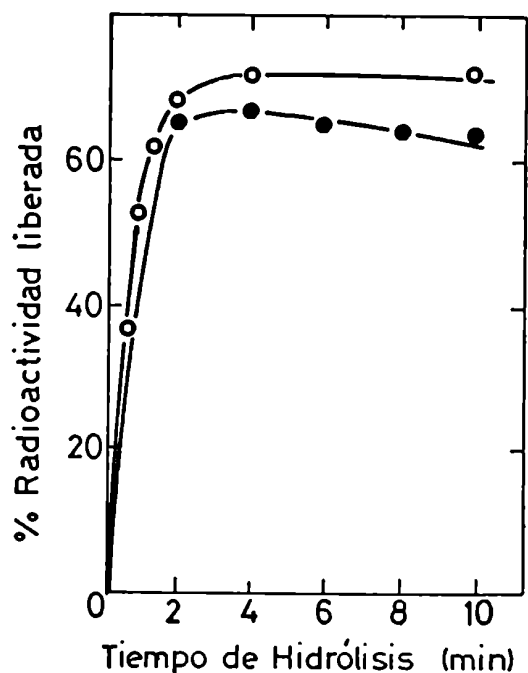


Fig. 40: CINETICA DE LA HIDROLISIS ACIDA SUAVE (pH 2,0).

Dos series de mezclas de reacción de GS-2 (0,5 mg P₁₀₀) se incubaron con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μM (430 cpm/pmol) durante 30 (○) y 60 min (●). Después de obtener las fracciones TCApp, se midió la radioactividad en una muestra de cada serie (control); las restantes se sometieron a hidrólisis con HCl 0,01 N a 100°C durante los tiempos indicados y posterior partición con cloroformo/metanol/agua (3:2:1), tal como se indicó en 2.5.1.1. Se determinó la radioactividad liberada a la fase acuosa de la partición, expresándola como porcentaje de la radiomarca presente en el control.

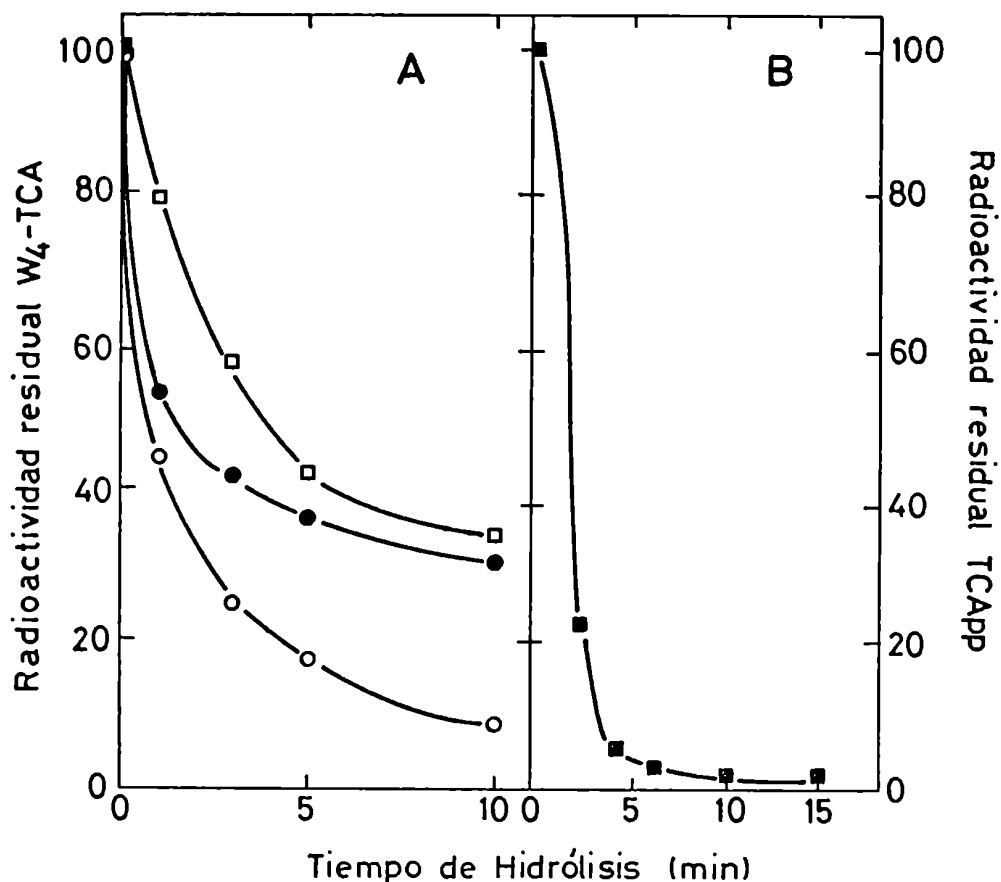


Fig. 41: CINÉTICA DE LA HIDROLISIS SECUENCIAL CON pH 2,0 Y pH 1,0.

A) Mezclas de reacción de GS-2 (0,5 mg P₁₀₀; UDP-(¹⁴C)Glc 4 μM; 60 min a 37°C) se procesaron hasta obtener la fracción W₄-TCA (Sección 2.3.2.), se midió la radioactividad y se las recuperó (Sección 2.4.2.). Se las trató entonces con HCl 0,01 N a 100°C durante los tiempos indicados (●) y se las procesó como en 2.5.1.2. Después de medir la radioactividad, las fracciones W₄-TCA se recuperaron nuevamente y se trataron con HCl 0,1 N a 100°C durante los tiempos indicados (□), procesándose luego como en 2.5.1.2. En (●) y (□) se tomó como 100% la radiomarca original y la resistente a pH 2,0, respectivamente. En (○) se expresó la radioactividad resistente a pH 1,0 tomando como 100% la original.

B) Mezclas de reacción como en A) se procesaron hasta la fracción TCApp. Se midió la radioactividad de una de ellas (100%) y las restantes se trataron con HCl 0,1 N a 100°C durante los tiempos indicados (■), procesándose con TCA 10% como en 2.5.1.1.

$t_{1/2}$ menor de 1 minuto. Un resultado similar se observó al someter las muestras directamente a hidrólisis con HCl 0,1 N (Fig. 41 B).

Finalmente, es importante destacar que después de calentar el compuesto insoluble en TCA adsorbido a papel de filtro (W4-TCA) a 100°C durante 10 min a pH 4,5, sólo reprecipitó 70% de la radioactividad original. Dicho porcentaje se mantuvo después de otro tratamiento similar. Por el contrario, el tratamiento a pH 1 o 2 durante 60 min a 0°C o 37°C, no tuvo ningún efecto.

3.3.2.2. PERMETILACION E HIDROLISIS ACIDA TOTAL

Cuando los productos liberados del compuesto insoluble en TCA por hidrólisis ácida a pH 1 fueron sometidos a permetilación y posterior hidrólisis ácida total, y analizados por cromatografía en capa delgada, se detectó la presencia de 3 compuestos radioactivos (Fig. 42). La especie más abundante cocromatografió con un standard de 2,3,6 trimetil glucosa, mientras que las restantes, cuya intensidad era aproximadamente igual, comigraron con 2,3,4,6 tetrametil glucosa y 2,3 dimetil glucosa, respectivamente. Estos datos indicaron que el compuesto radioactivo analizado era similar al glucógeno, en cuanto tenía uniones glucosídicas α 1,4 (que originaban la especie principal 2,3,6, trimetil glucosa) y ramificaciones en posición α 1,6 (2,3 dimetil glucosa). El compuesto tetrametilado provenía de las glucosas de los extremos no reductores, que tienen ocupada sólo la posición C1.

Es importante destacar que aun exponiendo las placas autorradiográficas durante un tiempo muy prolongado (4 meses), no se detectó la presencia de otros compuestos.

3.3.3. DISCUSION

Los resultados presentados en esta sección permitieron confirmar que durante la reacción GS-2 se sintetizaban, a partir de UDP-Glc, glucanos α 1,4 unidos a proteína.

La sensibilidad del compuesto insoluble en TCA al tratamiento con enzimas de tipo amilolítico (Tabla XVI) demostró que la (^{14}C) glucosa había sido incorporada a un compuesto que tenía, al menos en parte, las propiedades estructurales del glucógeno. Así, poseía uniones glucosídicas α 1,4 y además

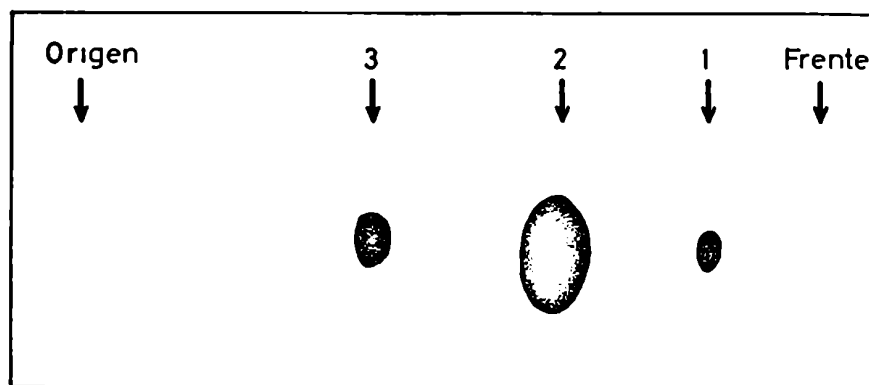


Fig. 42: PERMETILACION E HIDROLISIS ACIDA TOTAL DE LOS COMPUESTOS LIBERADOS POR pH 1,0.

El tratamiento se realizó según se describió en 2.5.2. Los compuestos per-metilados se analizaron por cromatografía en capa delgada con benceno/aceto-na/amoniaco/agua (150:600:4,5:9), como en 2.7.2. Se muestra un esquema del autorradiograma correspondiente a dos semanas de exposición.

1: 2,3,4,6 tetrametil glucosa; 2: 2,3,6 trimetil glucosa; 3: 2,3 dimetil glu-cosa.

estaba ramificado, ya que la incubación con β -amilasa liberaba 50% de la radioactividad, valor que coincide con el correspondiente a la dextrina β -límite del glucógeno nativo (ver Tabla VI).

La presencia de glucosas radioactivas formando parte de uniones glucosídicas α 1,4, y α 1,4 y α 1,6 (puntos de ramificación) fue confirmada mediante la permetilación e hidrólisis total de la fracción TCApp (Fig. 42). La presencia de (^{14}C) glucosa en puntos de ramificación reveló la existencia de enzima ramificante en la preparación enzimática P₁₀₀, y confirmó por otra parte, que la misma puede actuar sobre glucanos α 1,4 unidos a proteína, tal como se postula en el modelo de Krisman (Fig. 24), y como se ha discutido anteriormente en la sección 3.2.8.

La naturaleza ramificada del compuesto insoluble en TCA difiere con lo observado en hígado de rata (161) y E. coli, donde los productos sintetizados eran lineales, ya que por incubación con β -amilasa eran convertidos en 90-99% a maltosa.

Por otra parte, los porcentajes de degradación con α -amilasa y amiloglucosidasa obtenidos en este trabajo de tesis (Tabla XVI), coinciden con los reportados para el glucógeno nativo (Tabla VI), los cuales son menores que los correspondientes a la amilosa (86). Por lo tanto, los mayores valores de hidrólisis con α -amilasa y amiloglucosidasa informados para hígado de rata (161) y E. coli (203), reflejan, nuevamente, la diferencia estructural del compuesto sintetizado en corazón y en los sistemas antes mencionados.

La estructura ramificada de los compuestos sintetizados permitió descartar que la presencia de (^{14}C) glucosa en la fracción insoluble en TCA se debiera a la síntesis de glucanos α 1,4 lineales no unidos a proteína, retrogradables en medio ácido.

Por otra parte, la sensibilidad de la (^{14}C) glucosa presente en la fracción TCApp al tratamiento con proteasa libre de amilasa (Tabla XVI), confirmó que la insolubilidad en ácido de la radiomarca se debía a la síntesis de glucanos α 1,4 unidos a proteína. Al igual que con la degradación amilolítica, los proteoglucanos de corazón se proteolizaron en menor grado (70%) que los correspondientes a hígado de rata (97%; ref. 161). La diferencia podría deberse a la presencia en corazón de glucanos ramificados o de mayor tamaño que los de hígado, causando de algún modo un impedimento estérico para

la acción de la proteasa.

La falta de movilidad electroforética de los productos solubilizados por la proteólisis, sugirió que los péptido-glucanos resultantes eran demasiado grandes como para migrar en una electroforesis en papel. El gran tamaño podría deberse no sólo a la porción glucosídica, sino también al péptido.

En cuanto a la hidrólisis ácida suave, dado que las uniones glucosídicas $\alpha_{1,4}$ y $\alpha_{1,6}$, u otras uniones glicosídicas, no se rompen en las condiciones ensayadas (pH 1 y pH 2; ref. 161), es lógico suponer que la sensibilidad observada refleja la ruptura de las uniones glucosil-aminoácido, o glicosil-aminoácido, si la iniciación de la cadena involucrara a un azúcar distinto de la glucosa.

Es importante notar, en primer término, que 30% de las uniones aminoacil-azúcar del proteoglucano son extremadamente lábiles, por cuanto se liberan por calentamiento a 100°C durante 10 min a pH 4,5.

Dado que la hidrólisis a pH 2 libera 60-70% de la radioactividad del compuesto TCApp con un $t_{1/2}$ menor de un minuto (Figs. 38, 40 y 41 A), y que la hidrólisis a pH 1 libera 20-30% de la radiomarca remanente, con un $t_{1/2}$ de 2 minutos (Fig. 41 A), si se tiene en cuenta además que un 30% de las uniones se rompen a pH 4,5, se podría concluir que existen tres tipos de uniones diferentes. El hecho de que las uniones sensibles a pH 1 tengan un $t_{1/2}$ mayor que las lábiles a pH 2, favorece la interpretación de que al menos estos dos tipos de enlaces son distintos; dado que no se estudió la cinética de la hidrólisis a pH 4,5, no se pueden sacar conclusiones al respecto.

Por lo tanto, el proteoglucano de corazón tendría al menos dos uniones aminoacil-azúcar diferentes. Las características de labilidad ácida de ambas uniones ($t_{1/2}$ de 1 y 2 minutos, respectivamente) se asemejan a las de un éster fosfato: el $t_{1/2}$ de Glc-1-P a pH 1 es de 1,5 min (214).

El porcentaje de ruptura de las uniones aminoacil-azúcar sensibles a pH 2 se mantuvo más o menos constante, independientemente del tiempo de incubación de la muestra tratada (Figs. 38 y 40). Este dato sugiere que, si bien existen al menos 2 sitios de glicosilación diferentes, los mismos son alargados indistintamente.

Por otra parte, la falta de movilidad cromatográfica de los compuestos liberados por pH 2, aun los provenientes de muestras incubadas durante el

período "lag" (Fig. 39), confirmó la presencia de glucanos preformados sobre la proteína aceptora, cuya existencia fue discutida en la sección 3.2.8.

Rybicka demostró, mediante técnicas histocitoquímicas, que en fibras musculares cardíacas de perro existen estructuras celulares que contienen glucógeno y proteína a la vez (215). Estas organelas, denominadas glicosomas, se encuentran libres en el citoplasma, o asociadas a retículo endoplásmico (ER) o filamentos intermedios (IF) (216). Estas partículas podrían implicar uniones covalentes entre polisacárido y proteína, o reflejar la capacidad de adsorción al glucógeno de las enzimas relacionadas con el metabolismo del mismo (glucógeno sintetasa, fosforilasa, enzima ramificante y desramificante, entre otras; refs. 98, 217). El tratamiento del tejido muscular en frío con acetato de uranilo a pH 4,1 o con buffers ácidos produce la destrucción de los glicosomas libres, disociando la proteína del glucógeno (215). Por el contrario, este tratamiento no afecta la estructura de los glicosomas unidos a ER o IF (216). Sin embargo, el tratamiento ácido suave en caliente produce la depolimerización de los filamentos intermedios, lo cual liberaría a los glicosomas unidos, y por consiguiente, los volvería sensibles a la destrucción por ácido (216).

Por lo tanto, la labilidad ácida de los proteoglucanos sintetizados in vitro podría relacionarse con la sensibilidad al ácido de los glicosomas, libres o unidos a ER e IF, existentes in vivo en músculo cardíaco.

La sensibilidad al ácido de las uniones glucano-proteína fue demostrada también para los compuestos insolubles en TCA sintetizados a partir de preparaciones enzimáticas de hígado de rata (161), E. coli (203) y N. crassa (165). En estos casos sólo se estudió la sensibilidad de los compuestos a la hidrólisis a pH 1, encontrándose que el $t_{1/2}$ era de 4 min. Este hecho sugiere que la unión aminoacil-azúcar del proteoglucano de corazón sería diferente de las presentes en los mencionados sistemas.

Por otra parte, la unión covalente del intermediario enzima-dextrano, involucrado en la síntesis de dextranos de bacterias (Fig. 14; ref. 82), también resultó sensible a pH 2.

3.4. PURIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTETASA

El bajo grado de purificación de las preparaciones enzimáticas usadas en los experimentos reseñados en las secciones anteriores, dificultaba la demostración definitiva de la unión glucano-proteína en los productos de la reacción GS-2. Es por ello que se decidió encarar la purificación del sistema.

3.4.1. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

El sedimento entre 25.000 y 150.000 x g de músculo cardíaco de rata, obtenido como se indicó en la sección 2.2.2.1., se sometió a cromatografía de intercambio iónico en columna de DE-52. Como se observa en la Figura 43, la actividad GS-1 eluyó de la columna como un pico ancho entre 0,18 y 0,4 M NaCl, mientras que la actividad GS-2 apareció como un pico más estrecho, a una concentración de aproximadamente 0,22 M NaCl. Se juntaron entonces, por una parte, aquellas fracciones que presentaban tanto la actividad GS-1 como la GS-2 (D1, Fig. 43), y por otra parte, aquellas que tenían sólo la actividad GS-1 (D2, Fig. 43).

Es importante destacar que no se detectó glucógeno retenido en la columna.

3.4.2. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ω -AMINO BUTIL AGAROSA

Las fracciones D1 y D2 se sometieron por separado a cromatografía en columna de ω -aminobutil agarosa. Como se muestra en la Fig. 44 A, la actividad GS-1 presente en D1 (Fig. 43) eluyó nuevamente como un pico ancho, entre 0,1 y 0,3 M NaCl, mientras que la actividad GS-2 se detectó sólo en las fracciones correspondientes a 0,11-0,18 M NaCl. Se juntaron las fracciones que contenían ambas actividades, GS-1 y GS-2 (D1A, Fig. 44 A).

La Figura 44 B muestra el perfil de elución de D2 sometido a cromatografía en ω -aminobutil agarosa. La actividad GS-1 eluyó a una concentración de NaCl de 0,25-0,4 M. No se detectó actividad GS-2 en ninguna fracción de la columna. Las fracciones se juntaron según se indica en la Fig. 44 B (D2A).

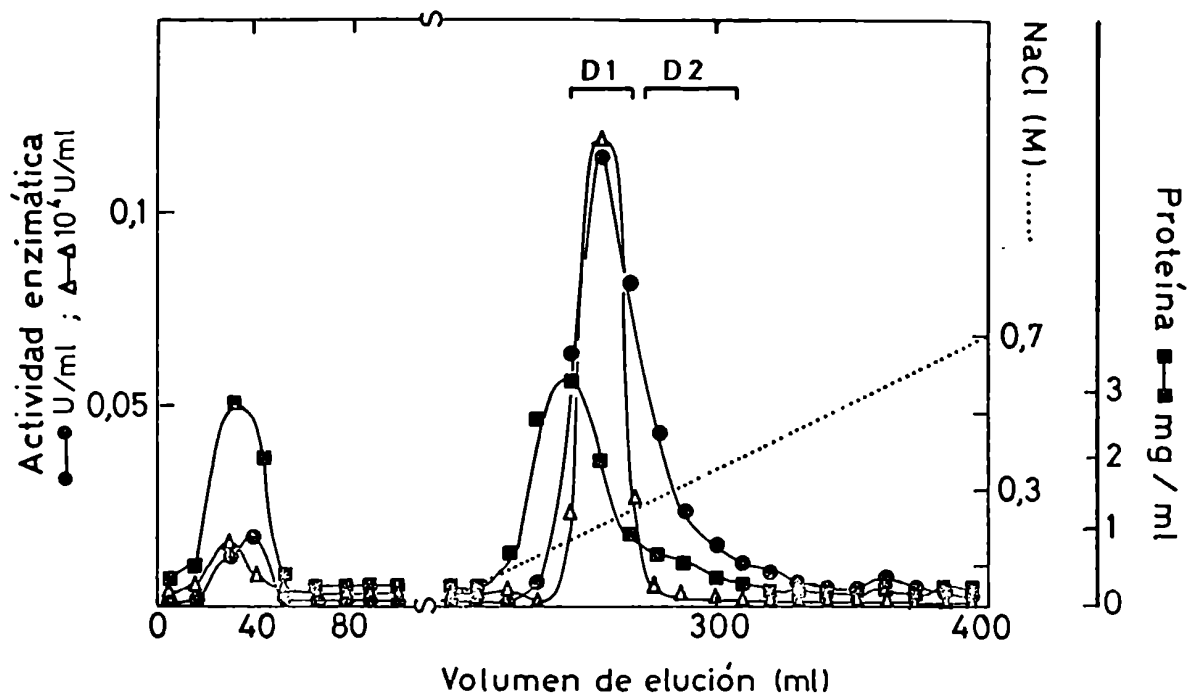


Fig. 43: CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA.

El material del paso 2 (Tabla XVII) se sembró en una columna de DE-52 (2,2 x 10,5 cm), equilibrada con buffer C (Sección 2.2.2.1.). La elución se hizo con un gradiente de 0-0,7 M NaCl en buffer C (200 ml). Se recogieron fracciones de 4 ml a 0,7 ml/min. Se determinó actividad de GS-1 (●), GS-2 (Δ) y proteínas (■). Las fracciones se juntaron como se indica (D1 y D2) y se dializaron contra buffer C.

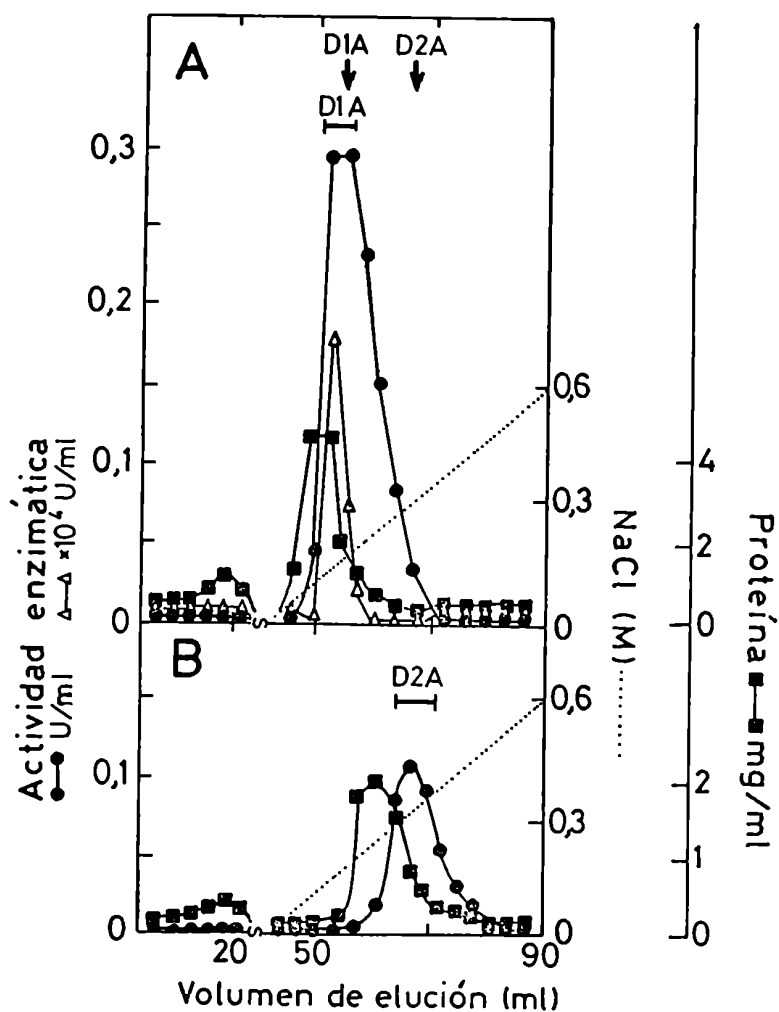


Fig. 44: CROMATOGRAFIA EN ω -AMINOBUTIL AGAROSA.

A) La fracción D1 (Fig. 43) se sembró en una columna de ω -aminobutil agarosa (0,9 x 13 cm), equilibrada con buffer C (Sección 2.2.2.1.). La elución se hizo con 50 ml de un gradiente lineal 0-0,6 M NaCl en buffer C. Se recogieron fracciones de 1 ml a 10 ml/h. Se determinó actividad GS-1 (\bullet), GS-2 (Δ) y proteínas. Las fracciones se juntaron según se indica (D1A).

B) La cromatografía de la fracción D2 (Fig. 43) se hizo como en A. Las fracciones se juntaron como se indica (D2A).

La Tabla XVII esquematiza la purificación de las actividades GS-1 y GS-2. La actividad en presencia de "primer" se purificó 65 y 90 veces (respecto del sobrenadante de 25.000 x g) en las fracciones D1A y D2A, respectivamente, con un rendimiento muy alto. Por otra parte, la actividad en ausencia de "primer" fue purificada 20 veces (fracción D1A), con un rendimiento de 26%.

3.4.3. DISCUSION

Los resultados presentados en esta sección sugirieron que el extracto de corazón de rata sometido a purificación, contenía al menos dos especies diferentes de glucógeno sintetasa (actividad GS-1). Así, mientras que la enzima presente en D1 (Fig. 43) era capaz de glucosilar tanto al glucógeno exógeno como a un aceptor endógeno, la sintetasa de la fracción D2 (Fig. 43) sólo tenía actividad dependiente de "primer" exógeno.

Como se ha discutido en las secciones 3.2.8. y 3.3.3., la actividad GS-2 detectada en la fracción enzimática P₁₀₀ se debía al alargamiento de glucanos α 1,4 unidos a proteína, preexistentes en la preparación, mediado por la glucógeno sintetasa. A modo de confirmación, como se verá en la sección 3.6.2., las actividades GS-1 y GS-2 están catalizadas por una misma proteína de la fracción D1A (Figs. 47 y 48). Dado que la actividad GS-2 depende de la presencia conjunta de la glucógeno sintetasa y del aceptor proteico, la detección de la misma en la fracción D1 podía deberse, simplemente, a que el aceptor cocromatografiaba con la enzima en esas fracciones, sin por ello implicar que D1 y D2 fueran sintetasas distintas. Sin embargo, el hecho de que D1 y D2 hayan eluido en posiciones diferentes en una cromatografía en ω -aminobutil agarosa (Fig. 44), indicó claramente que ambas fracciones tenían alguna diferencia. La misma podría deberse a la presencia de proteoglucanos fuertemente asociados a la especie D1. Este hecho explicaría no sólo la detección de actividad GS-2 en D1, sino también el diferente comportamiento cromatográfico de D1A y D2A.

Las diferencias observadas en el rendimiento y purificación de las actividades GS-1 y GS-2 (Tabla XVII) no contradicen el hecho de que ambas reacciones estén catalizadas por la misma enzima. Estos resultados reflejan, probablemente, una mayor pérdida del aceptor proteico requerido en el ensayo

Tabla XVII: PURIFICACION DE LA GLUCOGENO SINTETASA.

ETAPA	VOLUMEN (ml)	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD GS-1				ACTIVIDAD GS-2			
			ACT. TOTAL u ^a	ACT. ESP. u/mg	REND. %	PURIF. veces	ACT. TOTAL u ^b	ACT. ESP. u/mg	REND. %	PURIF. veces
1. Sob. 25000 x 9	156,8	1458	8,7	0,006	100	1	87,5	0,06	100	1
2. Sed. 150000 x 9	51,6	335	9,1	0,027	104	4,5	34,2	0,102	39	1,7
3. DE-52										
Fracción D1	25,3	53	8,5	0,160	98	27	27,1	0,51	31	8,5
Fracción D2	39,7	20	3,6	0,181	41	30	0	0	-	-
4. ω -aminobutil- agarosa										
Fracción D1A	6,4	20	7,8	0,389	90	65	22,8	1,14	26	19
Fracción D2A	8,1	5,7	3,1	0,539	36	90	0	0	-	-

La enzima se purificó como se describió en 2.2.2.1. a partir de 61 g de tejido.

^a μ moles glucosa de UDP-Glc incorporados en glucógeno / min.

^b pmoles glucosa de UDP-Glc incorporados en la fracción TCApp / min.

GS-2, que de la enzima.

En cuanto a la purificación, las actividades específicas de la actividad GS-1 de las fracciones más puras, D1A y D2A, fueron menores que las informadas por otros investigadores para corazón de rata (218) y de buey (128,129). Cohen et al. demostraron que la glucógeno sintetasa de músculo esquelético de conejo era inactiva cuando se la preparaba a partir de extractos carentes de glucógeno, activándose por preincubación con el polisacárido (113). Por lo tanto, las diferencias mencionadas pueden deberse a que, en el presente trabajo de tesis, los extractos enzimáticos carecían de glucógeno (sección 3.1.), mientras que en los casos nombrados anteriormente, la enzima se purificaba asociada a polisacárido, endógeno o exógeno.

Por último, es interesante destacar que la glucógeno sintetasa presente en el sedimento de 150.000 x g se comportó como si fuera soluble al ser cromatografiada en DEAE-celulosa (Fig. 43). Estos resultados sugerían que la enzima y el aceptor proteico no eran proteínas integrales de membrana, sino que estaban asociadas débilmente a ellas, o bien formaban parte de un complejo particulado, del que se separaban como consecuencia del aumento de dilución previo a la corrida cromatográfica.

Ayudando esta hipótesis, se vio que, cuando se quería recuperar el producto de reacción de GS-2 sintetizado por P₁₀₀, mediante centrifugación de la mezcla de reacción y posterior lavado del sedimento hasta no detectar radioactividad en el sobrenadante de 100.000 x g, sólo se recuperaba 5-10% de la radiomarca medida en la fracción TCApp de un ensayo paralelo. Esto indicaba que el aceptor proteico, que originalmente sedimentaba a 100.000 x g, se solubilizaba al diluir la mezcla durante los lavados, sugiriendo entonces, que estaba adsorbido a una partícula o asociado periféricamente a membranas microsomaes.

Estas partículas o asociaciones a membranas celulares podrían tener relación con los glicosomas (215,216), cuya existencia "in vivo" en corazón de perro fue discutida en la sección 3.3.3.

3.5. PROPIEDADES DE LA ACTIVIDAD GS-2 EN LA GLUCOGENO SINTETASA PURIFICADA (FRACCION D1A)

En resguardo de la brevedad, en las secciones siguientes sólo se mostrarán aquellos datos que difieran con lo observado para las preparaciones enzimáticas microsomales, o bien que no hayan sido estudiados en las mismas. En este sentido, las curvas de temperatura y pH, la especificidad del nucleótido-azúcar, y el efecto de DTT, EDTA, Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y nucleótidos de uridina y adenina, para las actividades GS-1 y GS-2 de la fracción purificada D1A (Tabla XVII), fueron similares a lo descrito y discutido en las Figs. 34 y 36, Tablas XII, XIII y XV, y sección 3.2.8., respectivamente.

3.5.1. EFECTO DE Glc-6-P Y OTROS AZUCARES FOSFATO

El agregado de Glc-6-P en los ensayos de la actividad GS-2 catalizados por la fracción enzimática D1A, produjo un aumento en la incorporación de (^{14}C)glucosa a partir de UDP-Glc a la fracción TCApp (Tabla XVIII). En cuanto a la enzima D2A, que no tenía actividad GS-2 basal (Tabla XVII), la presencia del azúcar fosfato permitió detectar dicha actividad (Tabla XVIII).

Por otra parte, tal como ocurría con las preparaciones enzimáticas microsomales (P_{100} ; Tabla XI, sección 3.2.6.), el agregado de altas concentraciones de glucógeno durante el ensayo GS-2 catalizado por D1A o D2A, produjo un aumento de la incorporación total, y paralelamente, una inversión en la distribución entre las fracciones TCApp y TCAsol-EtOHpp (Tabla XVIII). En presencia de Glc-6-P, la transferencia al glucógeno agregado (fracción TCAsol-EtOHpp) aumentó aproximadamente al doble (Tabla XVIII).

La Figura 45 muestra las curvas de incorporación de glucosa a la fracción TCApp, para el caso de D1A. Independientemente de la presencia de Glc-6-P, se observaron dos pendientes distintas: una, correspondiente al período inicial, durante el cual la incorporación era baja, y otra, posterior, en la que la velocidad aumentaba pronunciadamente. En presencia de Glc-6-P, el cambio de velocidad ocurrió a tiempos más cortos.

Por el contrario, en el caso de D2A (datos no mostrados), mientras que en ausencia de Glc-6-P no se detectó actividad GS-2 (aun incubando las

Tabla XVIII: EFECTO DE Glc-6-P SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2.

MEZCLA DE REACCION	¹⁴ C)GLUCOSA (pmol/mg prot) INCORPORADA			
	D1A		D2A	
	TCApp	TCA _{sol} -EtOHpp	TCApp	TCA _{sol} -EtOHpp
Completa	11	0	0	0
+ Glc-6-P 9 mM	630	23	283	20
+ Glucógeno 1%	36	4490	61	10776
+ Glc-6-P 9 mM + Glucógeno 1%	40	7577	64	22731

Las condiciones fueron las descriptas en 2.3.2. para el ensayo GS-2. Glc-6-P y glucógeno se agregaron según se indica. La incubación se realizó durante 30 min con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μM (700 cpm/pmol). Las fracciones enzimáticas D1A y D2A corresponden a la Tabla XVII y Fig. 44.

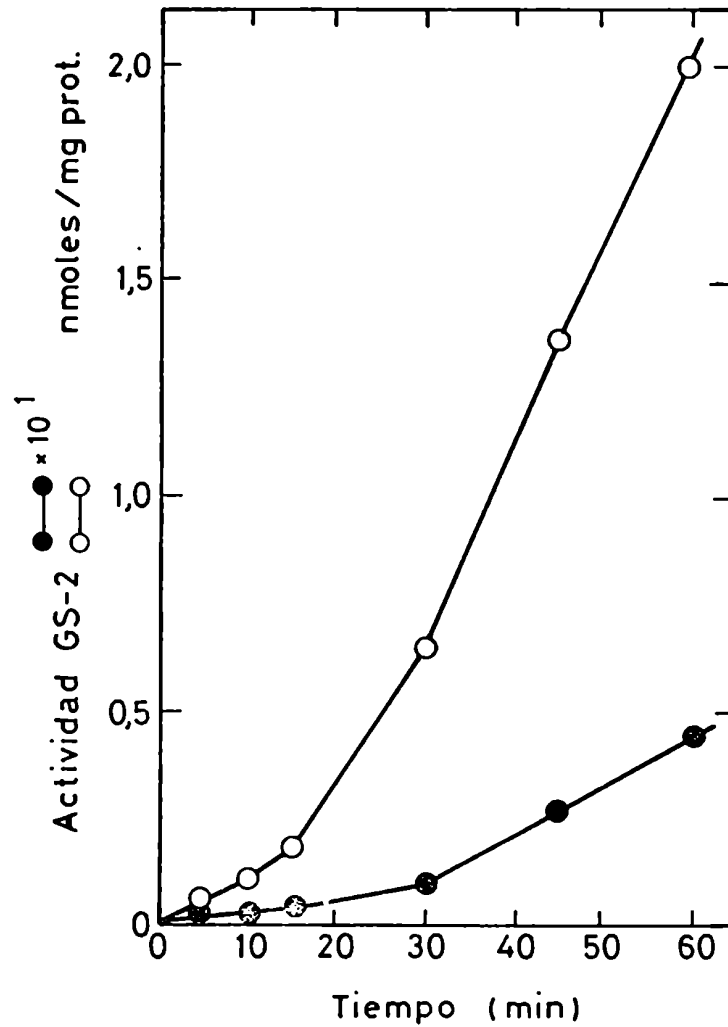


Fig. 45: CURVA DE TIEMPO DE LA ACTIVIDAD GS-2 PRESENTE EN DIA.
 Mezclas de reacción de GS-2 (Sección 2.3.2.) se incubaron durante los tiempos indicados en ausencia (●) o presencia (○) de Glc-6-P 9 mM.

mezclas durante 2 horas), en presencia de azúcar fosfato la cinética fue similar a la observada con D1A (Fig. 45).

Por su parte, la actividad en presencia de glucógeno mostró su máxima velocidad desde el comienzo de la reacción, tanto para D1A (Fig. 4) como para D2A (datos no mostrados).

Todos los datos que se muestran a continuación corresponden a ensayos realizados con la fracción D1A, la cual presentaba la mayor incorporación de glucosa al compuesto insoluble en TCA.

El agregado de (^{14}C) Glc-6-P de distintas actividades específicas, en presencia o ausencia de UDP-Glc no radioactivo, permitió descartar que el azúcar fosfato actuara como dador de restos glucosilo, ya que en ninguna de las condiciones ensayadas se detectó incorporación de radiomarca a las fracciones TCA_{app} o TCA_{sol}-EtOH_{pp}.

En cuanto a la especificidad de la activación, el efecto estimulatorio se observó también con ribosa 5-fosfato, trehalosa 6-fosfato, manosa 6-fosfato, fructosa 1-fosfato, fructosa 1,6 difosfato, glucosa 1,6 difosfato, y ribulosa 5-fosfato, en orden decreciente de activación (Tabla XIX). Es importante destacar que estos compuestos estimularon de forma similar la actividad GS-1 (datos no mostrados).

Por su parte, glucosa 1-fosfato no fue efectivo como activador de GS-2 (Tabla XIX). Más aún, cuando se agregó (^{14}C) Glc-1-P, en presencia o ausencia de UDP-Glc no radioactivo y/o glucógeno, no se detectó incorporación de glucosa a ninguna fracción, indicando, por lo tanto, que D1A no tenía actividad de glucógeno fosforilasa.

3.5.2. EFECTO DE MALTOSACARIDOS Y BAJAS CONCENTRACIONES DE GLUCOGENO

Cuando se estudió el ensayo GS-2 en presencia de bajas concentraciones de glucógeno libre de proteínas (Tabla XX), se vio que el agregado de hasta 0,05 mg/ml de polisacárido (concentración detectada por el método usado, ref. 88) no estimulaba la incorporación de glucosa a la fracción TCA_{app}. Por el contrario, el glucógeno libre de proteínas sólo activó la transferencia de glucosa a la fracción TCA_{sol}-EtOH_{pp}. Es interesante notar que cuando el glucógeno se agregó en alta concentración (10 mg/ml), se observó un pequeño efecto activador sobre la incorporación a la fracción TCA_{app} (Tablas XVIII y

Tabla XIX: EFECTO DE AZUCARES FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2.

AGREGADO	¹⁴ C)GLUCOSA (pmol/mg prot) INCORPORADA EN	
	TCApp	TCAso1-EtOHpp
Ninguno	9	0
Glucosa-6-P	364	35
Ribosa-5-P	127	13
Trehalosa-6-P	75	10
Manosa-6-P	60	0
Fructosa-1-P	32	10
Fructosa-1,6-diP	21	0
Glucosa-1,6-diP	16	0
Ribulosa-5-P	16	0
Glucosa-1-P	9	0
Pi	9	0

Las condiciones fueron las descritas en 2.3.2. para el ensayo GS-2, Con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M (700 cpm/pmol) y los agregados que se indican en concentración 9 mM. La enzima usada fue D1A (Tabla XVII); el tiempo de incubación fue de 30 min.

Tabla XX: EFECTO DE MALTOSACARIDOS Y BAJAS CONCENTRACIONES DE GLUCOGENO SOBRE LA ACTIVIDAD GS-2.

AGREGADO	¹⁴ C)GLUCOSA (pmol/mg prot) INCORPORADA			
	- Glc-6-P		+ Glc-6-P 9 mM	
	TCApp	TCA sol-EtOHpp	TCApp	TCA sol-EtOHpp
Ninguno	9	0	364	35
Glucógeno (mg/ml)				
0,001	8	0	366	123
0,005	9	0	391	620
0,01	9	1	335	1325
0,05	9	56	284	3255
10	30	4123	33	7172
Glucosa	7	0	351	34
Maltosa	9	0	293	39
Maltotriosa	10	0	340	41
Maltotetraosa	11	0	352	30
Maltosa a maltoundecaosa	7	0	238	154

Las condiciones fueron las mismas que en la Tabla XIX. Glucógeno y Glc-6-P se agregaron según se indica; los restantes compuestos se ensayaron a una concentración de 90 mM.

XX).

Resultados similares se obtuvieron al estudiar el efecto del agregado de glucosa y distintos maltosacáridos. Como se muestra en la Tabla XX, glucosa a maltoundecaosa no sirvieron como "primers" para la transferencia de glucosa a partir de UDP-Glc.

3.5.3. DISCUSION

En la sección 3.4.3. se discutió la posibilidad de que la diferencia entre las fracciones enzimáticas D1A y D2A (Fig. 44) radicara en la presencia de proteoglucano asociado a la glucógeno sintetasa D1A. Sin embargo, dado que en presencia de Glc-6-P la enzima D2A mostró actividad de incorporación a la fracción TCApp (Tabla XVIII), es lógico concluir que D2A también contenía al aceptor proteico requerido por GS-2.

Se podría plantear entonces, que D2A representaba el verdadero sistema de síntesis "de novo" del glucógeno, teniendo, a diferencia de D1A, un aceptor proteico con los sitios de iniciación libres. Esta posibilidad fue descartada ya que, mientras que en ausencia de Glc-6-P no se detectó incorporación a TCApp aun incubando durante 2 horas, en presencia de este compuesto, la transferencia, aunque baja, ocurrió desde el comienzo de la reacción, aumentando la velocidad a los 10-15 min, al igual que en el caso de D1A (Fig. 45).

Por otra parte, el hecho de que la transferencia al compuesto insoluble en TCA se haya detectado por agregado de un clásico activador de la glucógeno sintetasa, como es Glc-6-P, sugirió fuertemente que esta enzima era la involucrada en la reacción catalizada por D2A.

En consecuencia, es probable que la actividad GS-2 en presencia de Glc-6-P se debiera a la acción de la glucógeno sintetasa D2A sobre un aceptor proteico endógeno glucosilado en menor grado que el asociado a la fracción D1A. Sin embargo, dado que D2A no se siguió estudiando, no se puede descartar definitivamente que esta fracción tuviera, además de la glucógeno sintetasa, una actividad de glucosil transferasa iniciadora y/o alargadora inicial de los glucanos unidos a proteína, y que esta/s actividad/es fuera/n dependiente/s de Glc-6-P.

El hecho de que dos especies distintas de glucógeno sintetasa par-

cialmente purificadas se mantuvieran asociadas al aceptor requerido para la actividad GS-2, sugirió que la propia enzima podría actuar como aceptor de la glucosilación. Esta hipótesis será discutida más adelante, en la sección 3.6.4.

Respecto a la activación por azúcares fosfato (Tabla XIX), el comportamiento paralelo de las actividades GS-1 y GS-2 corroboró que ambas reacciones estaban catalizadas por la glucógeno sintetasa. Por otra parte, estos resultados coinciden con los reportados por Rosell-Pérez y Larner al estudiar la especificidad y requerimientos estructurales de los activadores de la glucógeno sintetasa de músculo de perro (219). La activación observada con fructosa 1-fosfato (Tabla XIX), que carece de las características determinadas en el mencionado trabajo (oxhidrilo en C2, fosfato en C6 y anillo piranósico), probablemente se debiera a la contaminación con Glc-6-P.

Como se ha discutido anteriormente, el criterio de insolubilidad en TCA (Fig. 45, Tabla XVIII) o de sensibilidad a proteólisis (ver sección 3.3.1.) del producto de reacción de GS-2, no eran suficientes para concluir que dicho producto era un glucano α 1,4 unido covalentemente a proteína. Alternativamente, se podría plantear que, aunque D1A no tenía glucógeno, podría haber cantidades muy pequeñas de glucanos α 1,4, los cuales, en ausencia de enzima ramificante, eran alargados por la glucógeno sintetasa, formando largos glucanos lineales. Los glucanos del tipo de la amilosa se insolubilizan en medio ácido aun sin estar unidos a proteína. Sin embargo, los datos presentados en la Tabla XX indicaron que la glucógeno sintetasa presente en la fracción D1A no era capaz de sintetizar glucanos insolubles en TCA a partir de "primers" exógenos no unidos a proteína (maltosacáridos o glucógeno). Por lo tanto, se descartó la posibilidad de que la actividad GS-2 se debiera a la retrogradación de glucanos α 1,4 lineales sintetizados sobre aceptores endógenos libres de proteína.

3.6. DETECCIÓN DE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2 PRESENTES EN LA GLUCOGENO SINTETASA PURIFICADA, DESPUES DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS

3.6.1. DESARROLLO DEL METODO

Se puso a punto un método simple y sensible de determinación de la actividad de glucógeno sintetasa en geles nativos de poliacrilamida. Las condiciones de incubación y posterior detección de la actividad han sido detalladas en la sección 2.8.2.1.1. de Materiales y Métodos.

En forma breve, el método consiste en incubar los geles, después de la corrida electroforética en condiciones nativas, con UDP-Glc y glucógeno, en presencia o ausencia de Glc-6-P. Dado que el producto de la reacción permanece unido a la enzima que está fijada en la matriz del gel, es posible ubicar la posición de la banda enzimática mediante la detección de los glucanos sintetizados. Para ello, después de la reacción, los geles se tiñen con una solución de I₂-KI o se autorradiografían, según se hayan incubado con UDP-Glc frío o radioactivo, respectivamente. La aparición de color marrón por tinción con iodo indica la formación de un glucano ramificado del tipo del glucógeno, mientras que bandas púrpuras o azules revelan la presencia de glucanos ramificados del tipo de la amilopectina, o lineales como la amilosa, respectivamente.

Las consideraciones específicas respecto al análisis de la fracción D1A mediante este método se discutirán en las secciones 3.6.2. y 3.6.3.

Cuando se tiñen con I₂-KI geles no incubados o bien incubados sin UDP-Glc, no se detectan bandas reactivas. Por lo tanto, la aparición de bandas coloreadas no es el simple resultado de la unión a la enzima de "primer" endógeno o exógeno, sino que requiere que haya actividad enzimática.

Como se muestra en la Fig. 46 (carril 1), ya a las 10 horas de incubación se puede detectar actividad enzimática; tiempos de reacción mayores (Fig. 46, geles 2 y 3) dan como resultado, no sólo un aumento de intensidad en la banda, sino también un cambio de color del marrón al azul (gel 3). Esto indica que los glucanos sintetizados son más largos y lineales, como sería de esperar para el producto formado por la glucógeno sintetasa a partir de un "primer" ramificado, durante una incubación larga en ausencia de enzima ramificante. Estos datos demuestran que el método detecta la variación estructural en cuanto al grado de ramificación del polisacárido formado, y por otro lado, que la enzima no se inactiva durante la incubación.

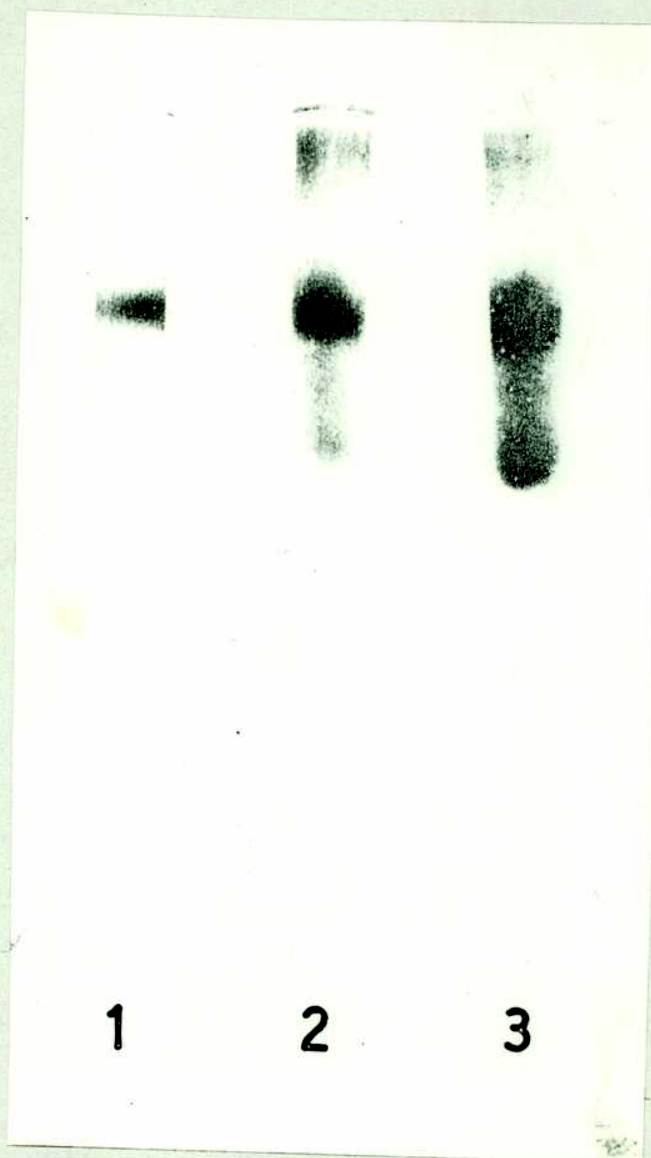


Fig. 46: DETECCIÓN DE LA GLUCOGENO SINTETASA EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN FUNCION DEL TIEMPO.

La electroforesis y la detección enzimática se llevaron a cabo como se describe en 2.8.2.1.1. Los geles se incubaron con glucógeno, UDP-Glc y Glc-6-P durante 10 (gel 1), 24 (gel 2) ó 72 hs (gel 3). Las bandas de actividad se detectaron con I₂-KI. El color observado fue marrón (geles 1 y 2) o azul (gel 3).

Resultados similares se obtienen cuando los geles se mantienen hasta 4 días a 0-4°C antes de ser incubados. En consecuencia, la enzima también permanece activa durante varios días en frío cuando está incluida en la matriz del gel.

Por otra parte, los productos de reacción permanecen firmemente asociados a la enzima, ya que aún después de muchos meses en solución de destañido, las bandas recuperan su intensidad original al ser teñidas nuevamente con el reactivo I₂-KI.

Las bandas coloreadas desaparecen por incubación con α -amilasa, confirmando que los productos detectados contienen uniones glucosídicas α 1,4.

En cuanto a la sensibilidad del método, la misma se constató comparando la variación de la intensidad de las bandas por el agregado de Glc-6-P durante la incubación. Como se observa en la Fig. 47 (geles 3 y 4), después de incubar con Glc-6-P, las bandas se colorearon más intensamente con I₂-KI. Aun cuando no se hizo una determinación espectrofotométrica de las bandas, estos resultados se correlacionaron con la detección de la actividad GS-1 en solución (4,5 y 10,3 μ mol/mg prot. h, en ausencia o presencia de Glc-6-P, respectivamente).

Por otra parte, en el caso de la enzima usada, dos de las bandas de actividad que eran claramente detectadas por coloración con iodo, apenas se visualizaban por tinción con el reactivo de Coomassie (flechas en Fig. 47, gel 5). Estos datos indican que el método usado es muy sensible, detectándose, en este caso particular, 0,0075 unidades de glucógeno sintetasa (Fig. 47, gel 3).

La concentración de UDP-Glc o glucógeno en las mezclas de incubación puede reducirse a 1 mM o 0,1%, respectivamente, requiriéndose entonces mayores tiempos de reacción. Sin embargo, la reutilización de las mezclas de incubación, sin pérdida de sensibilidad, permite el uso de concentraciones mayores (UDP-Glc 10 mM y glucógeno 1%), que reducen sustancialmente el tiempo de los ensayos, sin afectar la economía de los mismos.

Por último, el método puede utilizar también UDP-(¹⁴C)Glc. Las mismas bandas de actividad se detectan por incubación de los geles con nucleótido-azúcar frío (Fig. 48, carril 2) o radioactivo (carril 4).

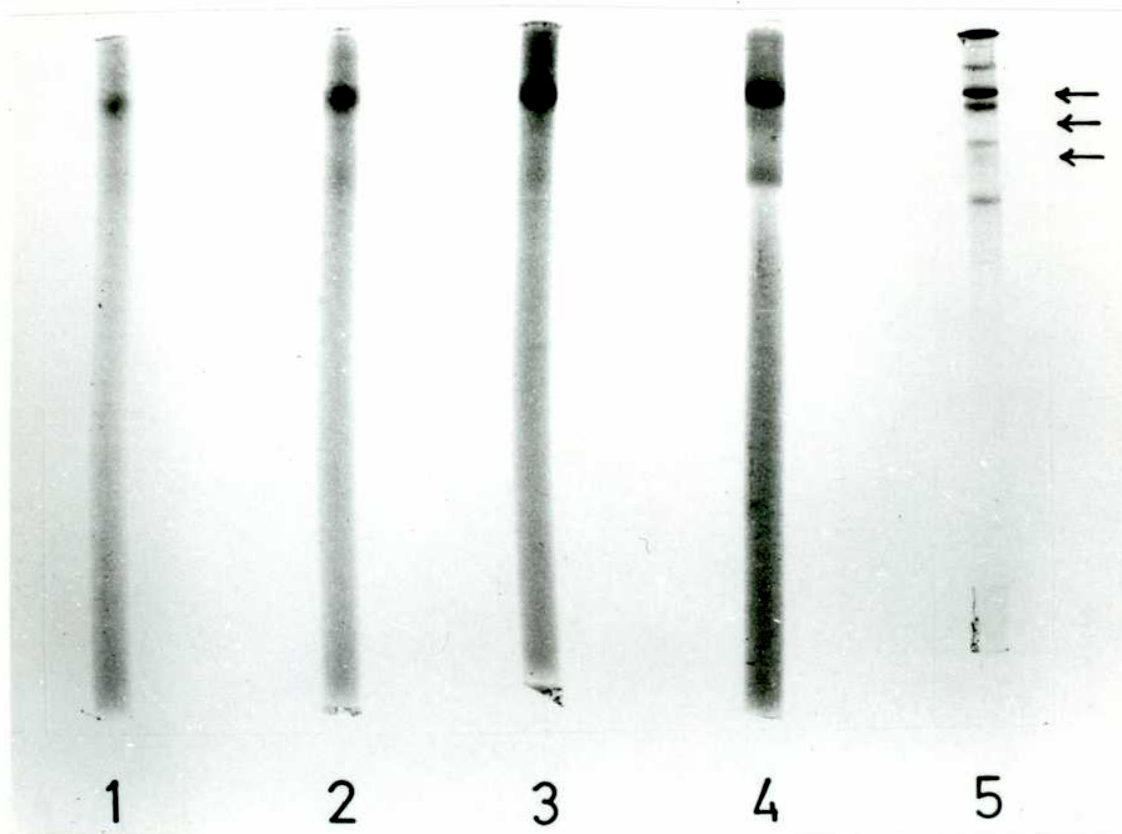


Fig. 47: DETECCIÓN DE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2 EN GELES DE POLIACRILAMIDA. La fracción DIA (80 μ g proteína) se sembró en geles nativos de 6% de acrilamida y se sometió a electroforesis como se describió en 2.8.2.1. Posteriormente, los geles se tiñeron para detectar proteínas (gel 5) o se incubaron a temperatura ambiente con UDP-Glc 10 mM en ausencia (geles 1 y 2) o presencia (geles 3 y 4) de glucógeno 10 mg/ml. En los geles 2 y 4 se agregó Glc-6-P 9 mM. El tiempo de incubación fue de 24 h para los geles 1 y 2, y 12 h para los geles 3 y 4. La actividad se detectó por tinción con I₂-KI.

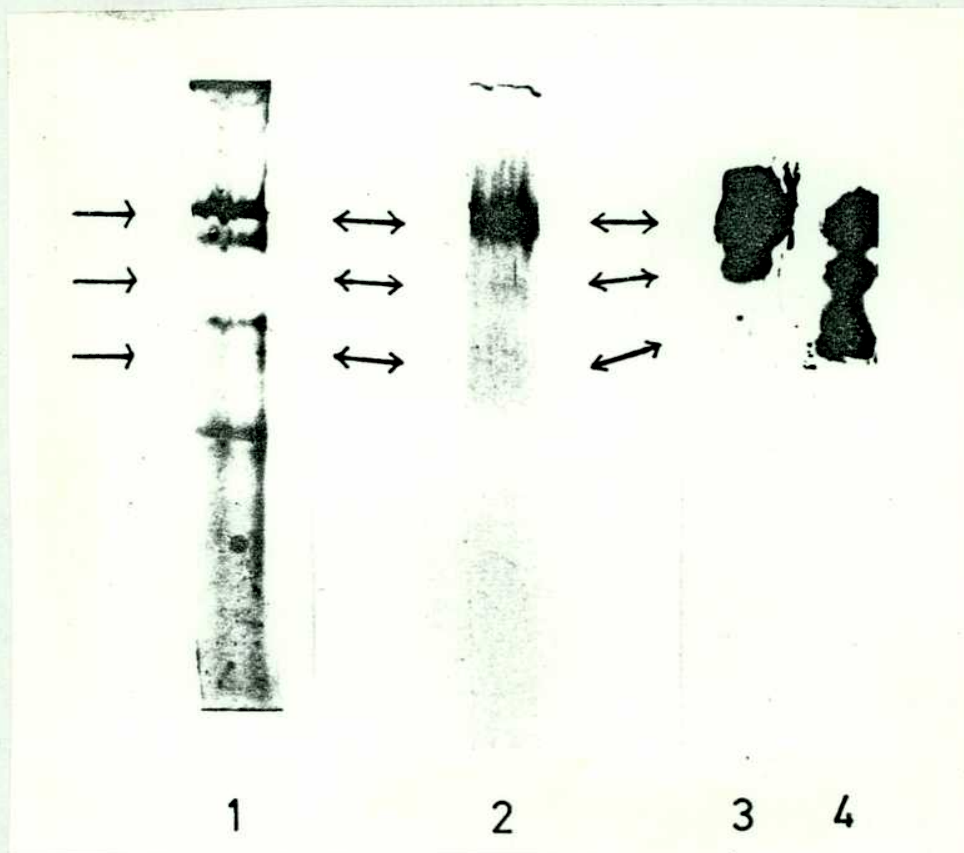


Fig. 48: SINTESIS DE (¹⁴C)GLUCANOS α 1,4 EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La fracción DIA se sometió a electroforesis en un gel nativo plano de 6% de acrilamida como se describió en 2.8.2.1. Posteriormente, se cortaron tiras del gel y se tiñeron para detectar proteínas (1) o se incubaron con UDP-(¹⁴C)Glc 7 μ M (700 cpm/pmol), en ausencia (3) o presencia (4) de glucógeno 10 mg/ml. En (2) se incubó como en (4) con UDP-Glc 10 mM, y se tiñó con I₂-KI.

3.6.2. DETECCION DE LAS ACTIVIDADES GS-1 Y GS-2

Cuando la fracción enzimática D1A fue analizada según el método recién descrito, se observó que, aun en ausencia de glucógeno (Fig. 47, geles 1 y 2), había síntesis de glucanos α 1,4 que se teñían con el reactivo de I₂-KI. Más aún, las bandas de actividad aparecieron en la misma posición que las detectadas en presencia de "primer" (Fig. 47, geles 3 y 4).

Las bandas activas fueron tres en todos los casos (flechas en Fig. 47, gel 5): todas ellas se detectaron en ausencia de Glc-6-P (Fig. 47, geles 1 y 3), y la apreciación visual de la intensidad de las bandas indicó que se comportaban en forma diferente frente al agregado del activador. Así, mientras que la banda de menor movilidad electroforética parecía responder poco a la presencia de Glc-6-P, las restantes mostraron una mayor sensibilidad (Fig. 47, comparar geles 1 y 2, y 3 y 4).

Resultados similares se obtuvieron usando UDP-(¹⁴C) Glc durante la incubación. Como se observa en la Fig. 48, en presencia de glucógeno (carril 4) se detectaron tres bandas radioactivas que coincidían con las coloreadas por el reactivo de yodo (carril 2). En ausencia de polisacárido, se visualizaron las mismas bandas radiomarcadas (carril 3), aunque comparativamente la especie más móvil era mucho menos activa en ausencia de glucógeno que las restantes (Fig. 48, comparar carriles 3 y 4).

El agregado de Pi (20 mM) durante la incubación no alteró el esquema mostrado en la Fig. 47. Por otra parte, no se detectaron bandas de actividad cuando los geles se incubaron con glucógeno, Glc-1-P y 5' AMP, en lugar de glucógeno, UDP-Glc y Glc-6-P. Estos datos confirmaron que D1A no tenía actividad de glucógeno fosforilasa (sección 3.5.1., Tabla XIX).

Es importante destacar que no se detectaron reacciones positivas cuando geles no incubados se tiñeron con los reactivos de ácido periódico/Schiff ó I₂-KI.

3.6.3.DETERMINACION DEL PM DE LA GLUCOGENO SINTETASA

Como hemos visto en la sección anterior, después de someter la fracción D1A a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturantes, se detectaron tres bandas con actividad de glucógeno sintetasa (Figs. 47 y 48). La disponibilidad del método de detección "in situ" permitió determinar el PM de estas formas nativas de la enzima, y establecer, al mismo tiempo, la relación existente entre ellas. Para ello se utilizó el método de determinación de PM de Hedrick y Smith (193), que ha sido descrito en detalle en la sección 2.8.2.1.2. de Materiales y Métodos.

Como se observa en la Fig. 49, las tres bandas de glucógeno sintetasa representaban isómeros de tamaño, ya que las rectas correspondientes a cada una de ellas se intersectan en un punto (ver 2.8.2.1.2.). El PM aparente calculado para cada una de las bandas fue de 270, 350, y 430 kDa (Fig. 49). Considerando que el monómero de glucógeno sintetasa de corazón tiene un PM aparente de alrededor de 90 kDa (128, 129, 220), las especies nativas detectadas serían respectivamente, un trímero, tetrámero y pentámero.

La especie pentamérica parecería ser la más abundante en la fracción D1A (Fig. 47, gel 5) y la más activa en ausencia de glucógeno y/o Glc-6-P; por su parte, el trímero y el tetrámero estarían en una proporción mucho menor, y el trímero sería el menos activo en ausencia de glucógeno (Fig. 48, gel 3).

3.6.4.DISCUSION

En esta sección hemos presentado el desarrollo de un método de medición de actividad de glucógeno sintetasa en geles de poliacrilamida, y su uso para el análisis de las actividades GS-1 y GS-2 presentes en la fracción enzimática D1A.

Los métodos disponibles para la detección de la glucógeno sintetasa en geles de poliacrilamida son limitados, y pueden dividirse en dos tipos: aquellos en los que las proteínas se eluyen del gel para determinar la actividad enzimática, y aquellos que utilizan la detección "in situ" en los geles enteros. En el primer caso (221, 222), la desventaja principal reside en que

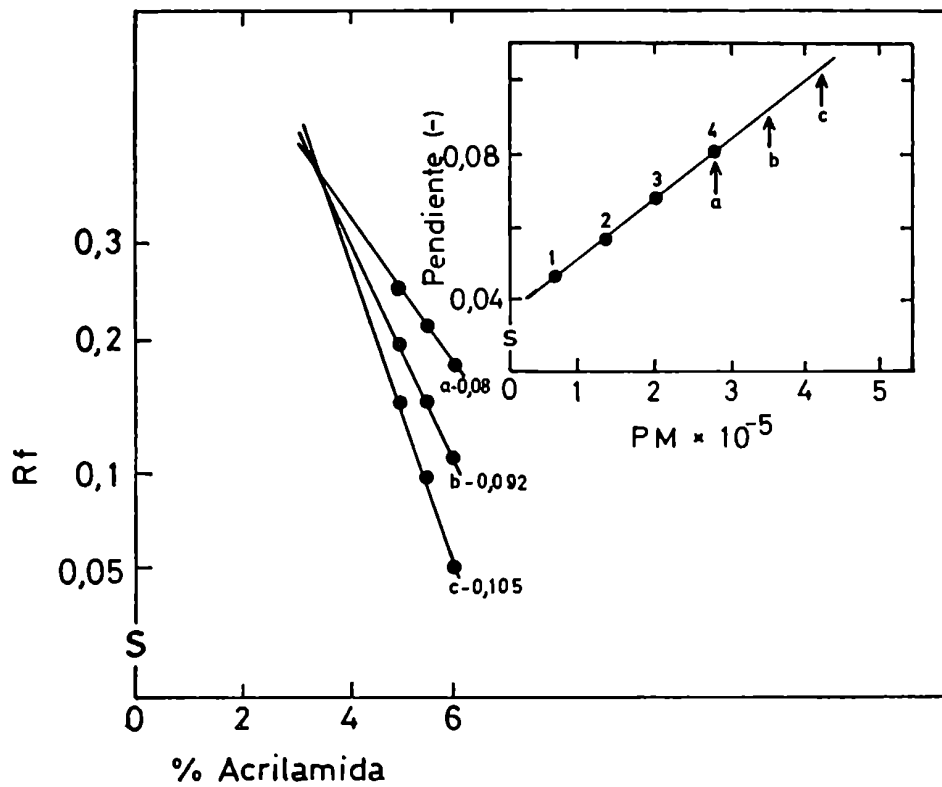


Fig. 49: DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA GLUCOGENO SINTETASA.
Ver texto (Sección 3.6.3.).

la recuperación en la elución dependerá del tamaño de la proteína, y por lo tanto, este tipo de análisis puede falsear los datos, sobre todo con preparaciones no purificadas.

En cuanto a los ensayos que involucran la detección "in situ" en el gel, se han descrito varios, en relación, no sólo con la glucógeno sintetasa, sino con otras α 1,4 glucan sintetetasas, como la almidón sintetasa y la fosforilasa de plantas. Uno de estos métodos utiliza amilosa exógena como "primer" para la reacción (223). Este ensayo es poco práctico debido a la baja solubilidad en agua de la amilosa. Otros métodos usan amilopectina (223, 224), glucógeno (223-225), amilosa (226) o amilodextrina (111) incluidos en la matriz del gel. La presencia de polisacárido en el gel puede retardar la migración electroforética de las proteínas, dando una baja resolución de las bandas, y en consecuencia, siendo de poca utilidad en el análisis de preparaciones no purificadas.

El método detallado en las secciones 2.8.2.1.1. y 3.6.1. presenta la ventaja de combinar la detección "in situ" con el uso de un "primer" exógeno altamente soluble, como el glucógeno. Dado que las mezclas de reacción son congeladas y reutilizadas, es importante usar un "primer" soluble a fin de evitar el calentamiento que destruiría al UDP-Glc.

La reutilización de las mezclas, por otra parte, es ventajosa tanto desde el punto de vista del ahorro de reactivos, como del tiempo de preparación de las soluciones.

La detección "in situ" permite que, una vez que se ha logrado una buena separación de las proteínas, si existe más de una banda con actividad, se pueda compararlas en el mismo ensayo. Además, se puede tener un registro permanente de los experimentos, simplemente mediante la retención de los geles.

Finalmente, la sensibilidad del método puede mejorarse usando UDP-(^{14}C) Glc, lo que permite además transformarlo en un ensayo cuantitativo, mediante la densitometría de los autoradiogramas correspondientes a los geles radioactivos.

En cuanto al análisis específico de D1A mediante este método, la detección de la síntesis de glucanos α 1,4 en ausencia de "primer" después de electroforesis (Figs. 47 y 48) recuerda el hecho de que D2A (Fig. 44) también permanecía asociada al aceptor proteico requerido para la actividad GS-2

(Tabla XVIII). Estos datos sugirieron dos explicaciones alternativas. La primera es que la glucógeno sintetasa y el proteoglucano acceptor permanecieron asociados durante la electroforesis, y previamente, durante el proceso de purificación. Este hecho indicaría una fuerte unión entre ambas proteínas.

La segunda explicación es que la glucógeno sintetasa es capaz de autoglucosilarse, constituyendo su propio acceptor proteico. En este sentido, es interesante destacar que Nimmo et al. (113) reportaron que la glucógeno sintetasa purificada de músculo esquelético de conejo se comportaba como una glicoproteína en cuanto se unía a concanavalina A, se teñía débilmente con el reactivo del ácido periódico/Schiff, y contenía restos glucosilo, detectados por cromatografía gaseosa.

Como se verá en la sección 3.7.2.2., el tamaño de alguno de los productos de reacción de GS-2 es menor que el correspondiente al monómero de la glucógeno sintetasa de corazón (128,129,220). Sin embargo, dado que la enzima es degradada proteolíticamente con mucha facilidad en distintos extractos (119,126,127,220), y que D1A es una fracción parcialmente purificada, la hipótesis de la autoglucosilación de la sintetasa no debe ser descartada en base a la observación mencionada.

En cuanto al peso molecular de la forma nativa de glucógeno sintetasa presente en la fracción D1A (Fig. 49) los resultados indican que existen al menos tres formas activas, que serían isómeros de tamaño, correspondiendo al trímero, tetrámero y pentámero, respectivamente. Es importante aclarar, sin embargo, que los pesos moleculares de las formas aparentemente tetramérica y pentamérica, se calcularon por extrapolación de la curva de calibración en la zona de mayor peso molecular; por lo tanto, es probable que se hayan subestimado los valores reales.

Por otra parte, dado que la relación de actividad en ausencia y presencia de Glc-6-P (% i) es de 80-90% para la especie enzimática no fosforilada (I o GSa), y de 1-20% para las especies fosforiladas en distinto grado (D o GSb) (100,103), al no haber realizado un estudio cuantitativo de las correspondientes actividades específicas, no se pueden sacar conclusiones respecto al tipo de forma enzimática que representa cada isómero. Sin embargo, en el caso de la especie aparentemente pentamérica es muy probable que la misma represente una forma I de glucógeno sintetasa, ya que la apre-

ciación visual del gel sugirió una baja respuesta ante el agregado de Glc-6-P. (Fig. 47).

Takeda et al. (111), siguiendo un enfoque semejante al realizado en este trabajo de tesis, encontraron que en músculo de conejo existían varias formas activas de glucógeno sintetasa. Estas especies nativas también eran isómeros de tamaño: trímero y tetrámero para la forma D, y dímero y tetrámero para la forma I.

Asimismo, los datos reportados en la literatura para el peso molecular de las formas nativas de distintas especies varían desde 140 kDa a 500 kDa, mientras que en todos los casos los respectivos monómeros tienen un peso molecular más uniforme, de 85 kDa a 93 kDa (100,103). Así, la forma D se ha encontrado como trímero en músculo de conejo (111,227) e hígado de rata (100), como tetrámero, en músculo de conejo (111), riñón de cerdo (100), y como dímero y hexámero en hígado de rata (100). Por su parte, la forma I de la enzima se ha encontrado como tetrámero (100,111,113,211), dímero (111,211) y posiblemente también como hexámero (211) y octámero (113). La diferencia en el tamaño de las formas nativas de la enzima parece deberse a que la misma tiende a formar agregados en ciertas condiciones, en particular la forma I en ausencia de glucógeno (227). Aunque las causas no han sido clarificadas, el estado de fosforilación de la enzima parece jugar un papel importante en la formación de los agregados.

3.7. PROPIEDADES DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION GS-2 SINTETIZADOS POR LA GLUCOGENO SINTETASA PURIFICADA

3.7.1. TRATAMIENTOS ENZIMATICOS. AMILOLISIS Y PROTEOLISIS

Cuando el compuesto TCApp, sintetizado en un ensayo GS-2 por D1A, se sometió a degradación con α -amilasa, amiloglucosidasa o proteasa libre de amilasa, en las condiciones descritas en la sección 2.6.1., se produjo la solubilización de la mayor parte de la radioactividad originalmente insoluble en TCA. Los porcentajes de degradación fueron similares a los obtenidos con los productos de reacción de P₁₀₀ (Tabla XVI).

El análisis por cromatografía en papel de los productos liberados por las enzimas amilolíticas mostraron maltosacáridos y glucosa para α -amilasa y amiloglucosidasa, respectivamente (datos no mostrados).

3.7.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

A fin de confirmar de manera inequívoca que la (¹⁴C)glucosa proveniente de UDP-(¹⁴C)Glc se incorporaba, durante el ensayo de GS-2 catalizado por la glucógeno sintetasa purificada, a un compuesto proteico insoluble en TCA, los productos de dicha reacción se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, tanto en condiciones nativas como disociantes.

3.7.2.1. CONDICIONES NATIVAS

Cuando una mezcla de reacción de GS-2, incubada durante 30 min con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M, se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas, se observó la presencia de al menos tres bandas radioactivas móviles (Fig. 50 B, carril 2), que comigraban con proteína (Fig. 50 A). El mismo esquema se obtuvo después de incubar en presencia de Glc-6-P, variando solamente la intensidad de la radiomarca detectada (Fig. 50 B, carril 3).

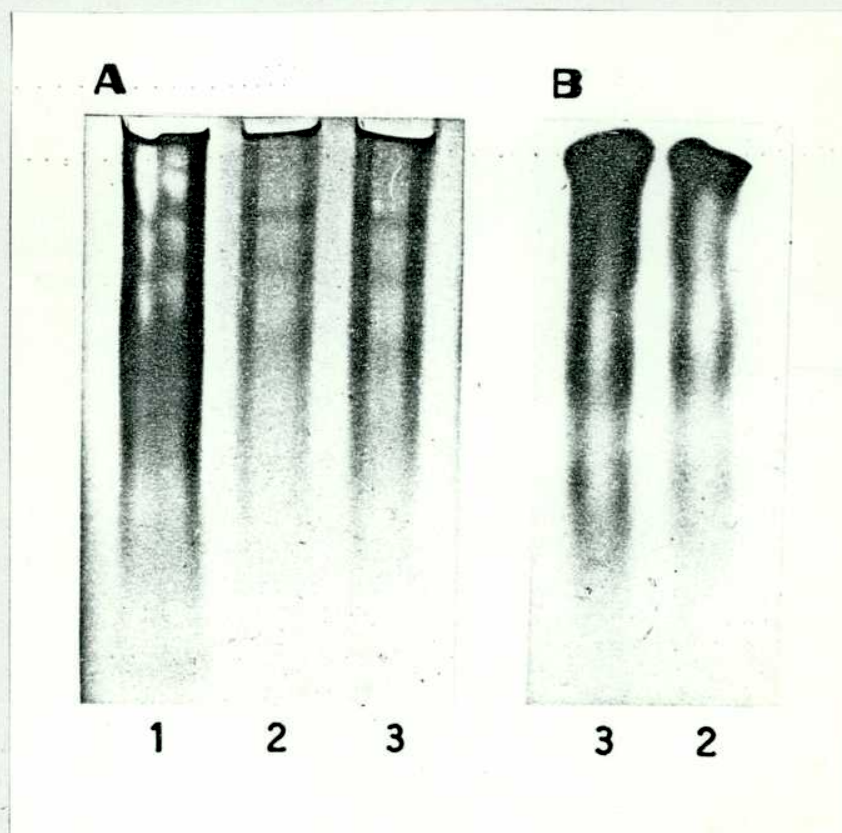


Fig. 50: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN DE GS-2.

Mezclas de reacción de GS-2 (50 μg D1A) se incubaron durante 30 min en ausencia (carril 2) o presencia (carril 3) de Glc-6-P 9 mM. En (1) se sembraron 150 μg de D1A. La electroforesis se llevó a cabo en un gel plano de 5% de acrilamida como se describió en 2.8.2.1. En A se muestra la tinción con azul de Coomassie y en B la correspondiente autorradiografía del gel.

3.7.2.2. CONDICIONES DESNATURALIZANTES

3.7.2.2.1. EXPERIMENTOS DE PULSO. DIGESTION CON α -AMILASA

El análisis electroforético en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, de una mezcla de reacción de GS-2 incubada durante 10 min con UDP-(^{14}C)Glc 4 μM y Glc-6-P 9 mM, mostró cinco bandas radioactivas (Fig. 51 A, carril 4, I a V). Las dos de mayor movilidad electroforética (I y II), que aparecían en la zona de mayor resolución del gel, eran bandas anchas muy difusas. Por el contrario, las bandas que migraron menos (III a V), presentes en una zona de poca discriminación de peso molecular, eran mucho más netas.

Las bandas I y II fueron las que se marcaron más intensamente, y por otra parte, las únicas que se percibieron en ausencia de Glc-6-P (Fig. 51 A, carril 3).

A tiempos de incubación más largos (30 y 60 min) la marcación total fue mayor, pero el esquema fue similar: se detectaron cinco bandas radioactivas (Fig. 51 A, carriles 5 a 8, I' a V'), que migraron un poco menos que las presentes a los 10 min (I a V). Por otra parte, la marcación fue mayor en las bandas de menor movilidad. Resultados semejantes se obtuvieron independientemente de la presencia de Glc-6-P, ya que sólo varió la intensidad de la radiomarca (Fig. 51 A, comparar carriles 5 y 6, y 7 y 8).

En cuanto al esquema de bandas proteicas, no hubo diferencias en ninguno de los casos analizados (Fig. 51 B).

Cuando la mezcla de reacción de GS-2 se precipitó con TCA 10% y se analizaron electroforéticamente las fracciones insoluble y soluble en ácido, se vio que toda la radioactividad se recuperaba en la fracción insoluble en TCA (Fig. 52 B, carril 8). Además, el esquema de proteínas y radioactividad era igual al observado con la mezcla de incubación sin precipitar (Fig. 52 A y B, comparar carriles 4 y 8).

Por otro lado, la totalidad de las bandas radioactivas detectadas contenían glucanos α 1,4, ya que todas ellas eran sensibles a la degradación con α -amilasa (Fig. 52 B, comparar carriles 3 y 4).

A su vez, cuando una mezcla de reacción de GS-2 a la que se había agregado glucógeno libre de proteínas, se sometió a electroforesis en con-

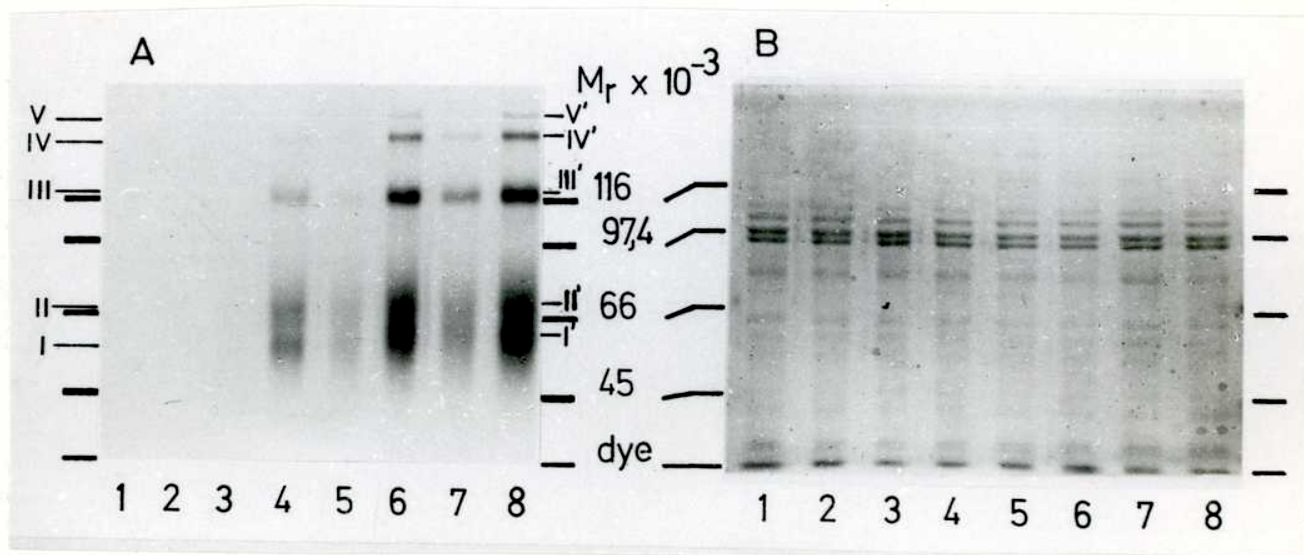


Fig. 51: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN DE GS-2.

Mezclas de reacción de GS-2 (80 μ l) se incubaron en ausencia (carriles 1, 3, 5, 7) o presencia (carriles 2, 4, 6, 8) de Glc-6-P 9 mM. Alícuotas de 20 μ l (25 μ g D1A) se tomaron a 0 (carriles 1 y 2), 10 (carriles 3 y 4), 30 (carriles 5 y 6) y 60 (carriles 7 y 8) min, y se sometieron a electroforesis en un gel de 7,5% de acrilamida en presencia de SDS tal como se describió en 2.8.2.2. Los pesos moleculares de las bandas I-V y I'-V' se calcularon como en 2.8.2.2.1. Dye indica la posición del azul de bromofenol. En A se muestra la autorradiografía del gel; en B la tinción de proteínas.



Fig. 52: ANALISIS ELECTROFORETICO DE PRODUCTOS DE REACCION DE GS-2 DIGERIDOS CON α -AMILASA O PRECIPITADOS CON TCA.

Mezclas de reacción de GS-2 (20 μ g D1A) se incubaron por triplicado durante 60 min con Glc-6-P 9 mM. Posteriormente, se incubaron durante 60 min más, en ausencia (carriles 4, 7 y 8) o presencia (carril 3) de 1,5 unidades de α -amilasa libre de proteasa. Después de la incubación, las mezclas se llevaron a sequedad (carriles 3 y 4), o se precipitaron con TCA 10% y se separaron las fracciones soluble (carril 7) e insoluble (carril 8) en ácido. En un experimento paralelo, 1,5 unidades de α -amilasa (carril 2), 10 μ g de fosforilasa b (carril 6) y una mezcla de 1,5 unidades de α -amilasa y 10 μ g de fosforilasa b (carril 5) se incubaron durante 60 min en las condiciones de GS-2, omitiendo D1A y UDP-(14 C)Glc. En estas condiciones, la α -amilasa no mostró actividad proteolítica (comparar carriles 5 y 6, panel A).

Carril 1, standards de PM: myo, miosina (PM 205.000); β gal, β -galactosidasa (PM 116.000); Phb, fosforilasa b (PM 97.400); Bsa, albúmina sérica bovina (PM 66.000); Ova, ovalbúmina (PM 45.000). La electroforesis se llevó a cabo en un gel de 7,5% de acrilamida, tal como se describió en 2.8.2.2. Dye indica la posición del azul de bromofenol; las flechas señalan posiciones de comigración de proteína y radioactividad. En A se muestra la tinción de proteínas del gel y en B el correspondiente autorradiograma.

diciones similares a las de las Figs. 51 y 52, se vio que toda la radioactividad quedaba entre el lugar de siembra y los primeros milímetros del gel de poro grueso (5%; datos no mostrados).

Por lo tanto, dado que ni los maltosacáridos ni el glucógeno libre de proteínas migran en las condiciones en las que se realizaron estos experimentos, los datos presentados en las Fig.s 51 y 52 indicaron claramente que la glucógeno sintetasa purificada (D1A) sintetizó, en ausencia de glucógeno, glucanos α 1,4 unidos a proteína.

3.7.2.2.2. EXPERIMENTOS DE PULSO Y "CHASE". DIGESTION CON AMILOGLUCOSIDASA

A pesar de que los experimentos de pulso con UDP-(^{14}C)Glc $4 \mu\text{M}$ mostrados en la sección anterior demostraron la síntesis de glucanos α 1,4 unidos a proteína, los mismos no aclararon la relación existente entre las distintas bandas radioactivas, detectadas ya a tiempos relativamente cortos de marcación (10 min, Fig. 51 A, carril I a V).

A fin de confirmar que la presencia de varias bandas se debía al diferente grado de glucosilación del aceptor proteico, y no a la existencia de varios aceptores, se realizó un experimento de pulso y "chase". Una mezcla de reacción de GS-2 se incubó con UDP-(^{14}C)Glc $4 \mu\text{M}$ y Glc-6-P 9 mM durante 10 min, y luego se siguió la reacción por otros 110 min en presencia de UDP-Glc 5 mM. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, y se las sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Como se observa en la Fig. 53, el esquema durante el pulso fue similar al mostrado en la Fig. 51 B. Así, a los 2 min de pulso (Fig. 53, carril 1), la radioactividad apareció en la zona de bajo PM, principalmente en dos bandas difusas de alrededor de 52 y 66 kDa, respectivamente menores que los correspondientes a I y II (Fig. 51 A, carril 4). En 5 min de pulso (carril 2), la radiomarca en la zona de bajo PM aumentó, pero las bandas marcadas aparecieron ligeramente retrasadas; además, también se detectó (^{14}C)glucosa en la zona de mayor PM, predominantemente en tres posiciones correspondientes a 130, 195 y más de 200 kDa, respectivamente. Después de 10 min de pulso (carril 3), se hizo aún más evidente que el tamaño de los productos que se marcaba era mayor. Esto fue más claro todavía después del "chase": luego de 20 min de dilución (carril 4), la radioactividad en la zona de bajo PM desapareció casi por completo, excepto



Fig. 53: PRODUCTOS DE REACCION DE GS-2 MARCADOS CON PULSO Y "CHASE".
Una mezcla de reacción de GS-2 se incubó durante 10 min con $\text{UDP-}^{14}\text{C}\text{Glc } 4 \mu\text{M}$ y luego se hizo un "chase" con $\text{UDP-Glc } 3 \text{ mM}$. Se tomaron alícuotas de la mezcla ($13 \mu\text{g D1A}$) a los 2 (carril 1), 5 (carril 2) y 10 min (carril 3) del pulso, y a los 20 (carril 4), 50 (carril 5) y 110 min (carril 6) después del "chase" y se sometieron a electroforesis en un gel de 7,5% de acrilamida en presencia de SDS como en 2.8.2.2. Los pesos moleculares de las bandas radioactivas se calcularon como en 2.8.2.2.1. tomando el punto medio de cada banda. Se muestra la autorradiografía del gel.

por una banda de 63 kDa; la radiomarca apareció en la zona de mayor PM. Durante tiempos más largos de "chase" (50 y 110 min, carriles 5 y 6, respectivamente) se vio que el tamaño de los productos sintetizados había aumentado, ya que la movilidad de las bandas radioactivas disminuyó con el tiempo de incubación. Más aún, se encontró (^{14}C)glucosa asociada al gel de poro grueso y el lugar de siembra.

Por lo tanto, durante las condiciones del "chase" de UDP-Glc las especies de bajo PM (Fig. 53, carriles 1 a 3) se transformaron en especies de alto PM (carriles 4 a 6).

Por otra parte, cuando una mezcla de incubación correspondiente a un "chase" de 50 min, se incubó con amiloglucosidasa, las bandas radioactivas originales de alto PM (Fig. 54, carril 1) desaparecieron, dando lugar a bandas de mayor movilidad electroforética (carriles 2 a 4). Más aún, incubaciones largas con amiloglucosidasa (60 min, carril 5, y 120 min, no mostrado) produjeron la desaparición total de la radioactividad, aun la presente en la banda de 63 kDa, que permanecía durante el "chase" (Fig. 53, carriles 4 a 6).

Por lo tanto, durante el "chase" con UDP-Glc, las especies de bajo PM (Fig. 53, carriles 1 a 3) se transformaron en productos de mayor tamaño (carriles 4 a 6), los que volvieron a reducir su PM por degradación amilolítica (Fig. 54, carriles 2 a 4). Estos resultados indicaron, entonces, que los glucanos α 1,4 unidos a proteína sintetizados durante el pulso, fueron alargados por la glucógeno sintetasa durante la dilución con UDP-Glc, para dar productos de gran tamaño que siguieron unidos a proteína.

3.7.3. DISCUSION

Hemos demostrado previamente que una preparación parcialmente purificada de glucógeno sintetasa de músculo cardíaco de rata (D1A) catalizaba la incorporación de (^{14}C)glucosa a partir del UDP-(^{14}C)Glc a una fracción insoluble en TCA (Tabla XVIII).

Los productos radioactivos sintetizados eran glucanos α 1,4, ya que la digestión con α -amilasa o amiloglucosidasa del material insoluble en ácido liberó maltosacáridos o glucosa radiomarcados, respectivamente (Sección 3.7.1.). Dado que en las condiciones del ensayo GS-2, el TCA no precipita oligo o polisacáridos (Tabla XX), los glucanos α 1,4 sintetizados durante la



Fig. 54: DIGESTION CON AMILOGLUCOSIDASA DE LOS PRODUCTOS MARCADOS CON PULSO Y "CHASE".

Una mezcla de GS-2 se incubó 10 min con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M y luego 50 min con UDP-Glc 5 mM. Se agregó entonces 0,06 unidades de amiloglucosidasa y la mezcla se incubó durante otros 60 min. Se tomaron alícuotas (13 μ g D1A) a 0 (carril 1), 5 (carril 3), 10 (carril 2), 30 (carril 4) y 60 min (carril 5) después del agregado de amiloglucosidasa, y se sometieron a electroforesis en un gel de 7,5% de acrilamida. Las condiciones de la corrida electroforética, autorradiografía y determinación de peso molecular son las mismas que en la Fig. 53.

reacción debían estar unidos a una aglicona.

La naturaleza proteica de la aglicona quedó demostrada por la sensibilidad del compuesto radioactivo insoluble en TCA a la digestión con proteasa libre de amilasa (Sección 3.7.1.), y más concluyentemente, por la migración electroforética en geles de poliacrilamida de los (^{14}C)glucanos, tanto en condiciones nativas (Fig. 50) como disociantes (Fig 51 A y 53).

Dado que se obtuvieron iguales resultados analizando la mezcla de reacción completa (Fig. 52 B, carril 4), o bien la correspondiente fracción insoluble en TCA (carril 8), se concluyó que si la unión entre glucano y proteína no era covalente, debía ser lo suficientemente fuerte como para resistir condiciones tan desnaturalizantes como la precipitación ácida y el subsiguiente calentamiento en SDS. Este hecho llevó a descartar, una vez más, la idea de la simple contaminación con glucano α 1,4 no unido a proteína como explicación de la actividad GS-2.

En el caso de la marcación con UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ 4 μM , se observó una buena correlación entre la detección de la reacción GS-2 en función del tiempo mediante la autorradiografía del gel (Fig. 51 A) o mediante la incorporación a la fracción TCAp (Fig. 45). Así, en ambos casos se vio tanto el "lag" de 10 min en la incorporación de (^{14}C)glucosa en ausencia de Glc-6-P, como la activación causada por este compuesto. Además, se comprobó que Glc-6-P actuaba estimulando la incorporación de radiomarca a las mismas proteínas que se marcaban en su ausencia (Fig. 51 A).

Un aspecto importante a considerar es que, como D1A tiene aceptor ya glucosilado (ver Sección 3.8.), si el mecanismo de acción de la glucógeno sintetasa sobre este proteoglucano involucrara el alargamiento de varias cadenas a la vez, es lógico pensar que los (^{14}C)glucanos sintetizados sobre el aceptor serán relativamente heterogéneos en cuanto a su longitud. Dado que las porciones sacarídicas son muy importantes para el comportamiento electroforético de las glicoproteínas (228), pequeñas diferencias en el largo de las cadenas glucosídicas modificarán la movilidad del aceptor proteico, dando como resultado bandas que migren contiguamente.

De acuerdo con esta idea, los esquemas de radioactividad obtenidos en los análisis electroforéticos (Figs. 51 A y 53) mostraron regiones anchas en lugar de bandas netas, siendo esto más evidente en la zona del gel de mayor

discriminación de PM (Fig. 51 A, I y II, y Fig. 53, zona entre 52 y 66 kDa).

El experimento de pulso y "chase" permitió confirmar definitivamente que la zona ancha radioactiva detectada entre 52 y 66 kDa durante el pulso de 2 min (Fig. 53, carril 1), se debía a distintos grados de glucosilación de un aceptor proteico, y no a la existencia de varios aceptores distintos. Así, se vio claramente que las especies de menor PM (Fig. 53, carriles 1 a 3) eran convertidas en las de mayor tamaño por incubación con una concentración milimolar de UDP-Glc.

El hecho de que no se hayan detectado variaciones en el esquema proteico durante el pulso (Fig. 51 B) o durante el pulso y "chase" (no mostrado) indicó que el aceptor proteico que participaba en la reacción representaba una proporción muy baja de las proteínas presentes en la preparación enzimática.

Por otra parte, la digestión con amiloglucosidasa de los productos de gran tamaño sintetizados durante el "chase" regeneró los compuestos de bajo PM, para finalmente degradar toda la radioactividad (Fig. 54). Esto ocurrió incluso con la banda de 63 kDa, indicando que la misma también representaba glucanos α 1,4 unidos a proteína, aunque no se explica por qué no fue alargada durante el "chase" (Fig. 53, carriles 4 a 6).

Los resultados presentados en esta sección indicaron, de modo concluyente, que la fracción enzimática D1A tenía aceptor ya glucosilado que fue alargado inicialmente con UDP-(^{14}C)Glc micromolar. Estos glucanos α 1,4 radioactivos fueron, a su vez, usados como "primers" y elongados por la glucógeno sintetasa para dar productos de alto PM que siguieron unidos a proteína, ya que por digestión con amiloglucosidasa se volvió a tener bandas radioactivas que migraban en electroforesis. Estos compuestos de alto PM tenían un comportamiento electroforético similar al del glucógeno libre de proteínas, en cuanto a que no se movían del lugar de siembra o penetraban un poco en el gel de poro grueso.

La importancia de estos datos reside en dos puntos fundamentales:

- 1) La demostración de la unión covalente glucano-proteína, a través de la migración electroforética de (^{14}C)glucanos en condiciones fuertemente desnaturizantes (TCA y SDS) en las que glucanos libres de proteínas no se mueven, y

2) La comprobación de que esos glucanos unidos a proteína son utilizados para la formación de productos de alto peso molecular, que se comportan igual que el glucógeno nativo.

Este último hecho es muy relevante, ya que muchas de las críticas relacionadas con la iniciación de la biosíntesis del glucógeno y de otros poliglucanos, plantean como única demostración válida del modelo esquematizado en la Fig. 24, la caracterización de la unión glicosil-aminoácido. Si bien es cierto que este punto debe ser resuelto, existe un aspecto crítico relacionado con el mismo, y es que previamente se debe demostrar que la glucoproteína o el proteoglucano al cual se le ha de caracterizar la unión aminoacil-azúcar es un intermediario en la biosíntesis del polisacárido en cuestión. En este sentido, consideramos que los resultados presentados en este trabajo de tesis aportan evidencias concluyentes de la síntesis "in vitro" de glucanos α 1,4 unidos a proteína en músculo cardíaco de rata, que pueden considerarse como intermediarios en la biosíntesis del glucógeno.

Respecto a otros sistemas, Aon y Curtino (166) reportaron que una preparación de membranas de retina bovina que sedimentaba a 100.000 x g y que contenía glucógeno endógeno (300 nmoles glucosa/mg proteína), incorporaba (^{14}C)glucosa a partir de UDP-(^{14}C)Glc 2 mM, a una fracción insoluble en TCA y a otra, soluble en ácido e insoluble en alcohol. Los productos radioactivos presentes en ambas fracciones no penetraban en un gel de 5,6% de acrilamida después de electroforesis en presencia de SDS, y lo hacían solo en los primeros milímetros del gel, en el caso de un gel en gradiente discontinuo de 2,6 a 5,6% de acrilamida. Dado que el glucógeno nativo libre de proteínas se comportó de igual modo en nuestro caso (aún con un gel de 5% de acrilamida), no creemos que este criterio sea válido para indicar la presencia de proteína unida covalentemente a los glucanos radioactivos.

Por otra parte, en el mismo reporte, estos autores informaron que la fracción soluble en TCA e insoluble en alcohol que se aislaba de las membranas de retina (llamada proteoglucógeno), mostraba una banda que se movía unos pocos milímetros en un gel en gradiente de poli-acrilamida con SDS de 3 a 5,6% de acrilamida, y que se teñía con azul de Coomassie y con ácido periódico/Schiff. Nuevamente, la presencia conjunta de carbohidrato y proteína en compuestos que permanecen en el lugar de siembra o que difunden un poco en un

gel de poro grueso, no indica forzosamente la asociación covalente entre ambos.

Los mismos autores, en un trabajo posterior (168), postularon que el aminoácido involucrado en la unión glucógeno-proteína del proteoglicógeno de retina sería tirosina. El material que analizaron correspondía al proteoglicógeno antes mencionado, digerido con proteasas, cromatografiado en una columna de Sepharosa CL-4B (cerca del volumen de exclusión de la columna), precipitado con alcohol y finalmente iodinado con Na^{125}I . El compuesto iodinado fue digerido posteriormente con α -amilasa y amiloglicosidasa, dando un producto radioactivo muy pequeño, que fue identificado por cromatografía líquida de alta presión como moniodotirosina y, en menor proporción, diiodotirosina. Los autores propusieron finalmente que el glucógeno de retina está unido O-glicosídicamente al grupo -OH fenólico de la tirosina.

Varios puntos no quedan claros en este trabajo. En primer lugar, O-metiltirosina es completamente resistente a la iodinación (229), no entendiéndose por lo tanto cómo se puede iodinar el proteoglicógeno si el -OH de la tirosina está bloqueado por un resto glucosilo.

En segundo lugar, el 70% del material iodinado proveniente de proteólisis y posterior amilólisis del proteoglicógeno (que luego mostró ser moniodotirosina y diiodotirosina), eluyó en una columna de Bio Gel P2 superponiéndose ligeramente por delante de un standard de glucosa libre. Dado que esta columna discriminaría pequeñas variaciones de peso molecular dadas por restos glucosilos o aminoácidos adicionales, este resultado indicó que el pico radioactivo contenía solo iodotirosina (mono o di), pero no glucosil u oligosacariliodotirosina, ni tampoco aminoacil-iodotirosina. Por lo tanto, llama la atención que, tratándose de un material de tan alto peso molecular (1.000 kDa en Sepharosa CL-4B ya después de proteólisis), el proteoglicógeno se haya degradado totalmente hasta dar tirosina-glucógeno y no glucógeno-peptidos, y además, que posteriormente, la porción glucosídica de este material se haya digerido totalmente sin dejar siquiera un resto glucosilo unido al aminoácido.

Dado que, como se ha mencionado varias veces, el glucógeno posee una gran afinidad por ciertas proteínas, entre ellas muchas de las enzimas de su metabolismo (98, 217), hay que ser muy cauteloso cuando, en un caso como el

reci3n mencionado, se trabaja solo con un material no purificado que resulta de iodinar gluc3geno no radioactivo.

Otro sistema de estudio de proteogluc3geno "in vivo" fue analizado por Whelan y col. en m3sculo de conejo (167). Estos autores demostraron que una prote3na de 37 kDa, que junto con otras copurificaba con gluc3geno, conten3a 10-30 moles glucosa / mol p3ptido, a3n despu3s de digesti3n con α -amilasa y amiloglucosidasa. La prote3lisis de esta glucoprote3na dio como resultado la aparici3n de glucop3ptidos en los que aumentaba la proporci3n relativa de tirosina. Por otra parte, 14% de la tirosina total de la glucoprote3na de 37 kDa y 100% de la tirosina del glucop3ptido, eran resistentes a iodinaci3n con Na^{125}I o a nitraci3n con tetranitrometano, reacciones que requieren la ionizaci3n del grupo -OH fen3lico de la tirosina (229,97). Estos datos llevaron a los autores a sugerir que los grupos fen3licos bloqueados correspond3an a la uni3n glucosil-tirosina del proteogluc3geno de m3sculo de conejo. Es interesante destacar que si bien la uni3n postulada fue la misma que la propuesta por Aon y Curtino para el caso de retina (168), las evidencias presentadas fueron exactamente opuestas.

3.8. DIGESTION DE LA GLUCOGENO SINTETASA PURIFICADA (D1A) CON α -AMILASA INSOLUBLE

A fin de confirmar la preexistencia de glucanos α 1,4 unidos a prote3na, la fracci3n D1A se sometió a degradaci3n amilol3tica. Como se observa en la Tabla XXI, despu3s de preincubar la preparaci3n enzim3tica con α -amilasa insoluble, la actividad GS-2 presente en la misma se redujo significativamente, independientemente de la presencia de Glc-6-P.

La disminuci3n observada no se debió a la solubilizaci3n de la α -amilasa durante la preincubaci3n, ya que no se detect3 actividad amilol3tica cuando la fracci3n D1A tratada se incub3 directamente con (^{14}C)gluc3geno.

Por otra parte, la actividad GS-1 no fue afectada por la preincubaci3n con la enzima degradativa (Tabla XXI).

Tabla XXI: PREINCUBACION DE LA GLUCOGENO SINTETASA (FRACCION D1A) CON α -AMILASA.

ACTIVIDAD ENZIMATICA	FRACCION	Glc-6-P	ACTIVIDAD RELATIVA (%)	
			CONTROL	TRATADA CON α -AMILASA
GS-2	TCApp	+	100	44
			100	27
GS-1	KOH-EtOHpp	+	100	89
			100	94

La fracción D1A se incubó con α -amilasa insoluble y se procesó como se indicó en 2.6.2. Un control en el que se había omitido la α -amilasa se trató de modo similar. Las actividades GS-1 y GS-2 se determinaron como en 2.3.1. y 2.3.2. Las incubaciones se realizaron durante 1 h en ausencia o presencia de Glc-6-P 9 mM.

3.8.1. DISCUSION

En las Secciones 3.4.3. y 3.5.3. se discutió la posibilidad de que la detección de la actividad GS-2 en la fracción D1A reflejara la presencia de aceptor glucosilado asociado a la glucógeno sintetasa purificada. Esto fue apoyado, por otra parte, por el hecho de que ya en 2 min de pulso con UDP-(¹⁴C)Glc 4 μ M (Fig. 53, carril 1), se haya detectado una zona ancha de productos radioactivos que diferían en el tamaño de las porciones glucosídicas.

El hecho de que la preincubación con α -amilasa de la fracción enzimática D1A haya producido una disminución de 60-70% de la actividad GS-2 de la misma, sin afectar la actividad GS-1 (Tabla XXI), indicó que la actividad independiente de "primer" exógeno se debía a la presencia de glucanos α _{1,4} endógenos.

Dado que en la Sección 3.7. hemos demostrado que los productos de reacción de GS-2 consistían en glucanos α _{1,4} unidos a proteína, se puede concluir que los glucanos endógenos asociados a la enzima estaban asociados a proteína. Como hemos mencionado en la Sección 3.6.4., el aceptor podría ser la propia glucógeno sintetasa o bien una proteína fuertemente asociada a la misma.

Por lo tanto, tal como se ha discutido anteriormente, la reacción GS-2 representaba, en músculo cardíaco de rata, la elongación de glucanos α _{1,4} unidos a proteína y no la iniciación de la síntesis propiamente dicha.

Hemos visto que las actividades independiente y dependiente de "primer" se detectaron en la misma posición después de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (Figs. 47 y 48), sugiriendo que ambas actividades enzimáticas estaban catalizadas por la glucógeno sintetasa. En consecuencia, el proteoglucano endógeno digerido por el tratamiento con α -amilasa era el "primer" para la glucógeno sintetasa en el ensayo GS-2, y representaba el producto de la primera etapa de la iniciación de la biosíntesis del glucógeno, esquematizada en la Fig. 24.

La actividad GS-2 remanente, después del tratamiento de D1A con α -amilasa (Tabla XXI) podría representar la verdadera síntesis "de novo" del glucógeno, o deberse a una degradación incompleta del proteoglucano endógeno.

4. REFERENCIAS

1. Ward, K. Jr., Seib, P.A. (1970). En "The Carbohydrates" (W. Pigman y D. Horton, Eds.), Vol. 2A, pp. 413-445. Academic Press, Inc., Nueva York.
2. Danishefsky, I., Whistler, R.L. y Bettelheim, F.A. (1970) Ibid. pp. 375-412.
3. Muir, H. y Hardingham, T.E. (1979). En "Glycoconjugate Research" (J.D. Gregory y R.W. Jeanloz, Eds.), Vol. 1, pp. 375-412. Academic Press, Inc., Nueva York.
4. Banks, W., y Muir, D.D. (1980). En "The Biochemistry of Plants" (J. Preiss, Ed.), Vol. 3, pp. 321-369. Academic Press Inc., Nueva York.
5. Chen, M., y Whistler, R.L. (1977). Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 34, 285-343.
6. Dey, P.M. (1978). Ibid. 35, 341-376.
7. Ryman, B.E., y Whelan, W.J. (1971). Adv.Enzymol. 34, 285-443.
8. Rothman-Denes, L.B., y Cabib, E. (1970). Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 66, 967-974.
9. Smith, A.G. (1982). En "The Biology of Cyanobacteria" (N.G. Carr y B.A. Whilton, Eds.), pp. 47-86. Blackwell Scientific Publications, Londres.
10. Percival, E. (1970). Op.cit. Ref. 1, Vol. 2B, pp. 537-568.
11. Whistler, R.L., y Richards, E.L. (1970). Op.cit. Ref. 1, pp. 447-469.
12. Lindahl, U., y Höök, M. (1978). Ann.Rev.Biochem. 47, 385-417.
13. Höök, M., Kjellén, L., Johansson, S., y Robinson, J. (1984). Ibid. 53, 847-869.
14. Costerton, J.W., Ingram, J.M. y Cheng, K.J. (1974). Bacteriol.Rev. 38, 87-110.
15. Shockman, G.D., y Barrett, J.F. (1983). Ann.Rev.Microbiol. 37, 501-527.
16. Nikaido, H., y Vaara, M. (1985). Microbiol.Rev. 49, 1-32.
17. Weckesser, J., Drews, G., y Mayer, H. (1979). Ann.Rev.Microbiol. 33, 215-239.
18. Troy II, F.A. (1979). Ibid. 519-560.
19. Aspinall, G.O. (1980). Op.cit. Ref. 4, pp. 473-500.
20. Greenwood, C.T. (1970). Op.cit. Ref. 1, Vol. 2B, pp. 471-513.
21. Sturgeon, R.J. (1974). En "Plant Carbohydrate Chemistry" (J.B. Pridham, Ed.), pp. 219-233. Academic Press, Inc., Londres.
22. Barker, S.A., y Somers, P.J. (1970). Op.cit. Ref. 1, Vol. 2B, pp.

- 569-587.
23. Duffus, J.H., Levi, C., y Manners, D.J. (1982). *Adv. Microbial Physiol.* 23, 151-181.
 24. Phaff, H.J. (1971). En "The Yeasts" (A.H. Rose, y J.S. Harrison, Eds.), Vol. 2, pp. 135-210. Academic Press, Inc., Londres.
 25. Sutherland, I.W. (1982). *Adv. Microbial Physiol.* 23, 79-150.
 26. Fincher, G.B., y Stone, B.A. (1983). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34, 47-70.
 27. Dedonder, R. (1972). En "Biochemistry of the Glycosidic Linkage" (R. Piras, y H.G. Pontis, Eds.), pp. 21-78. Academic Press, Inc., Nueva York.
 28. Markovitz, A., y Dorfman, A. (1962). *J. Biol. Chem.* 237, 273-279.
 29. Hascall, V.C., Oegema, T.R., Brown, M., y Caplan, A.I. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 3511-3519.
 30. Rosenberg, L., Hellmann, W., y Kleinschmidt, A.K. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 1877-1883.
 31. Lindahl, U., y Rodén, L. (1964). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 254-259.
 32. Lindahl, U., y Rodén, L. (1972). En "Glycoproteins" (A. Gottschalk, Ed.) Part A, pp. 491-517. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
 33. Baker, J.R., Cifonelli, J.A., y Rodén, L. (1975). *Connect. Tissue Res.* 3, 149-153.
 34. Bray, B.A., Lieberman, R., y Meyer, K. (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 3373-3380.
 35. Kornfeld, R., y Kornfeld, S. (1980). En "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" (W.J. Lennarz, Ed.), pp. 1-34. Plenum Press, Nueva York.
 36. Struck, D.K., y Lennarz, W.J. (1980). *Ibid.*, pp. 35-83.
 37. Schachter, H., y Roseman, S. (1980). *Ibid.*, pp. 85-160.
 38. Grebner, E.E., Hall, C.W., y Neufeld, E.F. (1966). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 672-677.
 39. Robinson, H.C., Telser, A., y Dorfman, A. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1859-1866.
 40. Stoolmiller, A.C., Horwitz, A.L., y Dorfman, A. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 3525-3532.
 41. Schwartz, N.B., y Rodén, L. (1974). *Carbohydr. Res.* 37, 167-180.

42. Schwartz, N.B., y Dorfman, A. (1975). Arch.Biochem.Biophys. 171, 136-144.
43. Schwartz, N.B., y Rodén, L. (1975). J.Biol.Chem. 250, 5200-5207.
44. Robinson, H.C., Brett, M.J., Tralaggan, P.J., Lowther, D.A., y Okayama, M. (1975). Biochem.J. 148, 25-34.
45. Galligani, L., Hopwood, J., Schwartz, N.B., y Dorfman, A. (1975). J.Biol.Chem. 250, 5400-5406.
46. Helting, T., y Rodén, L. (1969). J.Biol.Chem. 244, 2790-2798.
47. Ibid. 2799-2805.
48. Dorfman, A. (1974). Mol.Cell.Biochem. 4, 45-65.
49. Helting, T., y Lindahl, U. (1972). Acta Chem.Scan. 26, 3515-3518.
50. Schwartz, N.B. (1979). J.Biol.Chem. 254, 2271-2277.
51. Kimura, J.H., Caputo, C.D., y Hascall, V.C. (1981). J.Biol.Chem. 256, 4368-4376.
52. Nakanishi, Y., Shimizu, M., Otsu, K., Kato, S., Tsuji, M., y Suzuki, S. (1981). J.Biol.Chem. 256, 5443-5449.
53. Malmstrom, A. (1984). J.Biol.Chem. 259, 161-165.
54. Wright, A., Dankert, M., Fennessey, P., y Robbins, P.W. (1967). Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 57, 1798-1803.
55. Higashi, Y., Strominger, J.L., y Sweeley, C.C. (1967). Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 57, 1878-1884.
56. Sutherland, I.W., y Norval, M. (1970). Biochem.J. 120, 567-576.
57. Troy, F.A., Fremman, F.E., y Heath, S. (1971). J.Biol.Chem. 246, 118-133.
58. Wright, A., y Tipper, D.J. (1979). En "The Bacteria" (Gunsalus, I.C., Ed.), Vol. 7, pp. 427-485. Academic Press, Inc., Nueva York.
59. Robbins, P.W., Bray, D., Dankert, M., y Wright, A. (1967). Science 158, 1536-1542.
60. Goldman, R., y Strominger, J.L. (1972). J.Biol.Chem. 247, 5116-5122.
61. McArthur, H.A.I., Roberts, F.M., Hancock, I.C., y Baddiley, J. (1978). FEBS Lett. 86, 193-200.
62. Rohr, T.E., Levy, G.N., Stark, N.J., y Anderson, J.S. (1977). J.Biol. Chem. 252, 3460-3465.
63. Stark, N.J., Levy, G.N., Rohr, T.E., y Anderson, J.S. (1977). J.Biol. Chem. 252, 3466-3472.

64. Ielpi, L. (1982). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
65. Ielpi, L., Couso, R., y Dankert, M. (1981). *FEBS Lett.* 130, 253-256.
66. Tolmasky, M.E., Staneloni, R.J., y Leloir, L.F. (1982). *J.Biol.Chem.* 257, 6751-6757.
67. Couso, R.O., Ielpi, L., García, R.C., y Dankert, M.A. (1982). *Eur.J. Biochem.* 123, 617-627.
68. García, R.C., Recondo, E., y Dankert, M. (1974). *Eur.J.Biochem.* 43, 93-105.
69. Delmer, D.P. (1983). *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 41, 105-153.
70. Behrens, N.H., y Leloir, L.F. (1970). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 66, 153-159.
71. Behrens, N.H., Carminatti, H., Staneloni, R.J., Leloir, L.F., y Cantarella, A.I. (1973). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 70, 3390-3394.
72. Kornfeld, R., y Kornfeld, S. (1985). *Ann.Rev.Biochem.* 54, 631-664.
73. Li, E., Tabas, I., y Kornfeld, S. (1978). *J.Biol.Chem.* 253, 7762-7770.
74. Parodi, A.J. (1981). *Arch.Biochem.Biophys.* 210, 372-382.
75. Nilsson, B., Nakazawa, K., Hassell, J.R., Newsome, B.A., y Hascall, V.C. (1983). *J.Biol.Chem.* 258, 6056-6063.
76. Sharma, C.B., Babczinski, P., Lehle, L., y Tanner, W. (1974). *Eur.J. Biochem.* 46, 35-41.
77. Parodi, A.J., y Leloir, L.F. (1979). *Biochim.Biophys.Acta* 559, 1-37.
78. Jung, S.M., y Mayer, R.M. (1981). *Arch.Biochem.Biophys.* 208, 288-295.
79. Robyt, J.F., Kimble, B.K., y Walseth, T.F. (1974). *Arch.Biochem.Biophys.* 165, 634-640.
80. Robyt, J.F., y Walseth, T.F. (1978). *Carbohydr.Res.* 61, 433-445.
81. Robyt, J.F., y Taniguchi, H. (1976). *Arch.Biochem.Biophys.* 174, 129-135.
82. Robyt, J.F., y Martin, P.J. (1983). *Carbohydr.Res.* 113, 301-315.
83. Ditson, S.L., y Mayer, R.M. (1984). *Carbohydr.Res.* 126, 170-175.
84. Pontis, H.G., y Del Campillo, E. (1985). En "Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants" (Dey, P.M. y Dixon, R.A., Eds.), pp. 205-227. Academic Press, Inc., Nueva York.
85. Manners, D.J. (1962). *Adv.Carbohydr.Chem.* 17, 371-430.
86. Marshall, J.J. (1974). *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 30, 257-370.
87. Walker, G.J., y Whelan, W.J. (1960). *Biochem.J.* 76, 264-268.
88. Krisman, C.R. (1962). *Anal.Biochem.* 4, 17-23.

89. Takahara, H., y Matsuda, K. (1976). *Agr.Biol.Chem.* 40, 1699-1703.
90. Peat, S., Whelan, W.J., y Turvey, J.R. (1956). *J.Chem.Soc.* 2317-2322.
91. Rickson, F.R. (1973). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 104-114.
92. Drochmans, P. (1962). *J.Ultrastruct.Res.* 6, 141-163.
93. Bullivant, H.M., Geddes, R., y Wills, P.R. (1983). *Biochem.Int.* 6, 497-506.
94. Wanson, J.C., y Drochmans, P. (1972). *J.Cell Biol.* 54, 206-224.
95. Calder, P.C., y Geddes, R. (1985). *Carbohydr.Res.* 135, 249-256.
96. Gunja-Smith, Z., Marshall, J.J., Mercier, C., Smith, E.E., y Whelan, W.J. (1970). *FEBS Lett.* 12, 101-104.
97. Goldsmith, E., Sprang, S., y Fletterick, R. (1982). *J.Mol.Biol.* 156, 411-427.
98. Stalmans, W., y Hers, H.G. (1973). *The Enzymes* 9, 309-361.
99. Hers, H.G. (1976). *Ann.Rev.Biochem.* 45, 167-189.
100. Roach, P.J., y Larner, J. (1977). *Mol.Cell.Biochem.* 15, 179-200.
101. Cohen, P., Nimmo, G.A., Burchell, A., y Antoniw, J.F. (1978). *Adv.Enz. Regul.* 16, 97-119.
102. Fletterick, R.J., y Madsen, N.B. (1980). *Ann.Rev.Biochem.* 49, 31-61.
103. Roach, P.J. (1981). *Curr.Top.Cell.Regul.* 20, 45-105.
104. Cohen, P. (1982). *Nature* 296, 613-620.
105. Leloir, L.F., y Cardini, C.E. (1957). *J.Am.Chem.Soc.* 79, 6340.
106. Leloir, L.F., Olavarria, J.M., Goldemberg, S.H., y Carminatti, H. (1959). *Arch.Biochem.Biophys.* 81, 508-520.
107. Leloir, L.F., y Goldemberg, S.H. (1960). *J.Biol.Chem.* 235, 919-923.
108. Villar-Palasi, C., y Larner, J. (1960). *Biochim.Biophys.Acta* 39, 171-173.
109. Friedman, D.L., y Larner, J. (1963). *Biochemistry* 2, 669-675.
110. Chock, P.B., Rhee, S.G., y Stadtman, E.R. (1980). *Ann.Rev.Biochem.* 49, 813-843.
111. Takeda, Y., Brewer, H.B., y Larner, J. (1975). *J.Biol.Chem.* 250, 8943-8950.
112. Roach, P.J., Takeda, Y., y Larner, J. (1976). *J.Biol.Chem.* 251, 1913-1919.
113. Nimmo, H.G., Proud, C.G., y Cohen, P. (1976). *Eur.J.Biochem.* 68, 21-30.
114. Caudwell, F.B., Antoniw, J.F., y Cohen, P. (1978). *Eur.J.Biochem.* 86.

- 511-518.
115. Soderling, T.R., Jett, M.F., Hutson, N.J., y Khatra, B.S. (1977). *J.Biol.Chem.* 252, 7517-7524.
 116. Sheorain, V.S., Khatra, B.S., y Soderling, T.R. (1982). *J.Biol.Chem.* 257, 3462-3470.
 117. Schlender, K.K., Beebe, S.J., Lutz, S.A., y Reimann, E.M. (1980). *Biochim.Biophys.Acta* 615, 324-340.
 118. Huang, K.P., y Huang, F.L. (1980). *J.Biol.Chem.* 255, 3141-3147.
 119. Picton, C., Aitken, A., Bilham, T., y Cohen, P. (1982). *Eur.J.Biochem.* 124, 37-45.
 120. DePaoli-Roach, A.A., Ahmad, Z., Camici, M., Lawrence, J.C. Jr., y Roach, P.J. (1983). *J.Biol.Chem.* 258, 10702-10709.
 121. Salsas, E., y Larner, J. (1975). *J.Biol.Chem.* 250, 1833-1837.
 122. Goldemberg, S.H. (1962). *Biochim.Biophys.Acta* 56, 357-359.
 123. Larner, J., Takeda, Y., y Hizukuri, S. (1976). *Mol.Cell.Biochem.* 12, 131-136.
 124. Parker, P.J., Embi, N., Caudwell, F.B., y Cohen, P. (1982). *Eur.J. Biochem.* 124, 47-55.
 125. Huang, K.P., Akatsuka, A., Singh, T.J., y Blake, K.R. (1983). *J.Biol. Chem.* 258, 7094-7101.
 126. Tan, A.W.H., y Nuttall, F.Q. (1983). *Ibid.* 9624-9630.
 127. Camici, M., DePaoli-Roach, A.A., y Roach, P.J. (1984). *J.Biol.Chem.* 259, 3429-3434.
 128. Mitchell, J.W., Mellgren, R.L., y Thomas, J.A. (1980). *J.Biol.Chem.* 255, 10368-10374.
 129. Sivaramakrishnan, S., High, C.W., y Walsh, D.A. (1982). *Arch.Biochem. Biophys.* 214, 311-325.
 130. Cori, G.T., y Cori, C.F. (1943). *J.Biol.Chem.* 151, 57-63.
 131. Krisman, C.R. (1962). *Biochim.Biophys.Acta* 65, 307-315.
 132. Satoh, K., y Sato, K. (1982). *J.Biochem.* 91, 1129-1137.
 133. Ponzetto-Zimmerman, C., y Gold, A.M. (1983). *Biochemistry* 22, 3387-3392.
 134. Brown, B.I., y Brown, D.H. (1966). *Meth.Enzymol.* 8, 395-403.
 135. Caudwell, F.B., y Cohen, P. (1980). *Eur.J.Biochem.* 109, 391-394.
 136. Verhue, W., y Hers, H.G. (1966). *Biochem.J.* 99, 222-227.
 137. Cori, C.F., y Cori, G.T. (1936). *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 34, 702-705.

138. Green, A.A., Cori, G.T., y Cori, C.F. (1942). *J.Biol.Chem.* 142, 447-448.
139. Kobayashi, M., Soman, G., y Graves, D.J. (1982). *J.Biol.Chem.* 257, 14041-14047.
140. Huang, C.Y., y Graves, D.J. (1970). *Biochemistry* 9, 660-671.
141. Titani, K., Koide, A., Hermann, J., Ericsson, L.H., Kumar, S., Wade, R.D., Walsh, K.A., Neurath, H., y Fischer, E.H. (1977). *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4762-4766.
142. Satoh, K., Imai, F., y Sato, K. (1978). *FEBS Lett.* 95, 239-242.
143. Berndt, N., y Rosen, P. (1984). *Arch.Biochem.Biophys.* 228, 143-154.
144. Brown, D.H., y Brown, B.I. (1966). *Meth.Enzymol.* 8, 515-524.
145. Taylor, C., Cox, A.J., Kernohan, J.C., y Cohen, P. (1975). *Eur.J.Biochem.* 51, 105-115.
146. Olavarría, J.M., y Torres, H.N. (1962). *J.Biol.Chem.* 237, 1746-1751.
147. Torres, H.N., y Olavarría, J.M. (1964). *J.Biol.Chem.* 239, 2427-2434.
148. Jeffrey, P.L., Brown, D.H., y Brown, B.I. (1970). *Biochemistry* 9, 1403-1415.
149. Cohen, P. (1979). *Biochem.Soc.Trans.* 7, 459-481.
150. Boyd, M.E., Albright, E.B., Foster, D.W., y McGarry, J.D. (1981). *J.Clin.Invest.* 68, 142-152.
151. Newgard, C.B., Hirsch, L.J., Foster, D.W., y McGarry, J.D. (1985). *J.Biol.Chem.* 258, 8046-8052.
152. Spence, J.T., y Koudelka, A.P. (1985). *J.Biol.Chem.* 260, 1521-1526.
153. Parker, P.J., Caudwell, F.B., y Cohen, P. (1983). *Eur.J.Biochem.* 130, 227-234.
154. Feigin, I., Fredrick, J., y Wolf, A. (1951). *Fed.Proc.* 10, 181-182.
155. Illingworth, B., Brown, D.H., y Cori, C.F. (1961). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 47, 469-478.
156. Brown, D.H., Illingworth, B., y Cori, C.F. (1961). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 47, 479-485.
157. Abdullah, M., Fischer, E.H., Qureshi, M.Y., Slessor, K.N., y Whelan, W.J. (1965). *Biochem.J.* 97, 9 p.
158. Fredrick, J.F. (1973). *Plant Sci.Lett.* 1, 457-462.
159. Gahan, L.C., y Conrad, H.E. (1968). *Biochemistry* 7, 3979-3990.
160. Krisman, C.R. (1972). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 46, 1206-1212.
161. Krisman, C.R. (1973). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 81-89.

162. Krisman, C.R., y Barengo, R. (1975). *Eur.J.Biochem.* 52, 117-123.
163. Barengo, R., Flawiã, M., y Krisman, C.R. (1975). *FEBS Lett.* 53, 274-278.
164. Barengo, R., y Krisman, C.R. (1978). *Biochim.Biophys.Acta* 540, 190-196.
165. Takahara, H., y Matsuda, K. (1977). *J.Biochem. (Tokyo)* 81, 1587-1594.
166. Aon, M.A., y Curtino, J.A. (1984). *Eur.J.Biochem.* 140, 557-566.
167. Stetten, D. Jr., y Stetten, M.R. (1960). *Physiol.Rev.* 40, 505-537.
168. Roe, J.H., Bailey, J.M., Gray, R., y Robinson, J.M. (1961). *J.Biol.Chem.* 236, 1244-1246.
169. Bartley, W., y Dean, B. (1968). *Anal.Biochem.* 25, 99-108.
170. Butler, N.A., Lee, E.Y.C., y Whelan, W.J. (1977). *Carbohydr.Res.* 55, 73-82.
171. Rodriguez, I.R., y Whelan, W.J. (1985). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 132, 829-836.
172. Aon, M.A., y Curtino, J.A. (1985). *Biochem.J.* 229, 269-272.
173. Groisman, J.F. (1984). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- 173a Slabnik, E., y Frydman, R.B. (1970). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 38, 709-714.
174. Ozbun, J.L., Hawker, J.S., y Preiss, J. (1972). *Biochem.J.* 126, 953-963.
175. Hawker, J.S., Ozbun, J.L., Ozaki, H., Greenberg, E., y Preiss, J. (1974). *Arch.Biochem.Biophys.* 160, 530-551.
176. Schiefer, S., Lee, E.Y.C., y Whelan, W.J. (1978). *Carbohydr.Res.* 61, 239-252.
177. Lavintman, N., Tandecarz, J., Carceller, M., Mendiara, S., y Cardini, C.E. (1974). *Eur.J.Biochem.* 50, 145-155.
178. Tandecarz, J., Lavintman, N., y Cardini, C.E. (1975). *Biochim.Biophys. Acta* 399, 345-355.
179. Tandecarz, J., y Cardini, C.E. (1979). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 86, 620-627.
180. Tandecarz, J.S., Szalai, E.N., y Cardini, C.E. (1982). *Anales Asoc.Quím. Arg.* 70, 395-404.
181. Moreno, S. (1984). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
182. Deri Tomos, A., y Northcote, D.H. (1978). *Biochem.J.* 174, 283-290.
183. Zorreguieta, A., Ugalde, R.A., y Leloir, L.F. (1985). *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 126, 352-357.
184. Thomas, J.A., Schlender, K.K., y Larner, J. (1968). *Anal.Biochem.* 25,

- 486-499.
185. Recondo, E., Dankert, M., y Leloir, L.F. (1963). *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 12, 204-207.
 186. Slein, M.W. (1957). *Meth.Enzymol.* 3, 154-157.
 187. Rothman, L., y Cabib, E. (1967). *Biochemistry* 6, 2098-2105.
 188. Bray, G.A. (1960). *Anal.Biochem.* 1, 279-285.
 189. Krisman, C.R., y Barengo, R. (1975). *Anal.Biochem.* 66, 584-589.
 190. Leloir, L.F., Parodi, A.J., y Behrens, N.H. (1981). *Rvta.Soc.Arg.Biol.* 47, 108-110.
 191. Thoma, J.A., Wright, H.B., y French, D. (1959). *Arch.Biochem.Biophys.* 85, 452-460.
 192. Trevelyan, W.E., Procter, D.P., y Harrison, J.S. (1950). *Nature* 166, 444-445.
 193. Hedrick, J.L., y Smith, A.J. (1968). *Arch.Biochem.Biophys.* 126, 155-164.
 194. Laemmli, U.K. (1970). *Nature* 227, 680-685.
 195. Weber, K., y Osborn, M. (1969). *J.Biol.Chem.* 244, 4406-4412.
 196. Fairbanks, G., Steck, T.L., y Wallach, D.F.H. (1971). *Biochemistry* 10, 2606-2616.
 197. Chamberlain, J.P. (1979). *Anal.Biochem.* 98, 132-135.
 198. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
 199. Bird, J.W.C., Carter, J.H., Triemer, R.E., Brooks, R.M., y Spanier, A.M. (1980). *Fed.Proc.* 39, 20-25.
 200. Williams, B.J., y Mayer, S.E. (1966). *Mol.Pharmacol.* 2, 454-464.
 201. Huijing, F., Nuttall, F.Q., Villar-Palasi, C., y Larner, J. (1969). *Biochim.Biophys.Acta.* 177, 204-212.
 202. Miller, T.B. Jr. (1978). *J.Biol.Chem.* 253, 5389-5394.
 203. Barengo, R. (1980). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
 204. Sivak, M.N., Tandecarz, J.S., y Cardini, C.E. (1981). *Arch.Biochem. Biophys.* 212, 525-536.
 205. Kornfeld, R., y Brown, D.H. (1962). *J.Biol.Chem.* 237, 1772-1777.
 206. Sacristán, A., y Rosell-Pérez, M. (1971). *Rev.Esp.Fisiol.* 27, 331-342.
 207. Thomas, J.A., Schlender, K.K., y Larner, J. (1973). *Biochim.Biophys. Acta* 293, 84-93.
 208. De Wulf, H., Stalmans, W., y Hers, H.G. (1968). *Eur.J.Biochem.* 6,

- 545-551.
209. Kawaguchi, K., Fox, J., Holmes, E., Boyer, C., y Preiss, J. (1978). Arch.Biochem.Biophys. 190, 385-397.
 210. Cattáneo, J., Magnan, M., y Bigliardi, J. (1979). Arch.Biochem.Biophys. 196, 449-458.
 211. McVerry, T.H., y Kim, K.H. (1974). Biochemistry 13, 3505-3511.
 212. Fox, J., Kawaguchi, K., Greenberg, E., y Preiss, J. (1976). Biochemistry 15, 849-857.
 213. Piras, R., Rothman, L.B., y Cabib, E. (1968). Biochemistry 7, 56-66.
 214. Cardini, C.E., Paladini, A.C., Caputto, R., Leloir, L.F., y Trucco, R.E. (1949). Arch.Biochem. 22, 87-100.
 215. Rybicka, K. (1981). J.Histochem.Cytochem. 29, 4-8.
 216. Ibid., 553-560.
 217. Satoh, K., y Sato, K. (1980). Biochem.Biophys.Res.Comm. 96, 28-33.
 218. McCullough, T.E., y Walsh, D.A. (1979). J.Biol.Chem. 254, 7336-7344.
 219. Rosell-Pérez, M., y Larner, J. (1964). Biochemistry 3, 773-778.
 220. Rulfs, J., Wolleben, C.D., Miller, T.B., y Johnson, G.L. (1985). J.Biol. Chem. 260, 1203-1207.
 221. Lin, D.C., Segal, H.L., y Massaro, E.J. (1972). Biochemistry 11, 4466-4471.
 222. Takahara, H., y Matsuda, K. (1978). Biochim.Biophys.Acta 522, 363-374.
 223. Schieffer, S., Lee, E.Y.C., y Whelan, W.J. (1973). FEBS Letts. 30, 129-132.
 224. Siepmann, R., y Stegemann, H. (1967). Naturwissenschaften 54, 116-117.
 225. Shivaram, K.N., Stegemann, H., Siepmann, R., y Boser, H. (1971). Z.Naturforsch. 266, 69-70.
 226. Boyer, C.D. (1985). Phytochemistry 24, 15-18.
 227. Brown, N.E., y Larner, J. (1971). Biochim.Biophys.Acta 242, 69-80.
 228. Segrest, J., Jackson, R., Andrews, E., y Marchesi, V. (1971). Biochem. Biophys.Res.Comm. 44, 390-395.
 229. Mayberry, W.E., Rall, J.E., y Bertoli, D. (1965). Biochemistry 4, 2606-2611.