Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis de Posgrado

Mecanismo de translocación de nucleótido azúcares y nucleótido sulfato a través de la membrana del aparato de Golgi

Capasso, Juan Miguel

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:
Capasso, Juan Miguel. (1986). Mecanismo de translocación de nucleótido azúcares y nucleótido sulfato a través de la membrana del aparato de Golgi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1960_Capasso.pdf

Cita tipo Chicago:
Capasso, Juan Miguel. "Mecanismo de translocación de nucleótido azúcares y nucleótido sulfato a través de la membrana del aparato de Golgi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1960_Capasso.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

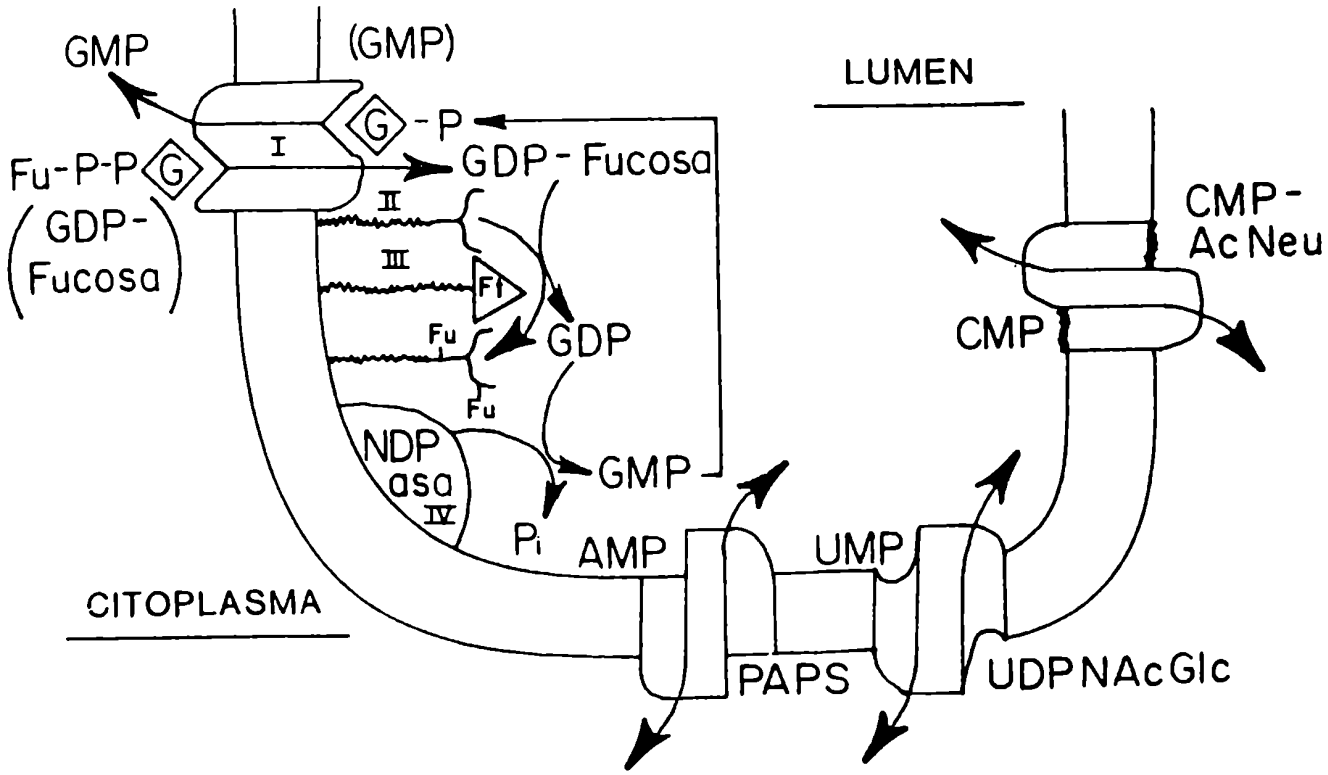
Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Tesis 1960

ej. 2

MECANISMO DE TRANSLOCACION DE NUCLEOTIDO AZUCARES Y NUCLEOTIDO SULFATO A TRAVES DE LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI



LIC. JUAN MIGUEL CAPASSO

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMO DE TRANSLOCACION DE NUCLEOTIDO AZUCARES Y NUCLEOTIDO SULFATO A TRAVES DE LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI

LIC. JUAN MIGUEL CAPASSO

Tesis Doctoral en Ciencias Químicas

Director de Tesis: Dr. Carlos Benjamín Hirschberg

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica
Saint Louis University, Saint Louis - Missouri (EE.UU.)

1985

a Diana, Damián y Ariadna

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos B. Hirschberg, en cuyo laboratorio se llevó a cabo este proyecto, por su constante apoyo, por la confianza que depositó en mí, por la continua y estimulante discusión científica, y por haberme brindado su amistad.

A la Lic. Diana M. Korchak, por la lectura crítica y corrección de esta tesis, y por el estímulo que me ha brindado durante toda mi carrera.

Al Dr. Julio M. Azcurra, en cuya cátedra me inicié en la investigación científica y en la docencia universitaria.

A la Sra. Mirta N. Torquati por su eficiencia y dedicación en la ímproba tarea de editar esta obra.

Y finalmente a todos mis familiares y amigos que de una forma u otra me han alentado continuamente.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AE: actividad específica de los compuestos radioactivos.
APS: adenosina 5'-fosfosulfato.
ASB: albúmina de suero bovino.
AT: atractilósido.
CAT: carboxiatractilósido.
CCFP: p(trifluorometoxi)-fenilhidrazona del dicianuro de carbonilo.
CMP-AcNeu = CMP-AS: citosina 5'-monofosfato ácido N-acetilneuramínico = citosina 5'-monofosfato ácido siálico.
CoA: coenzima A.
DIDS: 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2, 2'-diácido sulfónico.
EMR: endocitosis mediada por receptores.
GDP-F: guanosina 5'-difosfato fucosa.
GDP-M: guanosina 5'-difosfato manosa.
HPLC: cromatografía líquida de alta presión.
Ki: constante de inhibición.
KM: constante de Michaelis-Menten.
ME: microscopio o microscopía electrónico/a.
mg.P: miligramo de proteína.
N-AcGA: N-acetilglucosamina.
pal-CoA: palmitoil-coenzima A.
PAPS: adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato.
SDS: dodecil sulfato de sodio.
SITS: 4-acetamido-4'-isotiocianoestilbeno-2, 2'-diácido sulfónico.
UDP-gal: uridina 5'-difosfato galactosa.
UDP-glu: uridina 5'-difosfato glucosa.
UDP-N-AcGA: uridina 5'-difosfato N-acetilglucosamina.
Vmax: velocidad máxima de una reacción enzimática o de transporte.

INDICE

CAPITULO I: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El aparato de Golgi ... 1
Aspectos bioquímicos ... 1
Aspectos funcionales ... 4
Distribución de proteínas ... 4
Glicosilación de proteínas ... 5
Sulfatación ... 6
Precursores de la glicosilación y la sulfatación ... 7
OBJETIVOS ESPECIFICOS ... 8
Fig. I-1 ... 9

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

Compuestos químicos ... 10
Síntesis de [^{3}H]PAPS ... 10
Síntesis de [^{3}H]GDP-fucosa ... 11
Síntesis de [^{3}H]GMP ... 11
Purificación y topografía de vesículas derivadas del aparato de Golgi de hígado de rata ... 12
Determinaciones enzimáticas ... 12
Ensayo de translocación ... 13
Análisis de especies solubles radioactivas ... 14
Cromatografía líquida de alta presión ... 14
Electroforesis ... 15
Determinación de radioactividad ... 15
Cálculos ... 15
Tabla II-1 ... 17

CAPITULO III: TRANSPORTE DE PAPS A TRAVES DE LAS MEMBRANAS DEL APARATO DE GOLGI

INTRODUCCION ... 18
RESULTADOS:
Incubación de vesículas de Golgi con [^{35}S]PAPS ... 18
Análisis de los solutos que fueron translocados ... 19
Incubación de vesículas de Golgi con una mezcla de [^{35}S]PAPS y [adenina-8-^{3}H]PAPS ... 19
Caracterización del transporte de PAPS ... 20
DISCUSION ... 21
Tabla III-1 ... 23
Tabla III-2 ... 24
Tabla III-3 ... 25
Tabla III-4 ... 26
Tabla III-5 ... 27
Tabla III-6 ... 28
Fig. III-1 ... 29/30

CAPITULO IV: EFECTO PRODUCIDO POR NUCLEOTIDOS SOBRE EL TRANSPORTE DE NUCLEOTIDO AZUCARES Y PAPS
INTRODUCCION 31
RESULTADOS: 31
Efecto sobre la translocación de CMP—AS 31
Efecto sobre la translocación de GDP—F 32
Efecto sobre la translocación de PAPS 32
DISCUSION 33
Tabla IV-1 35
Tabla IV-2 36
Tabla IV-3 37
Fig. IV-1 ..... 38/39
Fig. IV-2 ..... 40/41
Fig. IV-3 ..... 42/43
Fig. IV-4 ..... 44/45
Fig. IV-5 ..... 46/47

CAPITULO V: EFECTOS PRODUCIDOS SOBRE LA TRANSLOCACION POR: ATRACTILOSIDOS, PALMITOIL COENZIMA A E INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ANIONES
INTRODUCCION 48
RESULTADOS:
Efecto de DIDS y SITS sobre la translocación 48
Características de la inhibición producida por DIDS 49
La sulfatación en las vesículas de Golgi es precedida por la translocación de PAPS 50
Efecto de palmitoil-CoA y atractilósidos sobre el transporte 50
DISCUSION 51
Tabla V-1 53
Tabla V-2 54
Tabla V-3 55
Tabla V-4 56
Tabla V-5 57
Fig. V-1 ..... 58/59

CAPITULO VI: MECANISMO DEL PROCESO DE TRANSPORTE A TRAVES DE LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI
INTRODUCCION 60
RESULTADOS: 60
La entrada de GDP—F parece ser concomitante a la salida de GMP 61
La salida de GMP depende específicamente de la entrada de GDP—F 61
Estequiometría entre la salida de GMP y la entrada de GDP—F 62
La salida de GMP de vesículas precargadas con GMP es específica 63
Evidencia preliminar acerca de la generalidad de este mecanismo 64
Efecto sobre la translocación de varios potenciales perturbadores 64

DISCUSION 65
Tabla VI-1 67
Tabla VI-2 68
Tabla VI-3 69
Fig. VI-1 .....70/71
Fig. VI-2 .....72/73
Fig. VI-3 .....74/75

CAPITULO VII
CONCLUSIONES 76
BIBLIOGRAFIA 80

CAPITULO I

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El aparato de Golgi:

La historia de esta organela celular, que fue descripta por Camilo Golgi (1) hace casi 90 años, es sumamente curiosa ya que durante más de 50 años fue el eje de una apasionada discusión entre diferentes escuelas de biólogos, aquella que afirmaba su existencia real y la que la negaba aduciendo que era un mero artefacto de la tinción utilizada para ponerlo de manifiesto al microscopio óptico (principalmente impregnación con sales de plata).

Recién con el advenimiento del microscopio electrónico a principios de la década del 50 la balanza comenzó a inclinarse hacia el lado de los que creían que era una verdadera estructura celular.

Una serie de trabajos pioneros de microscopía electrónica (2-5) no solamente probaron su existencia real, sino que comenzaron a delinear su compleja morfología. Actualmente el Golgi no sólo es universalmente reconocido, sino que una enorme masa de datos que se ha ido acumulando a lo largo de la última década, demuestra su papel en un gran número de complejas funciones de la fisiología celular.

El aparato de Golgi es una organela sumamente heterogénea cuyo número, tamaño y distribución varía ampliamente entre diferentes tipos de células.

Su estructura característica está dada por un número variable de sacos membranosos (cisternas) apilados estrechamente (seis en general), los mismos son normalmente redondeados, aplanados en el centro y con los bordes más dilatados, lo cual los asemeja en cierta forma a platos. La pila de cisternas a su vez está curvada, pudiéndose distinguir fácilmente una faz convexa (cis) normalmente cercana al retículo endoplasmático granular, y una faz cóncava (trans) orientada hacia la membrana plasmática o hacia el núcleo (6).

Este organoide ocupa una zona perfectamente definida (la región del Golgi) en la cual la matriz citoplasmática es más densa, y además está siempre asociada con una serie de otras estructuras membranosas, como ser: un gran número de vesículas de pequeño tamaño (lisas y cubiertas) especialmente en los bordes de las cisternas y vacuolas, lisosomas, etc. normalmente en la faz trans. En cambio nunca se encuentran en dicha zona otras estructuras típicas de la célula como: ribosomas, granos de glucógeno, mitocondrias, etc.

Por otra parte, las membranas que forman los sacos no son morfológicamente idénticas, siendo las del lado cis más finas, parecidas a las del retículo, y las del lado trans más gruesas, semejantes a la membrana plasmática.

Aspectos bioquímicos:

Una serie de técnicas fueron descriptas para aislar fracciones altamente enriquecidas en Golgi, principalmente a partir de hígado y riñón (7-9). La mayor parte de las mismas consisten en centrifugar las muestras a través de una serie de gradientes isopícnicos continuos y/o discontinuos, aunque últimamente ha empezado a utilizarse un sistema totalmente distinto basado en la electroforesis de flujo libre (free flow electrophoresis).

Normalmente todas las preparaciones obtenidas conservan intactas las características pilas de cisternas.

Estos procedimientos permitieron analizar bioquímicamente estas organelas, de esa forma se pudo demostrar que la composición lipídica de las membranas del Golgi es cuantitativamente diferente de la del retículo endoplasmático (ya que tiene más enfingomielina y menos fosfatidilcolina que ésta) y de la membrana plasmática (que tiene más colesterol y esfingomielina que la del Golgi) (10, 11).

También los patrones electroforéticos de las proteínas obtenidas en estas fracciones son característicos y diferentes de los de cualquier otra fracción de la célula (8 y de datos personales).

Con estas preparaciones pudo demostrarse que la actividad de ciertas enzimas como galactosil, sialil y fucosil transferasas (es decir las que catalizan el agregado de los azúcares terminales de las glicoproteínas) y las sulfotransferasas, son características del aparato de Golgi (8, 12) y por lo tanto constituyen excelentes marcadores enzimáticos del mismo.

También ha podido determinarse mediante diversas técnicas de ME (histoquímicas, inmunoquímicas y radioautográficas) que la distribución de la actividad de diferentes enzimas no es homogénea en todo el aparato de Golgi. Es decir la actividad varía de una cisterna a otra, y dentro de cada una de ellas, entre el centro y el borde o entre el interior y el exterior de la membrana.

Por ejemplo, las enzimas tiamina pirofosfatasa y fosfatasa ácida están restringidas a 1 o 2 cisternas de la faz trans del aparato de Golgi (13), mientras que la reducción de osmio se produce en 1 o 2 cisternas de la faz cis (14), y que tanto la actividad de 5'-nucleotidasa como la de adenilato ciclasa se distribuyen en todas las cisternas de la pila (15, 16), sin embargo estas enzimas se hallan concentradas en los bordes dilatados de cada cisterna, mientras que prácticamente desaparecen en el centro aplanado de las mismas.

La mayor parte de las enzimas estudiadas están asociadas a la membrana del aparato de Golgi, pero algunas otras como la fosfatasa ácida forman parte del contenido del mismo. Lo mismo ocurre con la orientación de los centros activos, en la mayor parte de los casos ésta es lumenal, en consecuencia los productos de la reacción se encuentran en el interior de las vesículas y la actividad es latente (es decir aumenta cuando las membranas son permeabilizadas con detergentes). Sin embargo en algunos pocos casos como es el de la adenilato ciclasa, el producto se ha localizado en el lado citoplasmático (16).

El tratamiento de las preparaciones de Golgi con compuestos que interactúan con hidratos de carbono complejos ha demostrado que todas las cisternas se tiñen, pero no homogéneamente sino en forma creciente desde el lado cis hacia el trans (17). Esto último es un reflejo de que el procesamiento de las glicoproteínas es secuencial (ver más adelante) y que la adición de los azúcares se realiza en distintas cisternas del aparato de Golgi debido a la distribución diferencial de las enzimas correspondientes.

De acuerdo a la misma podemos distinguir por lo menos tres compartimentos, cada uno formado por unas pocas cisternas: uno cis donde se adicionan ácidos grasos a las proteínas (18), uno medio donde se encuentra la N-acetilglucosamina transferasa I (19) y finalmente uno trans donde se encuentran la galactosil y sialil transferasas (20).

Incluso se ha conseguido la separación física de alguna de estas actividades enzimáticas. Por ejemplo, mediante centrifugación en gradientes continuos de Percoll se ha podido subfraccionar una preparación de Golgi en dos fracciones, una de las cuales está enriquecida en la enzima N-acetilglucosaminil fosfodiesterasa (ver más adelante), la otra lo está en la N-acetilglucosamina 1-fosfotransferasa y sugerentemente en α-1,2 manosidasa que remueve las primeras manosas durante el procesamiento (21).

Resumiendo, los resultados descriptos anteriormente demuestran la existencia de una especialización entre los componentes del aparato de Golgi, no sólo a lo largo de la pila de cisternas sino también dentro de cada una de ellas. El significado funcional de esta compleja arquitectura recién empieza a ser entendido en algunos casos, como por ejemplo en el de la glicosilación.

Dos teorías se han propuesto para explicar esta organización heterogénea, una de ellas propone que el sistema como un todo es dinámico, es decir que continuamente se van formando cisternas nuevas en el lado cis del Golgi mientras que las del lado trans se van fragmentando en una multitud de pequeñas vesículas. A medida que las cisternas progresan a lo largo de la pila, no solamente transportan su contenido, sino que sufren una extensa reorganización en cuanto a la composición de la membrana y a la represión y activación de diversos grupos de enzimas. En base a esta teoría es que se han acuñado términos como "en formación" o "de entrada" para referirse al lado cis, y "maduro" o "de salida" para el lado trans.

La otra teoría, en cambio, es estática; postulando que las cisternas no se mueven a lo largo de la pila y que cada una mantiene sus características permanentemente. Precisamente esta última teoría es la que actualmente se considera más cercana a la realidad, ya que por ejemplo no existe ninguna evidencia experimental que soporte la existencia de cambios tan radicales en las membranas como lo requiere la teoría dinámica, o por lo menos, no a la gran velocidad con que los productos se mueven a través del Golgi (en el orden de los 15 a 20 min.).

Sin embargo, precisamente la teoría estática plantea el problema de cómo se produce este movimiento de los productos que son procesados secuencialmente en las distintas cisternas.

También en este caso se han propuesto dos teorías, una de las cuales postula una conexión directa entre cisternas contiguas a través de tubos membranosos contorneados. La otra propone un sistema disociativo, es decir que el transporte se realiza mediante pequeñas vesículas que continuamente brotan de las cisternas para fusionarse posteriormente con otras de la misma u otra pila.

Es de destacar que debido a que las imágenes obtenidas con el ME son bidimensionales es imposible zanjar esta cuestión por criterios puramente morfológicos. Sin embargo una serie de elegantes experimentos recientemente realizados por Rothman y col. (22, 23) parecen probar que efectivamente el proceso es disociativo.

Estos experimentos se basan en la complementación entre dos poblaciones distintas de Golgi para llevar a cabo la glicosilación completa de una proteína, cosa que no pueden hacer por separado, ya que una de las fracciones proviene de una mutante deficiente en transferasas terminales y la otra de una deficiente en una enzima clave del proceso de glicosilación (ver más adelante), la N-acetilglucosamina transferasa I.

Resumiendo, la visión actual que se tiene del Golgi es que cada una de las cisternas que lo forman (o grupo de ellas) tienen y mantienen una serie de características particulares (actividad enzimática, composición de la membrana, etc.) y que los productos son transportados, o bien en el lumen o bien formando parte de la membrana (si son proteínas intrínsecas), en pequeñas vesículas que continuamente brotan de y se fusionan con sitios específicos de las cisternas. Especialmente parecen cumplir un importante papel en este proceso las vesículas cubiertas por una especie de enrejado de clatrina.

De todo lo antedicho se desprende que el Golgi es también muy activo en el reciclado de membranas, desde éste hacia el retículo, lisosomas, membrana plasmática, endosomas, etc. y viceversa. Sin embargo la vectorialidad del proceso de exportación se mantiene inalterable.

Aspectos funcionales:

El aparato de Golgi puede verse como una planta procesadora y exportadora de múltiples productos, como consecuencia de lo cual se llevan a cabo en el mismo un número muy grande de funciones.

Sin embargo éstas pueden agruparse en dos grandes conjuntos:

En el primero de los cuales pueden citarse la concentración, empaquetamiento y distribución de productos.

En el segundo, toda una serie de reacciones que modifican a los productos, algunos de los cuales son: remoción de ciertos azúcares de las glicoproteínas (24, 25), glicosilación de proteínas (26, 27) y de glicolípidos como cerebrósidos y gangliósidos (28, 29), como así también sulfatación de proteoglicanos (30, 31), de glicoproteínas (30), de glicolípidos (29), de hormonas esteroides (32) y posiblemente de algunos neuropéptidos.

Procesamiento proteolítico de ciertas proteínas, como por ejemplo la conversión de proinsulina a insulina (33) y la de proparatohormona a paratohormona (34).

Fosforilación de proteínas, ya que recientemente hemos descubierto la presencia de por lo menos una proteinquinasa específica del aparato de Golgi (35).

Adición de ácidos grasos a ciertas proteínas (18), etc.

Distribución de proteínas:

Como se ha mencionado más arriba, el aparato de Golgi es capaz de concentrar varios cientos de veces ciertas proteínas en regiones específicas del borde de las cisternas trans, las cuales son posteriormente empacadas en pequeñas vesículas secretoras que pueden fusionarse con la membrana plasmática para descargar su contenido por exocitosis, o bien fusionarse para formar un gránulo de secreción propiamente dicho, según el tipo de célula.

El mecanismo por el cual se produce este proceso es casi desconocido, lo único que se sabe es que no requiere energía (36) y que la concentración da lugar a la formación de agregados osmóticamente inactivos, ya sea por cristalización (37) o por interacción electrostática con otras moléculas de carga opuesta (38).

Por otra parte uno de los problemas fundamentales que debe enfrentar un organoide con las funciones del Golgi es el de la distribución, en otras palabras, como acumular en una pequeña región una o unas pocas clases de moléculas y enviarlas al sitio correcto dentro o fuera de la célula donde cumplirán sus funciones específicas.

Unicamente en el caso de las enzimas lisosomales ha comenzado a entenderse parcialmente como se produce este fenómeno, especialmente gracias a los trabajos del grupo de Kornfeld (39, 40). Durante el procesamiento estas enzimas, que son glicoproteínas, reciben una marca especial que consiste en la fosforilación de un residuo de manosa en la posición 6 a través de un mecanismo bastante indirecto, ya que primero se produce la muy inusual transferencia de un residuo de N-acetilglucosamina fosfato a una manosa por acción de la enzima N-acetilglucosamina 1-fosfotransferasa, y luego el azúcar es removido por la enzima α-N-acetilglucosaminil fosfodiesterasa, dejando de esta forma expuesta la manosa 6-fosfato.

Probablemente, aunque no está probado, la transferasa reconoce alguna secuencia de aminoácidos, o alguna estructura tridimensional que es característica de las enzimas lisosomales, ya que ob-

viamente no todas las glicoproteínas son substrato de esa enzima.

El proceso siguiente sería en este caso similar al de la endocitosis mediada por receptores (EMR), es decir las proteínas marcadas con manosa 6-fosfato interactuarían con receptores específicos agrupados en una zona de la faz lumenal de la membrana de una cisterna trans, posteriormente esa zona se desprendería en forma de vesícula lisa o cubierta y se fusionaría con el lisosoma, en el mismo las proteínas se despegarían de los receptores por la acidificación del medio. Las membranas con los receptores descargados serían finalmente recicladas al Golgi, siempre en forma de vesículas.

Es posible que un cierto porcentaje de las enzimas lisosomales fueran dirigidas por error al exterior de la célula, pero incluso en este caso terminarían en el lisosoma por EMR debido a que la membrana plasmática tiene receptores de manosa 6-fosfato, y por otra parte si llegaran asociadas a receptores no se liberarían debido a que el pH del medio extracelular es neutro.

Es de destacar que estas enzimas son activadas por proteólisis en el lisosoma, siendo por lo tanto inactivas mientras son distribuidas.

En apoyo de lo expuesto anteriormente, puede citarse que se ha comprobado que ciertas enfermedades, caracterizadas por la ausencia de hidrolasas en los lisosomas, se deben o bien a la ausencia de manosa 6-fosfato en las mismas, o bien a defectos en los receptores que deben reconocerla, en ambos casos las enzimas son exportadas al fluído extracelular. En el primero de los casos el defecto puede ser corregido, por lo menos en cultivos celulares, por la adición al medio de enzimas extrínsecas apropiadamente marcadas con manosa 6-fosfato.

Glicosilación de proteínas:

Todas, o por lo menos la abrumadora mayoría de las proteínas que son sintetizadas en ribosomas pegados a membrana, son glicosiladas por la unión de oligosacáridos a ciertos aminoácidos.

Uno de los tipos de unión, el menos generalizado y que involucra oligosacáridos más chicos, es del tipo O-glicosídica y se realiza con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina, treonina o hidroxilisina. Este proceso no ha sido muy estudiado pero se sabe que se produce en el Golgi.

El otro tipo es mucho más común, donde la unión N-glicosídica se produce con el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de asparagina, cuando éste forma parte de las secuencias: asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina (donde X representa cualquier aminoácido). Es de destacar que estas dos secuencias se encuentran con mucha menos frecuencia en las glicoproteínas que en las proteínas citoplasmáticas (no glicosiladas).

Se sabe que el aparato de Golgi está involucrado en la glicosilación de diversas moléculas desde hace unos 20 años, debido a trabajos de radioautografía al ME (41), posteriormente se comprobó utilizando las mismas técnicas, que el sistema es más complejo ya que algunas hexosas que fueron llamadas proximales (por ejemplo manosa) son incorporadas en el retículo endoplasmático (42, 43) y otras terminales (como fucosa, galactosa y ácido siálico) en el Golgi (26). Esto también ha sido comprobado in-vivo mediante pulsos de azúcares radioactivos y posterior fraccionamiento subcelular, lo que también ha permitido estudiar la cinética de glicosilación (44).

Actualmente se considera que la compleja reacción de glicosilación es la siguiente:

a) Síntesis del oligosacárido activado rico en manosa, ésta se produce por la adición secuencial a una molécula de dolicol fosfato (lípido descubierto en el laboratorio del Dr. Leloir) de dos moléculas de N-AcGA a partir de UDP-N-AcGA (45), de forma que la primera de ellas forma una unión pirofosfato con el dolicol, y luego de nueve manosas y tres glucosas.

El sitio donde se produce la síntesis no está totalmente determinado (lado interior o exterior de la membrana), aunque es evidente que parte de la misma y el producto final se encuentran en el lumen del retículo (46, 47).

b) Transferencia en bloque del oligosacárido del dolicol fosfato a una asparagina de la cadena naciente de una proteína, originando una glicoproteína rica en manosa (figura I-1), la cual es sensible a la glicosidasa H. Esto se produce en el lado lumenal de la membrana del retículo (48).

c) Remoción de las tres glucosas en el retículo (45).

Todo el resto del procesamiento se realiza en el aparato de Golgi (45).

d) Remoción de las manosas número 4, 7, 8 y 9 (ver figura I-1) por la acción de una α-D-manosidasa.

e) Adición de la N-AcGA número 3 a la manosa número 2 por acción de la enzima N-acetilglucosamina transferasa I. Es importante señalar que si no se produce esta unión, el procesamiento queda interrumpido.

f) Remoción de las manosas 5 y 6 y adición de las N-AcGA 4 y 5 por acción de la enzima N-AcGA transferasa II.

g) Adición de fucosa a la N-AcGA número 1 y de galactosa a las N-AcGA 3, 4 y 5 por acción de fucosil y galactosil transferasas.

h) Por último, adición de ácido siálico a las galactosas debido a la actividad de sialiltransferasas.

De esta forma se ha obtenido una proteína ligada a un oligosacárido complejo, el cual es resistente a la endoglicosidasa H y puede ser exportada.

Sulfatación:

Como se ha manifestado anteriormente una larga serie de compuestos son sulfatados en el aparato de Golgi. Uno de los procesos más activos que se producen en esta organela es probablemente la síntesis y procesamiento de los proteoglicanos.

Estas enormes moléculas (con un peso molecular de varios millones de daltons); que están involucrados en importantes funciones celulares como migración celular, proliferación, morfogénesis, expresión génica, etc.; están formadas en más de un 90% por hidratos de carbono.

El primer paso en su síntesis es el ensamblado de los glicosaminoglicanos, que son largas cadenas lineales de disacáridos repetitivos, por ejemplo, uno típico del hígado es la heparina que está formada por el disacárido (ácido D-glucurónico – N-Ac-D-glucosamina)$_n$.

Estos polisacáridos son posteriormente modificados por sulfatación y epimerización, en el caso de la heparina, de dos a tres grupos sulfatos son unidos covalentemente a cada disacárido, y algunos de los residuos de ácido glucurónico son epimerizados a ácido-L-idurónico.

Finalmente una gran cantidad de estos polianiones (en el orden de 100 o más) son unidos covalentemente al grupo hidroxilo de una serina de la proteína central, que es normalmente de alto peso molecular (aproximadamente 200.000 daltons) y rica en serina, a través de un trisacárido específico quedando la unión formada del siguiente modo:

serina – xilosa – galactosa - galactosa – (disacárido)$_n$ (27).

Precursores de la glicosilación y la sulfatación:

Los substratos de las enzimas glicosil y sulfato transferasas no son ni los azúcares ni el sulfato, sino una forma activada de los mismos. Estas moléculas donantes ricas en energía son los nucleótido azúcares (GDP-F, GDP-M, UDP-gal, UDP-glu, UDP-N-AcGA y CMP-AcNeu) y nucleótido sulfato (PAPS), ya sea directamente, como ocurre en la mayoría de los casos; o indirectamente, como es el caso de la adición de las tres glucosas y de algunas de las manosas en el retículo endoplasmático, que se produce vía la síntesis previa de dolicol fosfato glucosa y dolicol fosfato manosa.

Todos los nucleótidos derivados son sintetizados en diferentes partes de la célula y distintas del aparato de Golgi. Por ejemplo GDP-F, GDP-M, UDP-glu y PAPS son sintetizados en el citoplasma (49, 50) y CMP-AcNeu en el núcleo (49).

Todas estas moléculas, precisamente por tener una parte nucleotídica, están cargadas negativamente a pH fisiológico, tienen un peso molecular relativamente elevado y son sumamente hidrofílicas. En consecuencia se plantean dos problemas muy importantes:

a) Cómo hacen los nucleótidos derivados para atravesar la membrana del Golgi, la cual por sus propiedades hidrofóbicas debe serles impermeable, para ponerse en contacto con las transferasas, las cuales tienen su centro activo en el lado lumenal.

b) Cómo hacen los nucleótidos producidos durante las reacciones de glicosilación y sulfatación para abandonar el Golgi atravesando la membrana en sentido inverso y evitar una acumulación continuamente creciente de los mismos, perjudicial para la célula, no sólo por secuestrar una gran cantidad de moléculas imprescindibles para el metabolismo, sino principalmente por el efecto inhibitorio que éstas producirían sobre la actividad de las enzimas antes mencionadas.

El primero de los problemas ha empezado a ser solucionado mediante los resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio, primero con fracciones microsomales de hígado de ratón (51) y luego en preparaciones altamente purificadas de Golgi de hígado de rata (52), que sugieren la existencia de mecanismos de translocación de por lo menos CMP-AcNeu y GDP-F en la membrana de esta organela.

Objetivos Específicos

Los objetivos que se propone alcanzar y los interrogantes que se propone elucidar el proyecto de investigación cuyos resultados se exponen en esta tesis son los siguientes:

a) Demostrar la existencia de un mecanismo de translocación para el sulfato activado (PAPS), ya que si bien es una molécula análoga desde el punto de vista funcional a los nucleótido azúcares, es diferente desde el punto de vista químico en varios aspectos, como es la presencia de un grupo fosfato en la posición 3' de la ribosa y que la base nitrogenada es adenina (ninguno de los nucleótido azúcares es un derivado del ATP).

Además, generalizar el fenómeno de transporte a través de la membrana del aparato de Golgi a otros nucleótido azúcares y nucleótidos.

b) Establecer que la translocación de nucleótido derivados es de significativa importancia in-vivo, y que la misma es un paso previo imprescindible y diferente al de la glicosilación y/o sulfatación.

c) ¿Es el fenómeno de translocación producido a través de proteínas transportadoras?, y de ser así ¿existe un solo tipo de transportador o por el contrario, cada nucleótido derivado tiene un transportador específico?

d) Determinar las características estructurales de los nucleótido derivados requeridos por los presuntos transportadores para que se produzca la translocación.

e) ¿Qué parte de la molécula lleva la información necesaria (el nucleótido o el azúcar) para que la misma se lleve a cabo?

f) Estudiar el efecto que producen sobre el proceso de transporte diversas moléculas análogas a los substratos.

g) Explorar la posibilidad de que inhibidores conocidos de otros sistemas de transporte de aniones sean también efectivos sobre el proceso estudiado.

h) ¿Es el transporte dependiente de una fuente de energía, ya sea directamente por hidrólisis de ATP o indirectamente por producirse a favor de gradientes electroquímicos?

i) ¿Cuál es exactamente el mecanismo por el cual se produce el transporte?

j) ¿Cómo abandonan el lumen del aparato de Golgi los nucleótidos que son producidos durante las reacciones catalizadas por las transferasas?

k) Determinar cuales son las estrategias más adecuadas para identificar y purificar el o los presuntos transportadores.

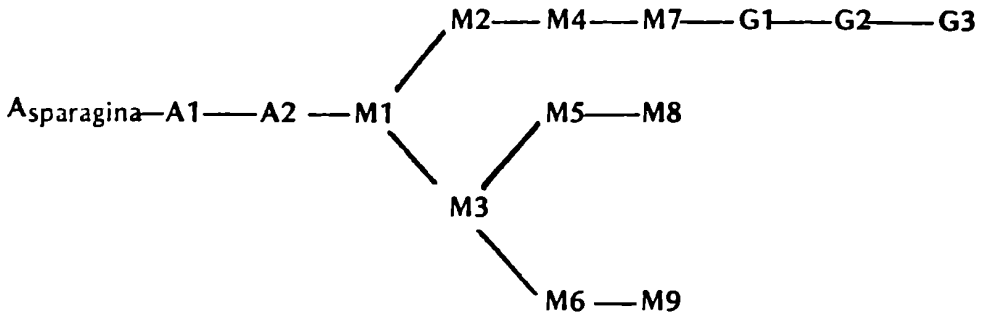
l) Establecer si el sistema de transporte de nucleótido azúcares es específico del aparato de Golgi o existe en otras estructuras membranosas de la célula.

m) ¿Constituye el proceso de transporte de nucleótido derivados un paso de regulación en la biosíntesis y/o distribución de proteoglicanos, glicoproteínas, sulfoproteínas y glicolípidos?

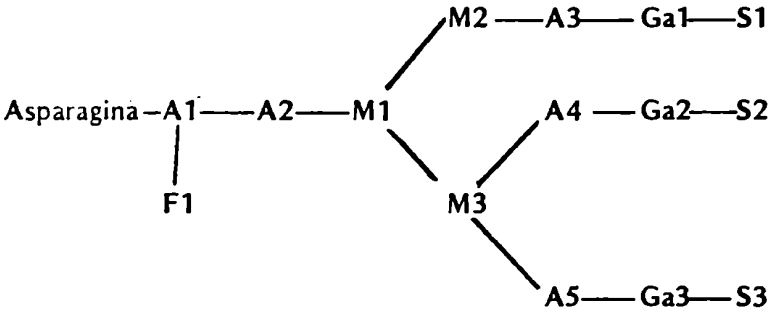
Parte de los resultados que se exponen a continuación han sido presentados en las siguientes reuniones científicas: Gordon's Conference (1984), Annual Meeting of the American Society of Biological Chemists (San Francisco, 1983 y Saint Louis, 1984), Annual Meetings of the American Society for Cell Biology (San Antonio, 1983 y Kansas City, 1984) y/o fueron publicados (53-60).

FIGURA I–1

GLICOPROTEINA RICA EN MANOSA



GLICOPROTEINA COMPLEJA



Estructura de los oligosacáridos que forman parte de una glicoproteína recientemente sintetizada (rica en manosa) y de una madura (compleja), la primera es sensible a la acción de la enzima endoglicosidasa H mientras que la segunda es resistente a la misma.

La simbología utilizada es la siguiente: A = N-acetilglucosamina, M = manosa, G = glucosa, Ga = galactosa, S = ácido siálico y F = fucosa. Los números son puramente explicativos y no tienen ningún significado trascendente.

Las líneas entre los azúcares representan uniones glicosídicas de diversos tipos, por ejemplo la unión entre las galactosas y las N–AcGA (3 a 5), de la manosa 1 con la N–AcGA 2, la de ésta con la N–AcGA 1 y la de la N–AcGA 5 con la manosa 3 son β–1,4. La unión entre N–AcGA 3 y 4 con las manosas 2 y 3 es β–1,2. Entre la manosa 2 y la manosa 1 es α–1,3. Entre la manosa 3 y la manosa 1 y entre la fucosa 1 y la N–AcGA 1 son α–1,6. Finalmente entre los residuos de ácido siálico y los de galactosa las uniones son α–2,3.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

Compuestos químicos:

Las siguientes moléculas radioactivas fueron provistas por New England Nuclear: [^{35}S] PAPS (1,3 y 1,9 Ci/mmol), [^{35} S] SO_4Na_2 (805 mCi/mmol), [adenina-2, 8-^{3}H] ATP (28 Ci/mmol), CMP-[^{14}C]AcNeu (1,6 mCi/mmol), CMP-[9-^{3}H]AcNeu (18,9 Ci/mmol), [guanidina-8-^{3}H] GTP (22 Ci/mmol), UDP-[^{14}C]N-AcGA (306 mCi/mmol), [metoxi-^{3}H] inulina (2,5 Ci/mmol), 2-[deoxi-D-G-^{3}H] glucosa (10 Ci/mmol), GDP-L-[1-^{14}C] fucosa (192 mCi/mmol y 264 mCi/mmol), GDP-[^{14}C] manosa (310 mCi/mmol); o por Amersham: GDP-L-[^{14} C] fucosa (18 mCi/mmol), [U-^{14} C] CMP (375 mCi/mmol) y [U-^{14} C] UMP (484 mCi/mmol).

Otros compuestos radioactivos como [guanidina-8-^{3}H]GDP-fucosa (667 mCi/mmol), [guanidina-8-^{3}H] GMP (22 Ci/mmol) y [adenina-2, 8-^{3}H] PAPS (870 mCi/mmol) fueron sintetizados como se describe más adelante. El nucleótido azúcar [5, 6-^{3}H] UDP-N-AcGA (333 mCi/mmol) fue una generosa donación de la Dra. Mary Perez (Universidad de Saint Louis) y fue sintetizado como se describió (61).

Todos los nucleótidos y sus derivados fueron adquiridos en Sigma con la excepción de GDP-fucosa que fue generosamente donada por los Dres. M. Hayes y R. Barker de la Universidad de Cornell.

El resto de los compuestos químicos utilizados fueron del máximo grado de pureza y se adquirieron en: Sigma, Fisher, Aldrich, Pierce y Boehringer.

Síntesis de [^{3}H] PAPS:

La síntesis de PAPS marcado en la parte nucleotídica se hizo mediante una fracción enzimática obtenida de hígado de rata como está descripto por Singer (62).

Brevemente, el pellet proteico obtenido entre 34% y 46% de saturación con sulfato de amonio fue resuspendido en 34 ml de una solución que contenía: Cl_2Mg (4 mM), ATP (7 mM), CTP (10 mM) e imidazol (20 mM), pH 8,1.

A 0,1 ml de esta suspensión le fueron agregados 0,65 mCi de [^{3}H]ATP y la incubación se llevó a cabo durante 2 hs a 37° C. La misma se detuvo poniendo la muestra en agua hirviendo por 2 min, se diluyó con 0,9 ml de agua destilada y se centrifugó a 11.000 x g.

Al sobrenadante se le agregó como trazador 0,045 μCi de [^{35}S] PAPS y se aplicó a una columna de Dowex 1-Cl (1 x 4 cm), ésta fue eluída con: 300 ml de 1 mM Tris-ClH (pH 8,7), 600 ml de 0,3 M ClNa en 1 mM Tris-ClH (pH 8,7) y un gradiente lineal de 0,3 M a 1,1 M ClNa en el mismo buffer (1 litro).

El pico con doble marca fue coleccionado, concentrado bajo presión reducida y desalado por cromatografía en una columna (1,5 x 40 cm) de Sephadex G-10.

Las fracciones que contenían ^{35}S y ^{3}H se juntaron, liofilizaron y se resuspendieron en agua destilada. El nucleótido sulfato fue almacenado en etanol: agua (1:1) a −20° C.

El presunto [^{3}H]PAPS comigró con PAPS estándar cuando fue analizado mediante los siguientes sistema cromatográficos: papel Whatman DE-81, eluído en forma descendente con 0,1 M fosfato de

potasio pH 6, capa delgada de polietileneimina-celulosa (Brinkman), eluído con 1 M de ClLi, en columnas de ECTEOLA (Sigma) y por HPLC como se describe más adelante.

Después de tratar una alícuota de la preparación con fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* (tipo III de Sigma), la radioactividad comigró con APS estándar cuando se cromatografió en papel DE-81.

Cuando se trató con 0,1 N ClH a 37°C durante 1 h y se analizó por cromatografía en papel DE-81 y en ECTEOLA la radioactividad comigró con 3', 5'–ADP.

Síntesis de [^{3}H]GDP-fucosa:

GDP–F marcada en la parte guanidílica fue preparada por síntesis enzimática de acuerdo al procedimiento de J. A. Munro y H. Schachter (comunicación personal).

Con ese fin la enzima GDP–F pirofosforilasa fue parcialmente purificada a partir de hígado de cerdo como está descripto (52).

La mezcla de reacción estaba compuesta por: fucosa 1-fosfato (0,67 mM), Cl_2Mg (5 mM), FNa (10 mM), 0,5 mCi [^{3}H] GTP (0,5 mM), Tris-ClH (50 mM) pH 7,5 y 0,6 ml de la preparación de enzima en un volumen total de 1 ml. La incubación se llevó a cabo durante 2 hs a 37°C y se detuvo mediante la adición de 2 ml de etanol a –20° C y centrifugación por 15 min a 23.000 x g. El sobrenadante fue evaporado bajo presión reducida y el residuo fue resuspendido en 10 ml de agua destilada, trazas de GDP–[^{14}C] F (10^5 dpm) fueron agregadas y la solución fue cargada en una columna de DEAE-celulosa (1,5 x 40 cm).

La elución se hizo con 500 ml de 5 mM Bicarbonato de trietilamonio pH 7,8 y posteriormente con un gradiente lineal de 5 mM a 300 mM del mismo buffer (1 litro).

El pico marcado con ^{3}H y ^{14}C fue coleccionado, liofilizado y resuspendido como se describió para PAPS.

El compuesto sintetizado comigra con GDP-F estándar en los siguientes sistemas cromatográficos: papel Whatman 3M, eluído con etanol: acetato de amonio (1 M pH 7,5) (3:2); capa delgada de PEI-celulosa, eluído con 0,2 M de bicarbonato de amonio y análisis con HPLC.

La fucosa 1-fosfato utilizada en la reacción anterior se obtuvo por degradación enzimática de GDP-F no radioactiva con la nucleótido pirofosfatasa de *Crotalus adamanteus* y purificada por cromatografía en papel DE-81, eluída con formato de amonio (0,2 M pH 7,5): etanol (7:3).

Cuando la presunta [^{3}H] GDP-F sintetizada se degradó como se describe en el párrafo anterior, toda la radioactividad comigró con GMP estándar en PEI-celulosa y HPLC.

Síntesis de [^{3}H] GMP:

Este nucleótido fue obtenido por digestión de [^{3}H] GTP con apirasa (Sigma) en las condiciones recomendadas por los fabricantes, aprovechando que esta enzima tiene una alta actividad como nucleotidil tri y difosfatasa pero es casi inactiva como nucleotidilmonofosfatasa. La cantidad de enzima y el tiempo de incubación utilizados fueron optimizados previamente mediante ensayos piloto.

La reacción se paró y el producto deseado se purificó como se describe para [^{3}H] GDP-F. La pureza del mismo se verificó mediante cromatografía en capa delgada de PEI-celulosa, eluído con 0,2 M de bicarbonato de amonio y con análisis por HPLC.

Purificación y topografía de vesículas derivadas del aparato de Golgi de hígado de rata

Las vesículas fueron preparadas según el método de Leelavathi y col. (9). Resumiendo, tres hígados de ratas adultas jóvenes fueron homogeneizados con 4 volúmenes de una solución formada por: 0,25 M sacarosa, 0,1 M fosfato de potasio pH 6,65, 5 mM Cl_2Mg, y se obtuvo un sobrenadante postnuclear mediante centrifugación a 1.000 x g durante 10 min a 4°C (todas las operaciones fueron realizadas a esa temperatura).

Este sobrenadante fue cargado en 6 tubos del rotor SW-28 (Beckman) sobre un colchón de 1,3 M sacarosa en el mismo buffer (12 ml) y centrifugado durante 1 hora a 27.000 RPM.

El material depositado en la interfase 1,3/0,25 M sacarosa fue recuperado y su densidad ajustada a 1,1 M sacarosa, con 2,6 M sacarosa, utilizando un refractómetro. Esta solución fue cargada en 2 tubos de SW-28 encima de 1,3 M y por debajo de 0,25 M sacarosa y centrifugada a 27.000 RPM por 1 hora.

La capa formada en la interfase 1,1/0,25 M sacarosa fue recuperada, diluída 20 veces con STM (0,25 M sacarosa, 1 mM Cl_2 Mg, 10 mM Tris-ClH pH 7,5) y las vesículas precipitadas por centrifugación a 35.000 RPM por 45 min en un rotor T-35 (Beckman). Luego fueron resuspendidas en 10 ml de STM y utilizadas inmediatamente o almacenadas a –80°C después de agregar 10 mg de ASB/ml. En estas condiciones conservan su actividad de transporte intacta durante por lo menos 3 meses.

La pureza de la fracción se verificó la primera vez por microscopía electrónica y rutinariamente utilizando marcadores enzimáticos (ver más adelante).

La fracción obtenida de esa forma (40 a 50 mg de proteínas) estuvo enriquecida 37 veces en la actividad de sialiltransferasa (16 % de la actividad total) y 2,2 veces en la de NADH citocromo c reductasa (0,9% del total), con respecto a las actividades específicas de las mismas en el homogenato inicial.

Que las vesículas estuviesen selladas y con la misma topografía que in-vivo se verificó por dos métodos:

a) latencia de la actividad de neuraminidasa exógena cuando ésta es agregada a vesículas premarcadas con CMP-[^{3}H] AcNeu.

b) latencia de actividad de sialiltransferasa medida con aceptor exógeno.

En ambos casos el índice de latencia fue igual a 0,95 y está definido como $L = (Ac^+T - Ac^-T)/Ac^+T$, donde Ac^+T y Ac^-T representan la actividad enzimática medida en presencia y ausencia de Tritón X-100 respectivamente.

Determinaciones enzimáticas:

La actividad de sialiltransferasa (marcadora específica del aparato de Golgi) fue medida como está descripto (63). La mezcla de reacción tuvo en un volumen total de 0,2 ml: 16 mM fosfato de sodio pH 7,5, 50 mM ClNa, 78 μM CMP–[^{14}C]Ac Neu (55.500 dpm), 0,5 mg de asialofetuína (preparada por hidrólisis ácida de fetuína Sigma), en presencia o ausencia de 0,1% de Tritón X-100 y con 25 μg de proteína de vesículas de Golgi o con 1 mg de proteína del homogenato total.

Después de incubar a 37°C durante 1 hora la reacción fue parada por la adición de 1 ml de una solución fría compuesta por 1 % ácido fosfotúngstico y 0,5 N ClH e inmersión en hielo durante 15 min. La suspensión fue posteriormente centrifugada en una microcentrífuga (Eppendorf) por 1 min, el pellet fue sometido a tres ciclos de resuspensión en la misma solución y centrifugación, luego fue

lavado superficialmente con agua y resuspendido en 0,5 ml de 1 N OHNa. Esta solución fue acidificada con 0,5 ml de 1,2 N ClH y contada con 9 ml de Aquasol-2.

La actividad de la NADH citocromo c reductasa (marcadora del retículo endoplasmático) fue medida en presencia de cianuro de potasio en forma cinética, registrando el aumento de densidad óptica a 550 nm en función del tiempo, exactamente como está descripto (64).

Para medir la actividad de neuraminidasa, 1 ml de vesículas de Golgi (1 mg.P) fueron marcadas con CMP–[^{3}H]AcNeu y procesadas como se describe para los ensayos de penetración. El pellet fue luego cuidadosamente resuspendido en 1 ml de STM y alícuotas de esa suspensión (100 μl) fueron tratadas en un volumen total de 165 μl, en presencia y ausencia de 0,1 % Tritón X-100 con 15 x 10^{-3} unidades de neuraminidasa (tipo IV de Sigma) durante 30 min a 30°C. Posteriormente se procesaron y cuantificaron como se describe para la sialiltransferasa.

La determinación de proteínas se hizo en presencia de 1% SDS por el método de Peterson (65), el cual es una modificación del método de Lowry para muestras que contienen estructuras membranosas, usando ASB como estándar.

Ensayo de translocación:

Todos los ensayos se hicieron en tubos del rotor Ti-50 (Beckman) en un volumen total de 1 ml.

El medio de incubación utilizado en los experimentos descriptos en el capítulo III estuvo compuesto por: 0,15 M ClK, 10 mM Tris-Cl pH 7,5, 1 mM Cl_2Mg, 10 mM FNa y 0,5 mM 2,3-dimercaptopropanol. En el resto de los experimentos el ClK fue suplantado por 0,25 M sacarosa y la concentración de Tris fue aumentada a 50 mM (pH 7,5).

Los compuestos radioactivos fueron secados bajo una corriente de nitrógeno y solubilizados en el medio de incubación. Todas las soluciones patrón de los compuestos que fueron utilizados en distintos experimentos fueron también hechas en dicho buffer y su concentración fue ajustada por espectrofotometría.

El ensayo fue iniciado normalmente por la adición de 100 μl de la preparación de vesículas (0,35 a 0,6 mg. P) excepto en los casos en que éstas fueron pretratadas con algún compuesto, en cuyo caso se inició por la adición de 100 μl de la molécula radioactiva. La concentración final de las mismas, exceptuando cuando se indica lo contrario en el texto, fueron:

2 μM CMP–[^{3}H]AcNeu (0,12 μCi/nmol), 0,8 μM [^{35}S]PAPS (0,5 μCi/nmol)

6 μM GDP–[^{14}C]F (0,02 μCi/nmol, experimentos descriptos en el capítulo V)

y 2 μM GDP–[^{14}C]F (0,1 μCi/nmol, en el resto de los experimentos).

Las muestras fueron incubadas a 25°C o en hielo durante 10 min, exceptuando cuando se indica otra cosa, y la reacción se detuvo por enfriamiento e inmediata centrifugación a 40.000 RPM por 30 min en el rotor Ti-50.

Alícuotas del sobrenadante fueron reservadas para calcular la concentración de solutos radioactivos en el medio de incubación ($[S_m]$). La superficie del pellet y las paredes del tubo fueron lavadas 3 veces con 1,5 ml de TKM (10 mM Tris-ClH pH 7,5, 0,15 M ClK, 1 mM Cl_2 Mg). Posteriormente se agregaron 0,5 ml de agua destilada, las muestras fueron congeladas a –20°C y sometidas durante 30 min en cuarto frío a la acción de un sonicador (Heat Systems Ultrasonic). Luego fueron transferidas con pipeta Pasteur a tubos cónicos de 1,5 ml, siendo las macromoléculas precipitadas en frío con 0,5 ml de 8% ácido perclórico y centrifugación a 11.000 x g por 5 min. Alícuotas de 0,8 ml del sobre-

nadante se utilizaron para calcular la cantidad de solutos radioactivos que estuvieron asociados con las vesículas (dentro y entre ellas, S_t).

Cuando las muestras fueron usadas para hacer un análisis químico de los solutos radioactivos translocados al Golgi, las macromoléculas fueron precipitadas con 1 ml de etanol en lugar del ácido perclórico.

Para determinar la cantidad de radioactividad incorporada a macromoléculas (insoluble en ácido, Ins) el pellet fue lavado 3 veces con 1,5 ml de 4% ácido perclórico, sonicado por 1 hora a 4°C en 1 ml de la misma solución. Posteriormente fue centrifugado y procesado como se describió para el ensayo de la sialiltransferasa.

Con el fin de calcular V_o y V_t (ver más adelante) las vesículas fueron incubadas como se describe más arriba con 0,1 a 0,5 μM [metoxi-^{3}H] inulina (2,5 Ci/mmol) y con 0,05 a 0,2 μM [^{3}H] deoxiglucosa respectivamente. Estos parámetros no sufrieron variación cuando se incluyeron en el medio de incubación diferentes concentraciones de los nucleótido derivados.

Análisis de las especies solubles radioactivas:

La separación de los distintos solutos radioactivos presentes en el pellet de Golgi o en el medio de incubación (antes y/o después de la misma) se llevó a cabo después de precipitar las macromoléculas con 2 volúmenes de etanol a -20° C y centrifugación. El volumen de las muestras fue reducido al mínimo (pero cuidando de no secarlas totalmente), bajo presión reducida o por la acción de una corriente de nitrógeno, y luego diluidas con 2 ml de agua destilada para cromatografía en ECTEOLA o con 1 ml del buffer de inyección para HPLC. También fueron agregados a las muestras los estándares fríos correspondientes.

Sulfato inorgánico, APS y PAPS marcados con ^{35}S fueron separados en columnas de ECTEOLA-celulosa (0,9 x 5 cm) por elución secuencial con 15 ml de cada una de las siguientes soluciones: 0,05 M; 0,2 M y 0,5 M de formato de amonio pH 6,5 (fracciones de 1 ml). El mismo tipo de columna fue utilizado para separar: adenosina, AMP, 3', 5'—ADP y PAPS marcados con tritio, eluyéndola con 20 ml de: agua; 0,1 M; 0,25 M y 0,5 M formato de amonio pH 6,5 (fracciones de 1 ml). Determinándose en cada fracción la densidad óptica y la cantidad de radioactividad.

Cromatografía líquida de alta presión:

Esta técnica se usó especialmente para controlar la identidad y pureza de las moléculas sintetizadas en nuestro laboratorio, especialmente [^{3}H]GDP-F y [^{3}H]PAPS.

El equipo utilizado fue el siguiente: una bomba Waters M-45, un detector espectrofotométrico Spectroflow 757 (Kratos Analytical Instruments), un registrador modelo IR-18M (Heath Kit Multispeed), un colector de fracciones Ultrorack (LKB) y una columna amino (NH_2) 090-11 de 250 mm (IBM Instruments Inc.). Esta columna fue elegida porque a pH ácido actúa como un intercambiador aniónico débil.

El sistema fue operado a 2 ml/min (2.000 psi), el volumen de muestra inyectado fue de 0,05 a 1 ml, no produciéndose variaciones apreciables en la separación de los compuestos bajo estas condiciones. Fracciones de 0,33 ml fueron coleccionadas directamente en los viales del contador de centelleo.

Los siguientes sistemas de elución fueron usados:

A) 55 mM fosfato de amonio pH 5,5 y después de 8 min. se elevó la concentración a 165 mM de la misma sal.

B) 30 mM de fosfato de amonio pH 3,4 y después de 5 min. se elevó la concentración a 150 mM de la misma sal.

C) 300 mM fosfato de amonio pH 3,4.

D) 30 mM fosfato de amonio pH 3,4.

Como puede verse en la tabla II-1 el sistema A no separa APS de 5'—AMP, en cambio el sistema B separa pobremente 5'—ADP de 3', 5'—ADP. Sin embargo como ésto no es un problema, ya que 5'— ADP no es un producto de degradación de PAPS, el sistema B fue el elegido para el análisis de las especies radioactivas solubles.

Por otra parte el sistema C fue ideal para verificar la pureza de las preparaciones de PAPS y el D para las preparaciones de GDP—F.

En todos los sistemas descriptos el ATP y el GTP quedan retenidos en la columna y para eluirlos la misma fue lavada con concentraciones del orden de 0,5 M fosfato.

Electroforesis:

La separación de las proteínas del Golgi se hizo por electroforesis vertical en geles planos de poliacrilamida (20 x 15 x 0,3 cm), utilizando el sistema discontinuo de Laemli (66) en condiciones de desnaturalización.

La concentración del gel concentrador fue de 3% acrilamida y la del gel separador fue de 5% o 10%, en todos los casos la relación acrilamida: bisacrilamida fue 29:1.

Los geles fueron corridos a 100 voltios (5 V/cm) durante 14 o 16 horas y fueron teñidos con plata según las indicaciones de los proveedores (Bio Rad).

La detección de radioactividad se llevó a cabo por fluorografía, para lo cual los geles fueron procesados exactamente como está descripto (67), secados al vacío (Gel Dryer de Bio Rad) y expuestos a placas radioautográficas XRP-5 (Kodak) a $-80^{o}C$ por diferentes tiempos.

Determinación de radioactividad:

Todas las mediciones se efectuaron con un contador de centelleo líquido de dos canales (Traycor). Las muestras, normalmente 1 ml de una solución acuosa ligeramente ácida, fueron disueltas con 9 ml de Aquasol-2 (New England Nuclear). La eficiencia de la medición se determinó por el método de la relación de actividades del estándar externo, excepto cuando se midieron simultáneamente dos radioisótopos, en cuyo caso fue utilizado el método del estándar interno.

Cálculos:

Los parámetros utilizados para cuantificar los experimentos fueron los siguientes:

$[S_m]$: concentración de solutos en el medio de incubación expresada en μM = (dpm/ml de solutos en el sobrenadante)/(AE de los solutos en dpm/nmol).

S_t: cantidad total de solutos en el pellet expresada en pmol/mg.P = (radioactividad soluble asociada con el pellet en dpm/mg.P)/(AE de los solutos en dpm/pmol).

V_t: volumen total del pellet de Golgi expresado en μl/mg.P = (dpm/mg.P de deoxiglucosa en el pellet)/(dpm/μl de deoxiglucosa en el sobrenadante).

V_o: parte del volumen del pellet que está entre las vesículas en μl/mg.P = (dpm/mg.P de inulina en el pellet)/(dpm/μl de inulina en el sobrenadante).

V_i: parte del volumen del pellet que está dentro de las vesículas en μl/mg.P = $V_t - V_o$.

S_o: solutos que están asociados con el pellet pero fuera de las vesículas expresados en pmol/mg.P = V_o (μl/mg.P) x [S_m] (pmol/μl)

S_i: solutos que están dentro de las vesículas expresados en pmol/mg.P = $S_t - S_o$.

[Si]: concentración de los solutos dentro de las vesículas expresada en μM = S_i (pmol/mg.P) / V_i (μl/mg.P)

Ins.: cantidad de radioactividad incorporada a macromoléculas expresada en pmol/mg. P = (radioactividad del pellet insoluble en ácido en dpm/mg.P)/(AE de los solutos en dpm/pmol).

Todos los cálculos fueron realizados en una computadora Hewlett-Packard, para lo cual se escribieron los programas apropiados.

TABLA II–1

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE GDP-F y PAPS POR HPLC:

	Tiempo de retención (min)			
Nucleótido derivado	A	B	C	D
adenosina	1,8	1,8		
APS	5,3	17,2		
5'-AMP	5,3	4,2		
3'-AMP	6,8	5,8		
5'-ADP	19,3	20,8	3,9	
3',5'-ADP	25,1	20,4	3,5	
PAPS	27,4	38,8	6,5	
guanosina				1,8
5'-GMP				3,1
GDP-F				6,2

Cuatro sistemas de elución fueron utilizados como se describe en el texto (A, B, C y D), en todos los casos la columna fue equilibrada antes de cada corrida con 30 ml (15 min) de la solución de menor concentración de las que constituyen el sistema respectivo. Las muestras fueron inyectadas en un volumen de 250 μl del mismo buffer. Las mismas estuvieron formadas por aproximadamente 25 nmol de cada nucleótido derivado y la absorbancia fue medida a 260 nm en una celda de flujo continuo de 1 cm de paso óptico y 8 μl de volumen. Cuando se corrieron simultáneamente con los estándares muestras radioactivas, los picos de radioactividad coincidieron exactamente con los de absorbancia.

La mínima resolución obtenida fue R = 0,88 para los picos de 3', 5'-ADP y 5'-ADP. La eficiencia de la columna fue calculada resultando N = 2.025 platos teóricos.

Los tiempos de retención tabulados no están corregidos y para los sistemas B y C tampoco están en orden creciente.

CAPITULO III

TRANSPORTE DE PAPS A TRAVES DE LAS MEMBRANAS DEL APARATO DE GOLGI

INTRODUCCION:

Ciertas macromoléculas de indudable importancia biológica como ser: glicosaminoglicanos, glicoproteínas, glicolípidos, etc. poseen grupos sulfato ligados covalentemente. El precursor donante de sulfato en la biosíntesis de los mismos es el PAPS (68).

Este nucleótido que se encuentra desde las bacterias hasta los mamíferos, es sintetizado en el citoplasma a partir de ATP y sulfato inorgánico.

Estudios in-vivo de incorporación de sulfato radioactivo mediante autorradiografía al microscopio electrónico (30 - 32, 69-70) e in-vitro mediante fraccionamiento subcelular (29, 71-73) han demostrado que la transferencia del sulfato desde el PAPS a los aceptores macromoleculares ocurre en el aparato de Golgi.

En esta reacción el sulfato queda covalentemente unido a azúcares que se encuentran en el lumen del Golgi (63, 74). Por lo tanto se plantea el problema de cómo el PAPS atraviesa la membrana para ponerse en contacto con las sulfotransferasas y los aceptores apropiados presentes en el lumen de las vesículas.

Una posibilidad es la existencia de un sistema de transporte similar al descripto recientemente para dos nucleótido azúcares (52). En este capítulo se demuestra la validez de esa hipótesis.

RESULTADOS:

Incubación de vesículas de Golgi con [^{35}S]PAPS:

Para estos experimentos se usaron vesículas derivadas del aparato de Golgi altamente purificadas, cerradas y con la topografía correcta (ver Métodos).

Cuando las mismas se reaislaron por ultracentrifugación después de haber sido incubadas con [^{35}S] PAPS, se encontró que contenían azufre radioactivo, tanto en forma insoluble en ácido como soluble. Pudo comprobarse que más del 85% de este último estaba dentro de las vesículas.

En un experimento típico, donde se incubaron las vesículas según se detalla en la tabla III-1, se encontraron 21,54 ± 1,00 pmol/mg.P de solutos radioactivos asociados con el pellet (S_t). El análisis de estos solutos se hace en la próxima sección. Obviamente, es de suma importancia determinar qué fracción de esos solutos está realmente dentro de las vesículas (S_i) y cuál está entre las mismas (S_o). Esto se puede calcular conociendo el volumen que queda en el pellet entre las vesículas (V_o) y la concentración de solutos en el medio de incubación.

A su vez V_o se calcula como el volumen accesible a un estándar no penetrante, como es el caso de la metoxi inulina (52).

Como se muestra en la tabla III-1, el valor de S_o es en este ejemplo de 2,83 ± 0,02 pmol/mg.P y por lo tanto, la cantidad de solutos dentro de las vesículas S_i es la diferencia entre S_t y S_o, o sea de 18,71 ± 1,00 pmol/mg. proteína, y los mismos, como se demuestra más adelante, provienen del trans-

porte de PAPS a través de la membrana de la vesícula.

Además es necesario conocer el volumen interno de las vesículas V_i para determinar la concentración de solutos dentro de las mismas. Este volumen es sencillamente la diferencia entre el volumen accesible total del pellet V_t, medido mediante el uso de deoxiglucosa (52) y V_o. De la tabla III-1 se puede determinar que V_i = 0,40 ± 0,04 μl/mg.P y por lo tanto que la concentración de solutos interna [S_i] es de 46,2 ± 2,5 μM. Este valor es 27 veces mayor que la concentración de solutos radioactivos en el medio de incubación.

Adicionalmente se encontraron en las mismas vesículas 92,25 ± 0,84 pmol/mg.P de moléculas radioactivas insolubles en ácido perclórico.

La acumulación de solutos dentro de las vesículas de Golgi es lineal con respecto al tiempo, hasta por lo menos 10 min (tanto a 0,5 μM como a 1,8μM PAPS en el medio de incubación), y con respecto a la concentración de vesículas entre 0,3 a 2,4 mg de proteínas.

También es saturable con PAPS, como se muestra en la figura III-1. Mediante el análisis de un gráfico de 1/V versus 1/S pudo determinarse un KM aparente de translocación igual a 0,7 μM (basada en la concentración inicial de PAPS en el medio de incubación) y una Vmax de 25 pmol/mg.P/10 min.

Este proceso es también dependiente de la temperatura, siendo 12,5 veces más activo a 23°C que en hielo.

Análisis de los solutos que fueron translocados:

Después de una incubación similar a la descripta anteriormente, se procedió al análisis de los solutos radioactivos en el medio de incubación y en el pellet de vesículas.

Como puede verse en la tabla III-2, solamente PAPS y sulfato se encuentran en ambos compartimentos, aunque en diferentes proporciones. Mientras que PAPS es el 42 % de la radioactividad en el medio y solamente el 5% de la del pellet, el sulfato constituye el 58% de la radiaoctividad del medio, pero el 95% de la del pellet.

Por otra parte, no se detectó la presencia de APS, bajo condiciones en que un 1 % podría haberlo sido.

También muestra que solamente el sulfato se acumula en las vesículas, aproximadamente 71 veces con respecto a la concentración de sulfato en el medio de incubación y unas 41 veces con respecto a la totalidad de solutos radioactivos.

Esta acumulación puede deberse a la translocación de PAPS desde el medio de incubación al interior de las vesículas y subsecuente hidrólisis de la misma, pero también puede resultar de la translocación de sulfato radioactivo originado por la hidrólisis de PAPS en el medio.

Sin embargo, cuando las vesículas fueron incubadas en las mismas condiciones, pero con diferentes concentraciones de sulfato radioactivo, (incluyendo aquellas que se originan por hidrólisis de PAPS) no se produce la acumulación del mismo (tabla III-2). Es decir las vesículas son impermeables al sulfato libre. Por otra parte, tampoco se detecta en estas condiciones radioactividad ácido insoluble.

Ambos resultados sugieren que la primera hipótesis es la correcta.

Incubación de vesículas de Golgi con una mezcla de [^{35}S]PAPS y [adenina-8-^{3}H]PAPS:

Evidencia directa de la translocación de la molécula intacta de PAPS, a través de la membrana de Golgi se obtuvo mediante experimentos de doble marca, es decir, incubando las vesículas con una mez-

cia de moléculas de PAPS marcadas con ^{3}H en la parte nucleotídica y con ^{35}S en el grupo sulfato.

La justificación lógica de este experimento reside en que si lo que se transloca es la molécula de PAPS entera, entonces la relación $^{3}H/^{35}S$ en el pellet de vesículas (este último tomado como la suma de radioactividad soluble e insoluble en ácido) debería ser muy similar a la misma relación en el medio de incubación. En caso contrario se espera que las dos relaciones sean muy diferentes.

Como se muestra en la tabla III-3, experimento 1, luego de 3 min. de incubación de vesículas con la mezcla antes mencionada, el cociente de $^{3}H/^{35}S$ fue de 1,73 para el medio de incubación y de 1,82 para las vesículas.

Como un control adicional que prueba la validez del razonamiento (control negativo), se realizó una incubación con una mezcla de [adenina-8-^{3}H]PAPS y [^{35}S]sulfato, el resultado de la misma (ver experimento 2 de la misma tabla) demuestra que las relaciones $^{3}H/^{35}S$ en el sobrenadante y en el pellet son muy distintas. También se analizaron químicamente las especies radioactivas ácido solubles que se generan en el medio de incubación y en el pellet, después de un experimento similar al 1. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III-4.

Como se aprecia en la misma, PAPS y sulfato, como era de suponer, son las únicas especies que contienen ^{35}S, tanto en el pellet como en el sobrenadante.

Las especies marcadas con ^{3}H fueron: PAPS, 3', 5'-ADP, 3'—AMP y/o 5'—AMP y adenosina, también en ambos compartimentos.

Después de realizar los cálculos de la forma descripta, se determinó que las únicas especies que se concentran en las vesículas son: [^{35}S]sulfato, [^{3}H]adenosina y [^{3}H]3' — y/o 5'—AMP (tabla III-4). Si bien el factor de concentración no es el mismo para las tres especies.

Esto se debe a que sus concentraciones en el medio son diferentes después de la incubación y principalmente a que mientras el 85% del sulfato en el pellet es ácido insoluble, el 100% de las especies tritiadas son solubles en ácido.

El conjunto de todos estos resultados pueden ser explicados plausiblemente por la siguiente cadena de eventos: 1) translocación de PAPS a través de las membranas al lumen de las vesículas, 2) transferencia del grupo sulfato a macromoléculas o a agua (hidrólisis), 3) actividad de fosfatasas lumenales.

Sin embargo, no puede descartarse totalmente la posibilidad de que el clivaje de la molécula de PAPS se produzca en la faz citoplasmática de la membrana, seguido por la translocación simultánea de sulfato (quizá como un complejo rico en energía) y adenosina monofosfato. Si bien la probabilidad de este proceso es más bien exigua, ya que todas estas translocaciones deberían ocurrir a una velocidad casi idéntica para satisfacer los experimentos de doble marca, y por otra parte está perfectamente demostrado que el substrato de las sulfotransferasas es PAPS.

Caracterización del transporte de PAPS:

Fue importante determinar cuales son las características estructurales de la molécula de PAPS que son reconocidas por la presunta proteína transportadora. Con este fin se midió la inhibición producida sobre la translocación por análogos estructurales de PAPS.

Como se muestra en la tabla III-5, 3',5'—ADP es un potente inhibidor, mientras que 2',5'—ADP o sulfato no producen prácticamente ningún efecto. Lo cual sugiere un alto grado de especificidad por parte del supuesto transportador con respecto a PAPS.

Por otra parte cabe suponer que este translocador tiene un dominio en contacto con el citoplasma. Evidencia de que esta hipótesis puede ser correcta se muestra en la tabla III-6.

La translocación de PAPS pudo ser inhibida en casi un 90% por tratamiento previo de las vesículas con pronasa, en condiciones en que la actividad de las sialiltransferasas (proteínas marcadoras del lumen del aparato de Golgi) no es afectada.

Si bien no puede descartarse totalmente la posibilidad de que ambas proteínas tengan la misma orientación,, pero diferente susceptibilidad a la acción de la pronasa.

Como se ha mostrado previamente, aproximadamente un 85% del sulfato radioactivo en el Golgi es insoluble en ácido. Además parece estar covalentemente ligado a compuestos de muy alto peso molecular, en base a su comportamiento electroforético en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

Menos de 1% del mismo es soluble en cloroformo-metanol, lo cual es consistente con el hecho de que muy escasas cantidades de sulfolípidos son detectadas en el hígado de rata (75).

La localización de estas macromoléculas o por lo menos de su parte sulfatada parece ser lumenal, en base al hecho de que es imposible remover la radioactividad mediante pronasa, si no se destruye previamente la barrera de permeabilidad (la membrana del Golgi) con el detergente Tritón X-100.

Discusión:

Los resultados presentados previamente sugieren fuertemente que las vesículas de Golgi pueden translocar PAPS como una unidad desde un compartimento externo a uno lumenal, a pesar de que esta molécula no puede ser detectada en el interior de las vesículas.

La evidencia más fuerte que soporta esta hipótesis proviene de los experimentos de doble marca, los cuales muestran la constancia de la relación $^{3}H/^{35}S$. Además el 85 % del sulfato radioactivo es insoluble en ácido, mientras que ninguna de las especies tritiadas lo es.

Con estas restricciones, cualquier otro mecanismo que no sea el transporte de la molécula íntegra de PAPS es, por lo menos, muy improbable.

Dos experimentos adicionales la refuerzan: a) la membrana del Golgi es totalmente impermeable para el sulfato, a pesar de que este anión es la única especie soluble marcada con ^{35}S que se encuentra y concentra en el lumen; b) la gran variación observada en el cociente $^{3}H/^{35}S$ cuando la incubación se hace en presencia de [^{3}H]PAPS y [^{35}S]sulfato.

El proceso de translocación demostró ser: dependiente de la temperatura, saturable por substrato, inhibible por tratamiento con pronasa en condiciones controladas y por 3', 5'—ADP pero no por 2', 5'—ADP. Todo lo cual es consistente con la existencia de una proteína transportadora específica para PAPS en la membrana del Golgi, parte de la cual está en contacto con el citoplasma.

Si bien estos experimentos se han realizado in-vitro, el hecho de que el PAPS sea sintetizado en el citosol (50) y que las vesículas utilizadas sean de la topografía correcta (63), sugiere que este fenómeno ocurre también in-vivo.

Los resultados acerca del peso molecular y localización de los aceptores de sulfato están de acuerdo con la literatura, ya que existen sulfotransferasas en el aparato de Golgi (73) y el hígado sintetiza glucosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas sulfatadas (6).

Mientras que la mayor parte de las moléculas sulfatadas son secretadas por la célula (6), el destino de la parte nucleotídica del PAPS merece cierta atención. Se ha obtenido evidencia indirecta de que adenosina y/o AMP salen desde el lumen hacia el medio. Estos son precisamente los solutos que se encontraron en el mismo durante los experimentos de doble marca (tabla III-4).

Se encontró que mientras que a 3 min de incubación la relación molar de nucleótido a sulfato es

de 1, a 6 min. decrece a 0,75 y a 10 min a 0,55. Como la mayor parte del sulfato está covalentemente fijado en el lumen, el descenso de la relación debe provenir de la salida de moléculas tritiadas (parte nucleotídica del PAPS). Se puede especular que este mecanismo impide la acumulación de nucleótidos en el Golgi in-vivo.

Resultados consistentes con esta hipótesis se encuentran en la literatura para UMP, producto de la degradación de UDP-gal (76, 77), y se volverá sobre el tema en el capítulo VI.

TABLA III–1

TRANSLOCACION DE [^{35}S]PAPS A TRAVES DE LA MEMBRANA DE VESICULAS DERIVADAS DEL APARATO DE GOLGI

	dpm/mg.P	μM	p.mol/mg.P	μl/mg.P
$[S_m]$inicial		1,80		
$[S_m]$final		1,69		
S_t	13.490 ± 630		21,54 ± 1,00	
S_o			2,83 ± 0,02	
S_i			18,71 ± 1,00	
Ins.			92,25 ± 0,84	
V_t	3.253 ± 60			2,07 ± 0,02
V_o	2.128 ± 59			1,67 ± 0,02
V_i				0,40 ± 0,04
$[S_i]$	46,25 ± 2,5			

Vesículas de Golgi (0,46 mg de proteína) fueron incubadas por cuadruplicado, en un volumen final de 1 ml por 10 min. a 23°C, con:

a) [^{35}S]PAPS (1,8 nmol – 1,13 x 10^6 dpm).

b) [metoxi-^{3}H]inulina (0,35 μM – 2,5 Ci/mmol) en presencia de 2 μM PAPS frío.

c) [^{3}H]deoxiglucosa (0,046 μM – 10 Ci/mmol) también con 2 μM PAPS.

El significado de los parámetros y la explicación detallada de los cálculos se encuentra en el capítulo II.

TABLA III-2

TRANSLOCACION DE [^{35}S]PAPS y [^{35}S] SULFATO. ANALISIS DE SOLUTOS

	$[S_m]$inicial	$[S_m]$final	S_t	S_o	S_i	$[S_i]/[S_m]^f$
	μM	μM	pmol/mg. proteína			
Experimento 1						
[^{35}S]PAPS	1,8	0,76	1,3	1,6	−0,3	0
^{135}S]SO_4Na_2	0	1,04	24,8	2,2	22,6	71
Experimento 2						
[^{35}S]SO_4Na_2	0,5	0,5	0,54	1,13	−0,59	0
[^{35}S]SO_4Na_2	2,0	2,0	1,83	4,50	−2,6	0
[^{35}S]SO_4Na_2	10,0	10,0	19,70	22,50	−2,80	0

Vesículas derivadas del Golgi (0,93 mg de proteína) se incubaron como se indica en la tabla III-1. Los valores de V_t y V_o fueron de 2,55 y 2,25 μl/mg de proteína.

En el experimento 1 la incubación se realizó con 1,8μM[^{35}S]PAPS (7,6 x 10^5 dpm), las actividades específicas del [^{35}S]SO_4Na_2 usadas en el experimento 2 fueron de 0,2 Ci/mmol a 0,5 y 2,0 μM y de 0,03 Ci/mmol a 10 μM.

El significado de los parámetros y la explicación de los cálculos se encuentra en el capítulo II.

Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA III–3

TRANSLOCACION DE UNA MEZCLA DE [ADENINA-8-^{3}H]PAPS Y [^{35}S]PAPS. RELACION DE ISOTOPOS

	Medio antes de incubar	Medio después de incubar	Pellet de Golgi
		dpm de ^{3}H/dpm de ^{35}S	
Experimento 1			
[^{3}H]PAPS + [^{35}S]PAPS (0,2 μM)	1,73 ± 0,01	1,73 ± 0,03	1,82 ± 0,13
Experimento 2			
[^{3}H]PAPS (0,06 μM) + [^{35}S]SO_4Na_2 (0,6 μM)	0,90	0,72	43

Vesículas de Golgi (1,2 mg) se incubaron durante 3 min a 23°C con PAPS (1,95 x 10^5 dpm de ^{3}H más 1,13 x 10^5 dpm de ^{35}S), o con [^{3}H]PAPS (1,17 x 10^5 dpm) más [^{35}S] sulfato (1,3 x 10^5 dpm).

Después de una incubación típica se obtuvieron en el pellet de Golgi: 7.440 dpm de ^{3}H más 4.430 dpm de ^{35}S en el experimento 1 y 5.300 dpm de ^{3}H más 130 dpm de ^{35}S en el experimento 2.

La eficiencia del conteo se determinó por el método del estándar interno y los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA III–4

TRANSLOCACION DE UNA MEZCLA DE [adenina-8-^{3}H]PAPS Y [^{35}S]PAPS. ANALISIS DE SOLUTOS RADIOACTIVOS

	Solutos radioactivos en el pellet de Golgi				Solutos en el medio	
	dpm	S_t	S_o	S_i	$[S_m]f$	$[S_i]/[S_m]f$
[^{35}S]PAPS	80	0,06	0,18	–0,12	0,10	0
[^{35}S]SO_4Na_2	2.000	1,51	0,15	1,36	0,08	44
[^{3}H]PAPS	160	0,07	0,16	–0,09	0,09	0
[^{3}H]3', 5'-ADP	200	0,09	0,09	0	0,045	0
[^{3}H]3' – o/y 5'–AMP	5.900	2,59	0,03	2,56	0,016	410
[^{3}H]Adenosina	4.450	1,95	0,06	1,89	0,032	150

Vesículas de Golgi (2,4 mg de proteína) se incubaron a 23°C durante 3 min. con 0,2 μM PAPS (1,9 x 10^5 dpm de ^{3}H más 1,1 x 10^5 dpm de ^{35}S) en 1 ml de volumen.

El V_i fue de 0,39 μl/mg.P y el V_o de 1,9 μl/mg.P.

El significado de los parámetros se halla en el capítulo II.

La eficiencia del conteo se determinó por el método de estándar interno y los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA III-5

INHIBICION DE LA TRANSLOCACION DE PAPS POR ANALOGOS

Análogo	Concentración μM	Inhibición % del control
3', 5'-ADP	1,0	56
3', 5'-ADP	3,0	85
3', 5'-ADP	10,0	89
2', 5'-ADP	10,0	15
SO_4Na_2	50,0	0

Vesículas de Golgi (0,85 mg de proteína) se incubaron con las concentraciones indicadas de análogos y 0,9 μM PAPS ($7,9 \times 10^5$ dpm) durante 5 min. a 23°C. La incubación se inició con la adición de la marca y la elevación de la temperatura. El S_i del control fue de 11,2 pmol/mg.P/5 min.

Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA III-6

INHIBICION DE LA TRANSLOCACION DE PAPS POR TRATAMIENTO DE LAS VESICULAS CON PRONASA

Concentración de Pronasa	Translocación de PAPS	Sialil-transferasa
	% de actividad de control	
1:100	15	113
1:20	12	96

Alícuotas de vesículas (4,5 mg de proteínas) se incubaron en un volumen de 0,5 ml de STM durante 30 min a 30°C sin o con pronasa (Calbiochem) a una relación de 1:20 y 1:100 de enzima a proteínas de Golgi. La reacción se paró mediante la adición de 4 volúmenes de STM frío, las vesículas se reaislaron por centrifugación (0,5 h a 10^5 x g) y se resuspendieron en el volumen original de STM. Fracciones de 0,2 ml de esta suspensión se usaron inmediatamente en ensayos de penetración (10 min a 23°C).

El control de translocación fue de 11,8 pmol/mg.P/10 min y el de actividad de sialiltransferasa de 2,17 nmol de ácido siálico transferido/mg.P/min.

Cuando las vesículas se trataron con 1:20 de pronasa en presencia de 0,1% de Tritón X-100, la actividad de sialiltransferasase redujo a un 20,3 % del control.

Los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes.

FIGURA III-1

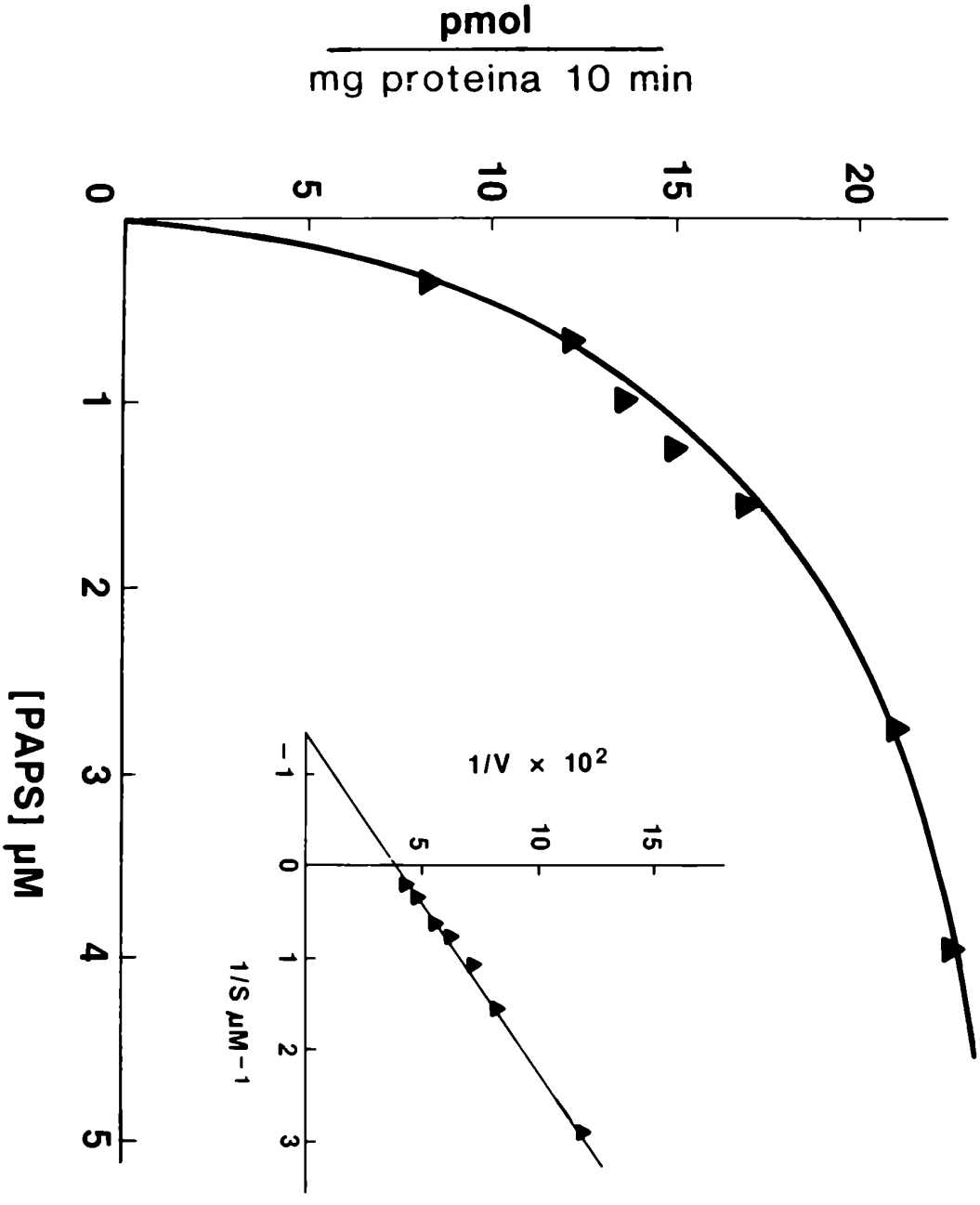

pmol
mg proteina 10 min
0
5
10
15
20
1
2
3
4
5
[PAPS] µM
1/V x 10²
−1
0
1
2
3
5
10
15
1/S µM⁻¹

FIGURA III-1

Velocidad de acumulación de solutos dentro de vesículas de Golgi en función de la concentración de PAPS. Vesículas derivadas del aparato de Golgi (0,7 mg de proteína) fueron incubadas a 23°C por 10 min con diferentes concentraciones de PAPS (0,85 x 10^6 dpm de [^{35}S]PAPS más la cantidad apropiada de PAPS frío para obtener la concentración deseada) en 1 ml de medio de penetración (capítulo II). El transporte se midió como se describe en el capítulo II. Los resultados mostrados son el promedio de dos determinaciones independientes.

CAPITULO IV

EFECTO PRODUCIDO POR NUCLEOTIDOS SOBRE EL TRANSPORTE DE NUCLEOTIDO AZUCARES Y PAPS

INTRODUCCION:

Los resultados presentados en el capítulo anterior y en las referencias 52, 55 y 78 son consistentes con la hipótesis que postula la existencia, en las membranas del aparato de Golgi de hígado de rata, de proteínas translocadoras de CMP-AS, GDP-F y PAPS. Las mismas parecen ser específicas para cada molécula, ya que no se produce interferencia en el transporte de cada una de ellas por la presencia de las otras.

Por ejemplo, cuando se incuban vesículas de Golgi con una mezcla de [^{35}S]PAPS y CMP-[^{3}H]AS (con concentraciones iguales a los KM respectivos), no se detectan variaciones significativas en los índices de penetración (S_i) con respecto a los controles incubados solamente con [^{35}S]PAPS o con CMP-[^{3}H]AS.

También existe evidencia directa de un translocador de UDP-gal en el Golgi de hígado de rata (datos personales), e indirecta en el mismo tejido (76) y en glándula mamaria (77).

El objetivo del estudio que se describe en este capítulo fue el de examinar en detalle las características estructurales de los nucleótido azúcares y PAPS requeridas por los presuntos transportadores.

Con este fin se determinó el efecto que diferentes nucleótidos y bases producen sobre el fenómeno de translocación.

Este proyecto tuvo también el objeto de elegir aquellos nucleótido derivados que pudiesen ser utilizados para identificar y/o aislar los translocadores, mediante marcado de foto afinidad y/o cromatografía de afinidad.

RESULTADOS:

Estudios previos han mostrado que la translocación de CMP-AS, GDP-F y PAPS puede ser inhibida por los correspondientes nucleótidos, pero no por los azúcares, azúcares fosfato o sulfato correspondientes (52, 55). Lo cual indica que lo que reconoce el transportador durante el proceso de asociación inicial, es precisamente el nucleótido.

Fue por lo tanto de gran importancia determinar qué características de los mismos son imprescindibles para su asociación inicial con la membrana de Golgi. Con este propósito se realizaron una serie de experimentos estudiando el efecto que diversos nucleótidos tienen sobre la velocidad de transporte de los nucleótido azúcares y PAPS.

Las variables estudiadas fueron: a) tipo de la base nitrogenada, b) número y posición de los grupos fosfato, c) presencia o ausencia de grupos hidroxilo en la ribosa y d) substitución de hidrógeno por halógenos y nitrógeno en las bases.

Efecto sobre la translocación de CMP-AS:

En la tabla IV-1 se muestran los efectos que produce, sobre el transporte de CMP-AS, la presencia

en el medio de incubación de diferentes nucleótidos, como así también la dependencia con respecto a la concentración de los mismos.

5'-CMP y varios de sus derivados fueron muy buenos inhibidores de la translocación de CMP-AS. Como se ve en la figura IV-1, la inhibición producida por 5'-CMP fue competitiva con una Ki de 4,5 μM (a 10 y 25 μM 5'-CMP).

La presencia y la posición del grupo fosfato en la ribosa es de extrema importancia para determinar la actividad inhibitoria, ya que 3'-CMP, 2'-CMP, citidina, deoxicitidina y 3', 5'-cCMP en concentraciones 10 veces superiores a la de CMP-AS inhibieron la translocación en menos de un 5% (tabla IV-1).

5'-dCMP también fue un inhibidor efectivo, demostrando que la presencia de hidroxilos en la ribosa no es un requisito importante en la unión del CMP-AS a la membrana.

La substitución del hidrógeno en la posición 5 del anillo pirimidínico por halógenos, aumenta el efecto inhibitorio de los 5'-pirimidina monofosfato (ver tabla IV-1).

Como se demuestra en la figura IV-2 la inhibición producida sobre la translocación de CMP-AS, por 5-Br-dCMP también fue competitiva con una Ki de 1,7 μM (a 2 y 10 μM 5-Br-dCMP). Otras pirimidinas 5'-monofosfato, como por ejemplo UMP, fueron también buenos inhibidores, aunque a concentraciones mayores que los correspondientes derivados de citidina (tabla IV-1). Y también competitivos, como se muestra en la figura IV-3 para el 5'-UMP, sin embargo la misma no es simple como en los casos anteriores (figuras IV-1 y IV-2). El Ki fue de 18 μM a 25μM 5'-UMP.

Algunos nucleótidos purínicos como: 5'-ATP, 3'-ADP, 2'-ADP, 5'-GTP, GDP-M y PAPS en concentraciones 100 veces más grandes que la de CMP-AS inhibieron el transporte del mismo en menos del 25% (no mostrado); otros como 5'-ADP y 5'-AMP bajo las mismas condiciones lo hicieron en 41% y 55% respectivamente.

Efecto sobre la translocación de GDP-F:

El efecto que sobre la translocación de GDP-F tienen diversos nucleótidos se muestra en la tabla IV-2. Varios nucleótidos derivados de adenosina y guanosina fueron efectivos inhibidores en concentraciones 5 veces mayores (10 μM) que la de GDP-F. Los más efectivos en concentraciones 2 veces mayores (4 μM) fueron: 8-Br-GMP, 8-azido-GTP y 5'-GDP.

La substitución del hidrógeno 8 del anillo purínico por bromo incrementa el efecto inhibitorio de GMP, GTP, AMP y ADP cuando se usan a bajas concentraciones (tabla IV-2).

La inhibición producida tanto por 5'-GDP como por 8-azido-GTP fue competitiva (figuras IV-4 y IV-5). Con una Ki de 3,9 μM para GDP (a 20 μM) y una Ki de 1,4 μM para 8-azido-GTP (a 4 y 16 μM).

Los nucleótidos derivados de la pirimidina, por ejemplo UDP, resultaron ser pobres como inhibidores.

Tampoco fue muy efectivo IDP, lo cual sugiere que la presencia de un grupo amino en el anillo purínico debe jugar un papel importante en la unión de GDP-F al transportador.

Efecto sobre la translocación de PAPS:

El efecto de los nucleótidos sobre la translocación de PAPS se muestra en la tabla IV-3. Como puede verse, a bajas concentración (2,5 μM, es decir 3 veces la concentración de PAPS), 3', 5'-ADP fue

el inhibidor más efectivo, mientras que 2', 5'-ADP no tuvo ningún efecto.

Otros nucleótidos como ser: APS, 5'-ATP, 5'-ADP y 8-azido-AMP resultaron tener una actividad inhibidora considerablemente menor (tabla IV-3).

Estos resultados sugieren que la proteína transportadora de PAPS tiene cierta afinidad, si bien baja, por los nucleótidos de adenosina que contienen grupos fosfato en la posición 5' de la ribosa, pero no por aquellos que lo tienen en la 2', 3' o ciclado (AMP cíclico).

Tampoco tiene efecto el nucleótido azúcar CMP-AS, lo cual refuerza la hipótesis de que existe un grupo de diferentes transportadores específicos.

DISCUSION:

Como se indicó anteriormente el propósito de este trabajo fue el de obtener información sobre los requerimientos estructurales de los presuntos transportadores de nucleótido azúcares y PAPS en la membrana del aparato de Golgi. La hipótesis subyacente en este estudio consiste en que la inhibición del transporte puede ocurrir por dos causas: a) impidiendo la unión del compuesto a la membrana del Golgi, o b) impidiendo la subsiguiente translocación a través de la misma. No se conoce si ambos eventos son realizados por una o más proteínas.

En aquellos casos en que la inhibición del transporte producida por un dado nucleótido fue competitiva, puede postularse que la proteína(s) reconoce características estructurales similares en los nucleótido azúcares o sulfato. La ausencia de inhibición en cambio, sugiere que esas características no juegan un papel importante en el reconocimiento.

También puede inferirse que al ser la inhibición competitiva, el nucleótido ocupa el mismo sitio activo del transportador que las moléculas normalmente translocadas. Esto provee una prueba adicional de que el proceso es mediado por proteínas.

Se ha obtenido evidencia de que la parte nucleotídica contiene información necesaria pero no suficiente para producir la translocación. Esta proviene de experimentos en los cuales se constató que GDP-F pero no GDP-M es translocada por el Golgi; siendo que GDP es un inhibidor competitivo pero que ni fucosa ni manosa afectan el transporte.

A partir de los resultados descriptos se deducen las siguientes conclusiones con respecto a las características estructurales de los nucleótido azúcares y PAPS requeridas para que sean translocados a través de la membrana del aparato de Golgi:

1) El tipo de base, purina o pirimidina, es reconocida durante la asociación con la membrana, por ejemplo 5'-UMP es inhibidor competitivo del transporte de CMP-AS pero 5'-AMP carece de ese efecto.

2) La posición del grupo fosfato es crítica para la asociación. Así la presencia del fosfato en la posición 5' le confiere al nucleótido una gran actividad inhibitoria, pero no ocurre lo mismo si lo posee en posición 2' o 3'.

3) El número de fosfatos en la posición crítica del nucleótido parece ser menos importante, ya que por ejemplo las actividades inhibitorias de 5'-CMP, 5'-CDP y 5'-CTP sobre el transporte de CMP-AS son similares.

4) La presencia de un grupo hidroxilo en la ribosa no es una característica importante de reconocimiento; así dCMP es tan buen inhibidor como CMP.

5) El reemplazo del hidrógeno en la posición 5 de las pirimidinas o en la 8 de las purinas por halógenos o un grupo azido, aumenta levemente la actividad inhibitoria. No queda determinado si este efecto se debe al reemplazo en si, o a que el mismo le confiere al nucleótido mayor estabilidad ante las

fosfatasas.

6) La porción donada de las moléculas (azúcar o sulfato), no parece ser importante durante la primera fase de la translocación, es decir la unión al transportador en la superficie externa de la vesícula, sin embargo es crítica durante la fase subsecuente por la cual atraviesa la membrana del Golgi.

La información obtenida ha sido de gran importancia para elucidar el mecanismo de transporte (capítulo VI). Y también está siendo utilizada para sintetizar análogos de los nucleótido azúcares con grupos fotorreactivos, con el fin de identificar y purificar los presuntos transportadores de la membrana del aparato de Golgi.

TABLA IV–1

EFECTO SOBRE EL TRANSPORTE DE CMP-AS

Adición	Inhibición de la translocación (% del control)			
	2 μM	10 μM	20 μM	210 μM
5'CTP				55
5'CDP				83
5'CMP	17		53	93
3'CMP			< 5	
2'CMP			< 5	
3', 5'–cCMP			< 5	
dCMP		56	63	
Citidina			< 5	
dCitidina			< 5	
5–I–CMP	19		89	
5–I–dCMP	50	88		
5–Br–CMP		50		
5–Br–dCMP	37	68		
5'–UTP				56
5–Br–dUTP		36		
5'–UDP		10	24	66
5'–UMP		16	21	93
dUMP			47	
5–Br–dUMP	10	31		
5'–TMP			32	
UDP-gal				61
UDP–N–AcGA				41

La translocación de CMP-AS fue medida como se describe (capítulo II) a una concentración de 2 μM. El resultado del control fue de 141 pmol/mg.P./10 min. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes.

TABLA IV-2

EFECTO SOBRE EL TRANSPORTE DE GDP–F

	Inhibición de la translocación (% del control)	
Adición	4 μM	10 μM
GMP	5	65
8–Br–GMP	75	86
GDP	28	71
GDP–M	21	49
GTP	7	69
8–Azido–GTP	53	82
IDP	5	43
8–Br–IDP	2	17
AMP	2	9
8–Br–AMP	19	46
ADP	7	20
8–Br–ADP	16	43
3', 5'–ADP	13	18
ATP	5	21
UDP	4	16

La translocación de GDP–F, a una concentración de 2 μM, se midió como está descripto (capítulo II). El control fue de 31 pmol/mg.P/10 min. Los resultados son el promedio de dos experimentos diferentes.

TABLA IV–3

EFECTO SOBRE EL TRANSPORTE DE PAPS:

	Inhibición de la translocación (% del control)	
Adición	2,5 μM	10 μM
APS	21	64
3', 5'–ADP	76	97
2', 5'–ADP	9	12
5'–ATP	13	56
5'–ADP	10	60
5'–AMP	6	60
3'–AMP	0	4
8-Azido–AMP	19	55
5'–GTP	–	10
5'–GMP	–	37
cAMP	–	0
CMP–AS	–	0

La translocación se midió a una concentración de 0,8 μM PAPS (capítulo II). La velocidad de transporte del control fue de 46 pmol/mg.P/10 min. Los resultados son el promedio de dos determinaciones.

FIGURA IV-1

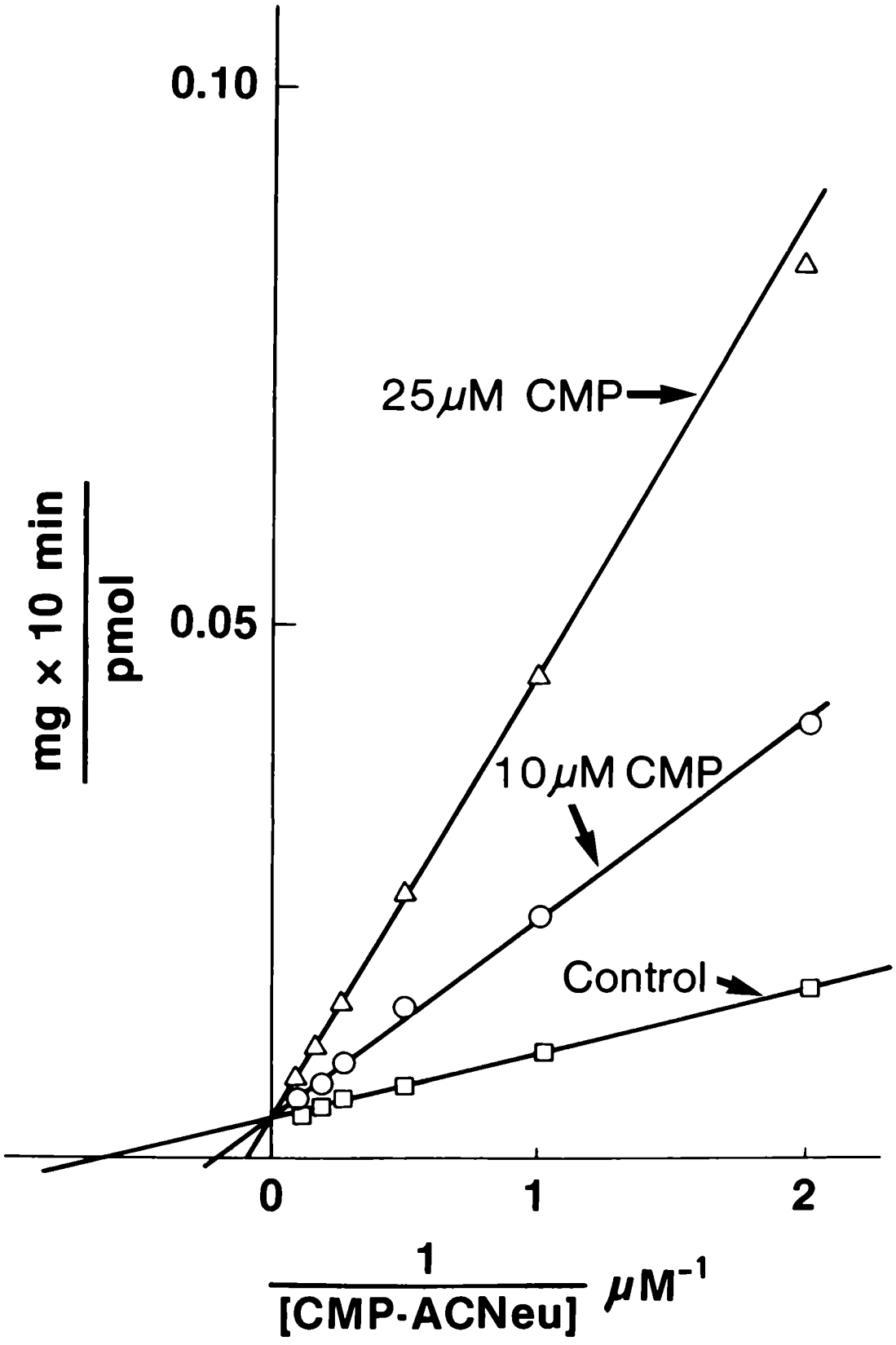

0.10
0.05
mg x 10 min / pmol
25μM CMP
10μM CMP
Control
0
1
2
1 / [CMP-ACNeu] μM⁻¹

FIGURA IV-1

Inhibición de la translocación de CMP–AS (igual CMP–AcNeu) hacia el lumen de vesículas de Golgi por 5'–CMP. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y se calcularon como se describe en el capítulo II, por ejemplo el S_j obtenido con 1 μM CMP–AS fue de 97 pmol/mg.P/10 min.

Concentraciones de CMP: 0 μM (cuadrados), 10 μM (círculos) y 25 μM (triángulos).

FIGURA IV-2

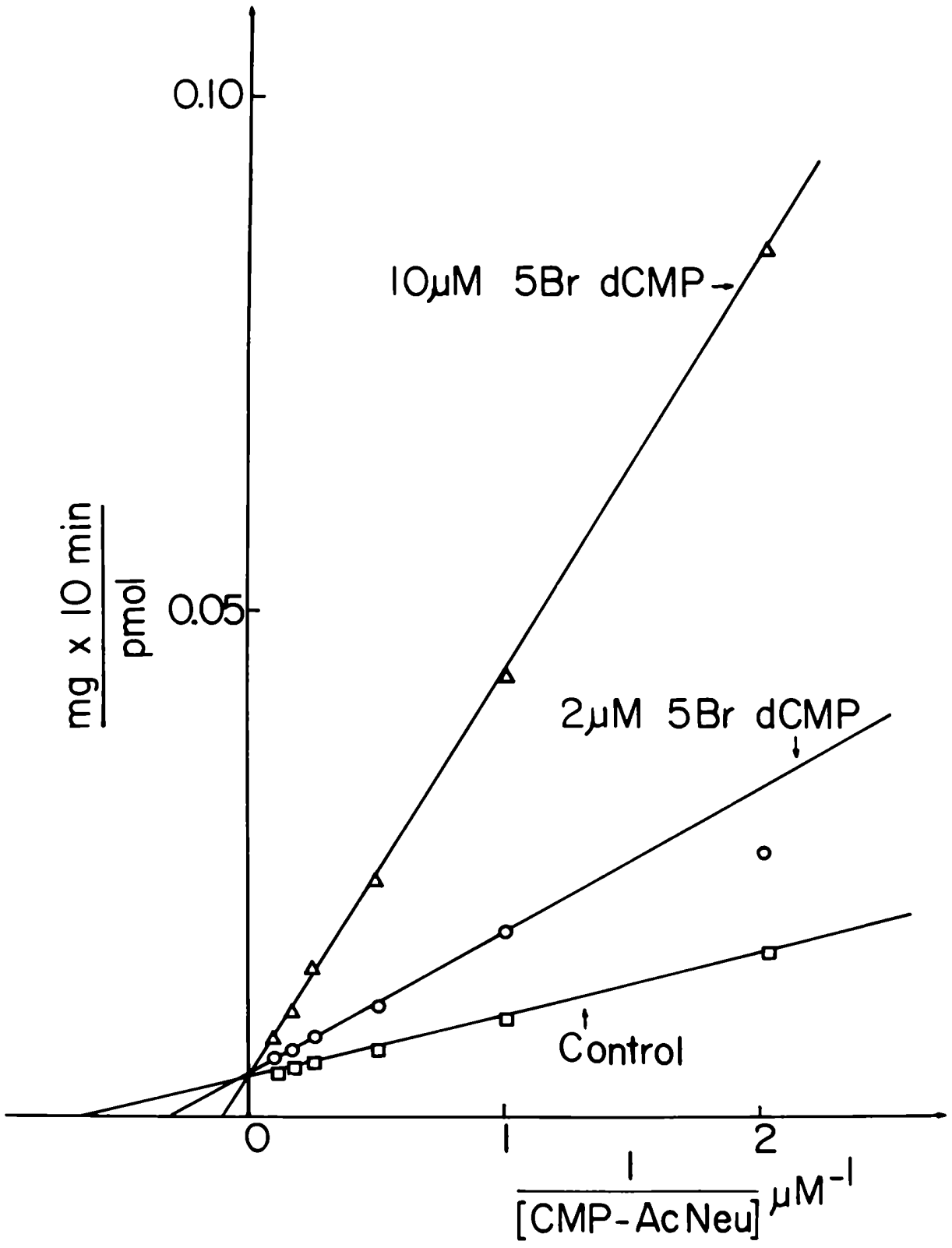

0.10
0.05
mg x 10 min / pmol
10μM 5Br dCMP
2μM 5Br dCMP
Control
0
1
2
1 / [CMP-AcNeu] μM-1

FIGURA IV-2

Inhibición de la translocación de CMP–AS (igual CMP–AcNeu) hacia el lumen de las vesículas de Golgi por 5–Br–5'–dCMP. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y se calcularon como se describe en el capítulo II, por ejemplo el S_i obtenido con 1 μM CMP–AS fue de 97 pmol/mg.P/10 min.

Concentraciones de Br–dCMP: 0 μM (cuadrados), 2 μM (círculos) y 10 μM (triángulos).

FIGURA IV-3

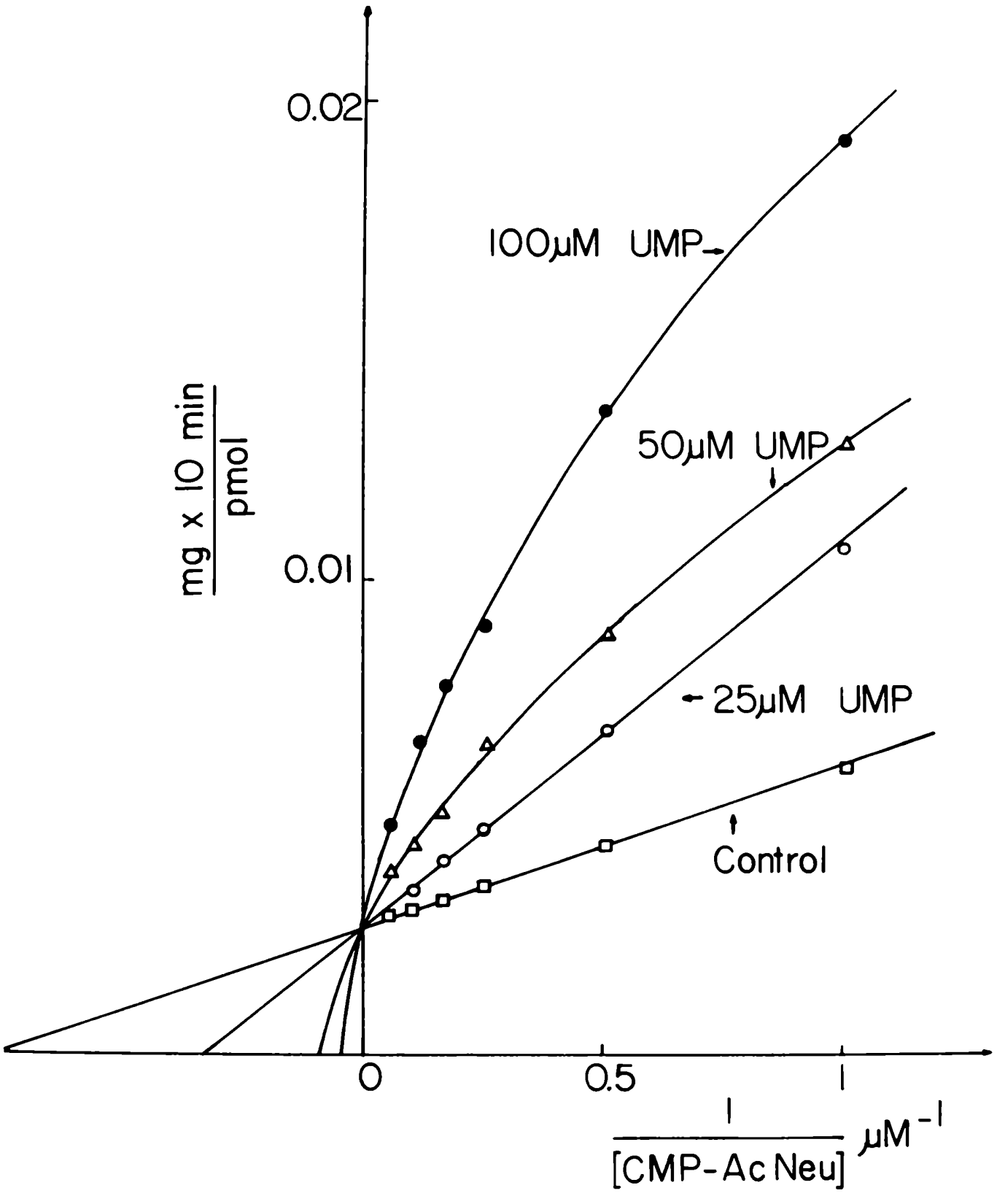

0.02
0.01
mg x 10 min / pmol
100µM UMP
50µM UMP
25µM UMP
Control
0
0.5
1
1 / [CMP-Ac Neu]
µM⁻¹

FIGURA IV-3

Inhibición de la translocación de CMP–AS (igual CMP–AcNeu) hacia el lumen de las vesículas de Golgi por 5'–UMP. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y se calcularon como se describe en el capítulo II, por ejemplo el S_i obtenido con 1 μM CMP–AS fue de 138 pmol/mg.P/10 min.

Concentraciones de UMP: 0 μM (cuadrados), 25 μM (círculos blancos), 50 μM (triángulos) y 100 μM (círculos negros).

FIGURA IV-4

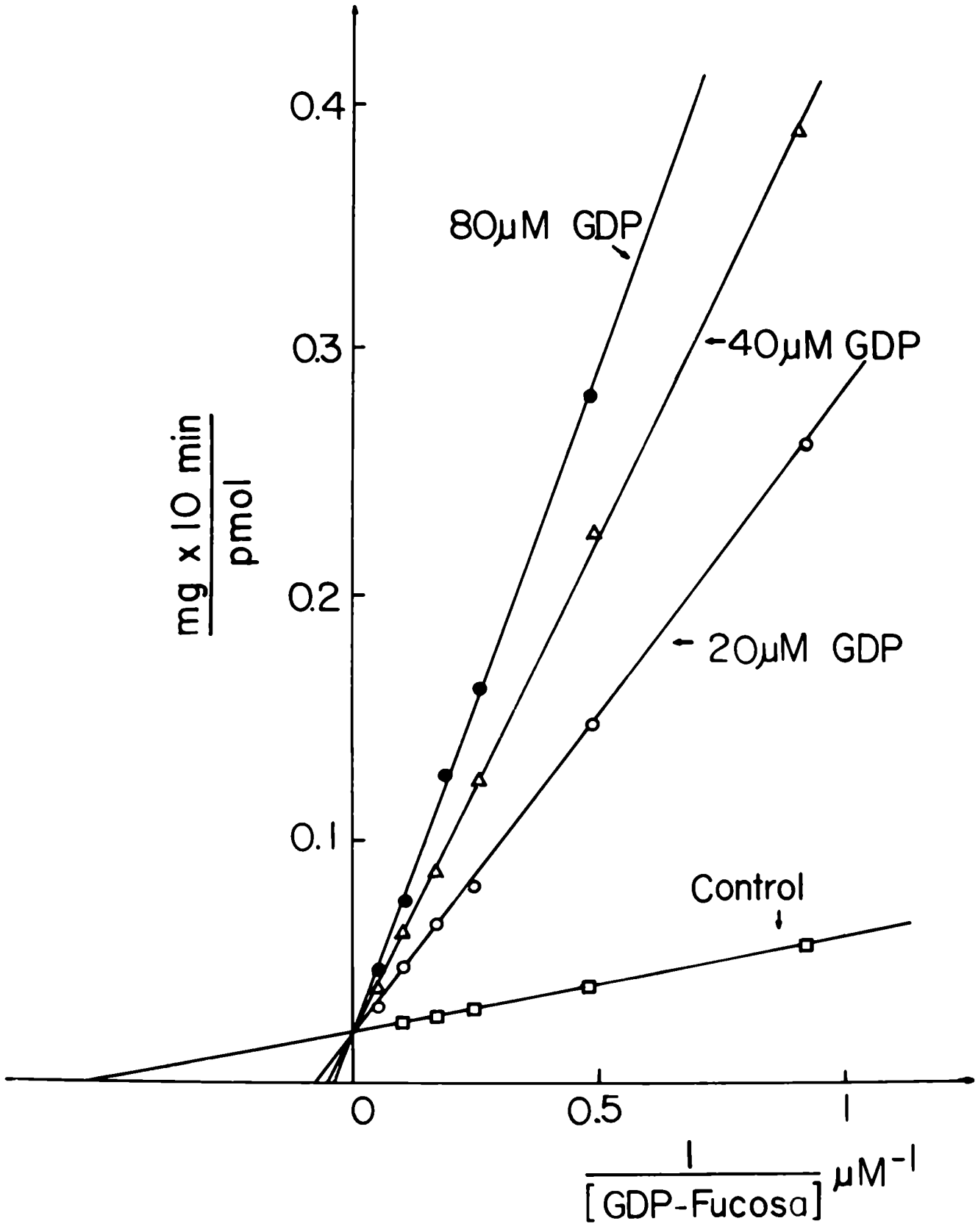

0.4
0.3
0.2
0.1
mg x 10 min / pmol
80µM GDP
40µM GDP
20µM GDP
Control
0
0.5
1
1 / [GDP-Fucosa] µM⁻¹

FIGURA IV-4

Inhibición de la translocación de GDP–F hacia el lumen de las vesículas de Golgi por 5'–GDP. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y se calcularon como se describe en el capítulo II, por ejemplo el S_1 obtenido con 1 μM GDP–F fue de 17 pmol/mg.P/10 min.

Concentraciones de GDP: 0 μM (cuadrados), 20 μM (círculos blancos), 40 μM (triángulos) y 80 μM (círculos negros).

FIGURA IV-5

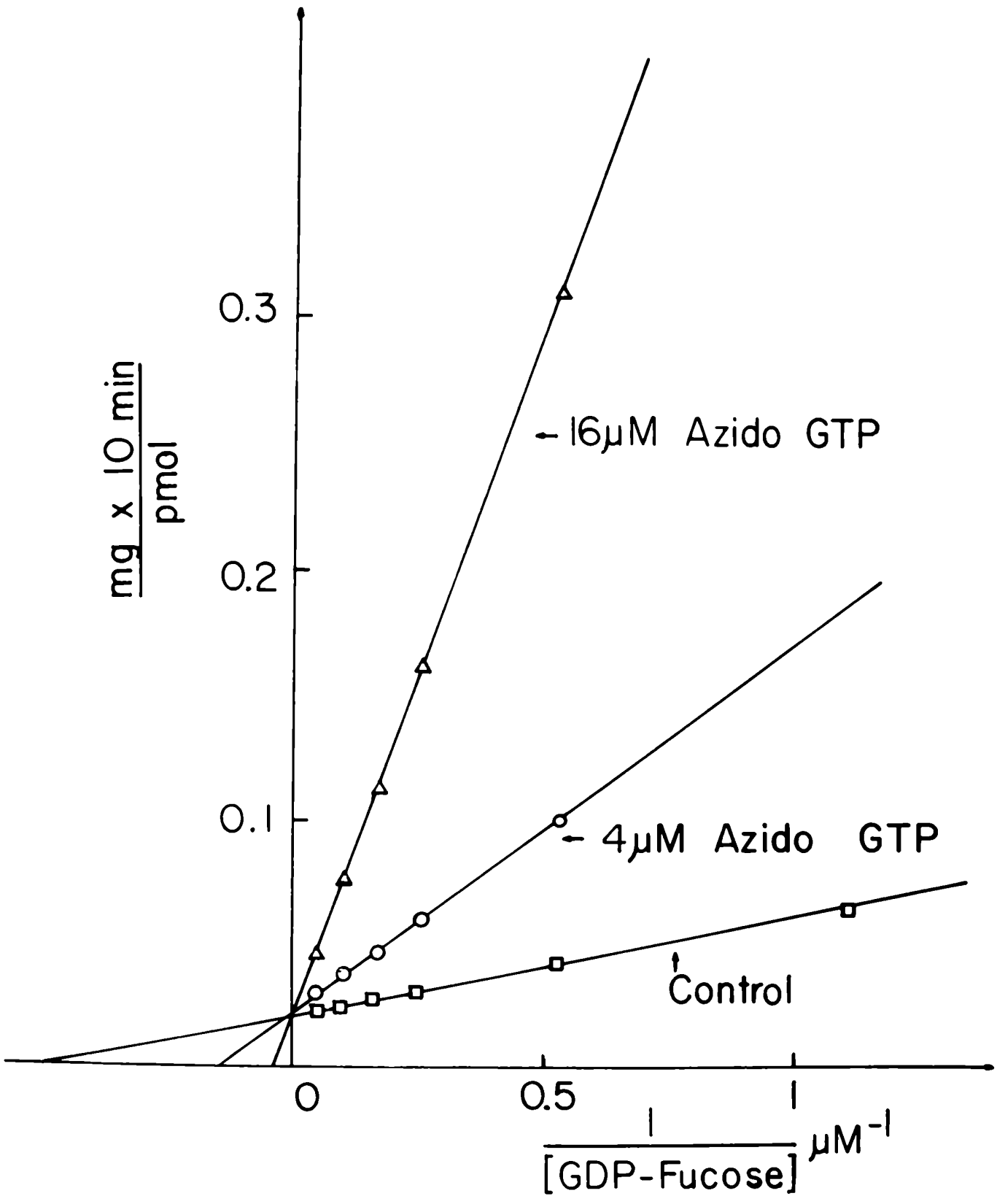

0.3
0.2
0.1
mg x 10 min / pmol
16μM Azido GTP
4μM Azido GTP
Control
0
0.5
1
1 / [GDP-Fucose] μM⁻¹

FIGURA IV-5

Inhibición de la translocación de GDP–F hacia el lumen de las vesículas de Golgi por 8-azido-5'-GTP. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y se calcularon como se describe en el capítulo II, por ejemplo el S_i obtenido con 1 μM GDP–F fue de 16 pmol/mg.P/10 min.

Concentraciones de azido-GTP: 0 μM (cuadrados), 4 μM (círculos) y 16 μM (triángulos).

CAPITULO V

EFECTOS PRODUCIDOS SOBRE LA TRANSLOCACION POR: ATRACTILOSIDOS, PALMITOIL COENZIMA-A E INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ANIONES

INTRODUCCION

Como se ha demostrado en los capítulos anteriores 3', 5'—ADP es un inhibidor muy activo de la translocación de PAPS a través de la membrana del aparato de Golgi. La coenzima A también posee grupos fosfato en las posiciones 3' y 5' de la adenosina, fue por lo tanto importante determinar si esta molécula y/o sus tioésteres con ácidos grasos eran también efectivos inhibidores de aquel proceso de transporte.

Está demostrado que algunos de los acil-CoA son capaces de inhibir procesos específicos de translocación, como es por ejemplo el caso del sistema mitocondrial de intercambio de ATP/ADP (79-81) y han sido usados recientemente para identificar y aislar la proteína translocadora.

Mientras se llevaban a cabo estos experimentos estudiando el efecto producido por distintos acil-CoA sobre el transporte de PAPS, se descubrió inesperadamente que éste es también inhibido por atractilósido y carboxiatractilósido.

Estos compuestos de origen vegetal no tienen ninguna semejanza estructural ni con PAPS ni con los acil-CoA y son sumamente tóxicos ya que son potentes inhibidores del intercambio de ATP/ADP mitocondrial y hasta ahora se consideraban específicos del mismo (82-84). Por otra parte también han sido utilizados para identificar y purificar la proteína responsable (85-91).

Por lo tanto como pal-CoA y los atractilósidos parecen ser inhibidores específicos de la translocación de PAPS en el Golgi, es muy probable que puedan ser utilizados para identificar y purificar el translocador por métodos semejantes a los usados con el translocador de la mitocondria.

Por otra parte, tanto los nucleótido azúcares como el PAPS son aniones a pH fisiológico. Inhibidores del transporte de aniones como DIDS y SITS han sido sintetizados y usados para identificar y aislar la proteína transportadora de aniones de la membrana del glóbulo rojo (92) y para identificar el presunto translocador de glucosa 6-fosfato en el retículo endoplasmático de hepatocitos de rata (93-94).

Estos últimos trabajos nos indujeron a comprobar si los derivados del estilbeno eran también inhibidores de la translocación de nucleótido azúcares y PAPS a través de la membrana del Golgi, y de ser así, si podían usarse como herramientas para identificar y/o aislar las presuntas proteínas transportadoras.

RESULTADOS:

Efecto de DIDS y SITS sobre la translocación:

Estudios previos han mostrado que DIDS y SITS son inhibidores del transporte de aniones a través de diferentes tipos de membrana, como la plasmática de eritrocito y la del retículo endoplasmático de hígado de rata (92, 93).

Como los nucleótido azúcares y PAPS tienen a pH fisiológico una carga negativa neta de 2 y 4 unidades respectivamente, fue importante determinar si su translocación era afectada o no por esos inhibidores del transporte aniónico.

Cuando vesículas de Golgi recientemente preparadas (sin ASB) se preincubaron con DIDS o SITS y luego fueron sometidas a los ensayos normales de penetración, se detectó un notable decrecimiento en el transporte de nucleótido azúcares y PAPS a través de la membrana.

Como se muestra en la figura V-1 la translocación de GDP-F, de CMP—AcNeu y de PAPS fue inhibida por DIDS en una forma dependiente de la concentración del mismo.

La translocación de GDP-F fue inhibida en un 50 % con una concentración de 10 μM DIDS, mientras que una de 17 μM fue requerida para producir un efecto semejante en la de PAPS.

Para estos dos nucleótido derivados, la temperatura a que las vesículas fueron incubadas con DIDS (4 o 25ºC) no tuvo ningún efecto sobre la inhibición del transporte. En cambio sí lo tuvo en el caso de CMP-AcNeu (figura V-1) ya que la concentración de DIDS necesaria para producir un 50 % de inhibición fue de 19 μM a 25ºC (comparable a los casos anteriores) pero de 70 μM a 4ºC. La causa de este particular efecto no está aclarada.

Como se mencionó anteriormente SITS resultó también un efectivo inhibidor, pero a concentraciones de 5 a 10 veces superiores a las de DIDS, lo cual coincide con lo descripto en la literatura (92, 93). Así la concentración de SITS requerida para inhibir la translocación de PAPS en un 50 % fue de 100 μM.

Estos inhibidores produjeron sobre el transporte de UDP-gal (datos no mostrados), un efecto comparable al producido sobre el de CMP-AcNeu y el de PAPS.

Características de la inhibición producida por DIDS:

Estudios de saturación del transporte por substrato en vesículas tratadas con diferentes concentraciones de DIDS, mediante gráficos de transformaciones doble recíprocas (1/V en función de 1/S), mostraron que la inhibición producida no es competitiva, ya que tanto en el caso de PAPS como en el de CMP-AcNeu se produce una disminución apreciable en la Vmax.

Sin embargo tampoco es no competitiva ya que aumenta considerablemente la KM.

Es decir las rectas no se intersectan ni sobre el eje de ordenadas ni sobre el de abcisas. Por ejemplo para el transporte de CMP-AcNeu en presencia de 80 μM DIDS, la KM aumenta de 1,4 a 13,3 μM y la Vmax disminuye de 465 a 263 pmol/mg.P/10 min.

El hecho de que efectivos inhibidores competitivos de la translocación, como 5—Br—dCMP y 3',5'—ADP, son incapaces de proteger a los respectivos transportadores contra la acción de DIDS, sumado a los resultados cinéticos presentados anteriormente, sugiere que esta molécula actúa sobre un sitio distinto al centro activo de transporte y/o que la interacción es irreversible. Si bien no se ha demostrado que la unión DIDS-transportador sea covalente como se indica en la literatura (92, 93), sí se ha comprobado que es fuerte y estable ante varios tratamientos.

Como puede verse en la tabla V—1, una vez que las vesículas han sido expuestas a una concentración dada de DIDS, el efecto inhibidor es el característico de dicha concentración y no el de la concentración obtenida por dilución de la preparación, previo al ensayo de transporte. Como control positivo se realizó el mismo tipo de experimentos con inhibidores competitivos.

Tampoco pudo recuperarse la actividad por diálisis exhaustiva. Solamente pudo removerse ligeramente la inhibición por dilución de las vesículas en presencia de 0,5 % ASB y recuperación de las

mismas por ultracentrifugación (tabla V-I).

Resultados idénticos a los descriptos para el transporte de PAPS se obtuvieron con el de CMP-ACNeu (datos no mostrados).

La sulfatación en las vesículas de Golgi es precedida por la translocación de PAPS:

La evidencia presentada en los capítulos anteriores ha demostrado que en adición al transporte de PAPS a través de la membrana y hacia el lumen de las vesículas, ocurre también la transferencia de sulfato (derivado del PAPS) a macromoléculas que se encuentran en la faz lumenal del Golgi (55). Precisamente se había hipotetizado que este proceso ocurría subsecuentemente a la translocación de la molécula de PAPS.

Evidencia directa a favor de esa hipótesis fue obtenida determinando el efecto de DIDS sobre: a) el transporte de PAPS al lumen de las vesículas y b) la transferencia de sulfato de PAPS a macromoléculas en vesículas de Golgi tratadas con detergente.

Los resultados que se presentan en la tabla V-2 muestran que dos concentraciones diferentes de DIDS producen una inhibición paralela de la translocación de PAPS y de la transferencia de sulfato. También puede verse que la inhibición de este último proceso no fue el resultado de la acción directa de DIDS sobre las sulfotransferasas.

Efecto de palmitoil-CoA y atractilósidos sobre el transporte:

Como se ha demostrado previamente el transporte de PAPS a través de la membrana del Golgi es inhibido por 3', 5'—ADP pero no por 2', 5'—ADP. Como la CoA también tiene grupos fosfato en las posiciones 3' y 5' de la ribosa, fue de interés determinar si la misma o sus acil derivados afectan la translocación de PAPS.

La tabla V-3 muestra que pal-CoA a una concentración de 9 μM inhibe la translocación de PAPS en un 50% y a 20 μM en un 65%. En cambio la CoA la inhibe en aproximadamente un 15% y en forma independiente de su concentración.

Tampoco el palmitato de sodio, aún en concentraciones de 100 μM, tuvo un efecto inhibitorio (tabla V-3).

La inhibición producida por pal-CoA parece ser específica para el transporte de PAPS ya que no se observó ningún efecto sobre la translocación de GDP-F y CMP-AcNeu a 20 μM pal-CoA y sólo una inhibición de 20 a 30 % a 50 μM, concentración a la cual el transporte de PAPS es prácticamente inexistente.

También muestra la tabla V-3 que la inhibición es directamente proporcional al largo de la cadena hidrocarbonada del ácido graso.

Recientemente se ha determinado que la concentración miscelar crítica para pal-CoA está en el orden de 30 a 40 μM (95), lo cual sugiere que la inhibición producida por esa molécula sobre el transporte de PAPS no es el resultado de un efecto inespecífico de detergente.

Se ha demostrado previamente que los acil-CoA inhiben la translocación de ATP y ADP en la mitocondria con dependencia del largo del ácido graso (79-81), especialmente pal-CoA y a concentra-

ciones similares a las usadas en el estudio sobre las vesículas de Golgi.

En consecuencia fue de interés determinar si carboxiatractilósido y atractilósido, los cuales han sido ampliamente usados como inhibidores del intercambio de ATP/ADP en la mitocondria, eran también activos en inhibir el transporte de PAPS en el aparato de Golgi.

Como puede verse en la tabla V-4 ambos (CAT y AT) aparecen como muy específicos inhibidores del proceso mencionado anteriormente, ya que sólo efectos considerablemente menores fueron observados sobre la translocación de GDP-F y CMP-AcNeu, incluso a concentraciones tan altas como 50 μM (tabla V-4).

Por otra parte el ácido bongkrekico, un selectivo inhibidor del translocador mitocondrial (96), careció de efecto sobre el transporte de PAPS en concentraciones de hasta 50 μM (tabla V-4).

La razón de este hecho no está aclarada, sin embargo podría explicarse si el ácido bongkrekico no fuese capaz de atravesar la membrana del aparato de Golgi, ya que se sabe que este compuesto es capaz de unirse solamente a dominios lumenales del translocador de ATP/ADP

Como los resultados descriptos sugieren una similitud fisiológica y estructural entre ambos sistemas, es decir, el de intercambio de ATP/ADP de la mitocondria y el de translocación de PAPS de la membrana del Golgi, fue importante examinar la posibilidad de la existencia de un proceso de transporte de PAPS en la mitocondria.

Con este propósito las mitocondrias fueron precargadas con ATP radioactivo y el intercambio fue medido con las siguientes moléculas no radioactivas: 5'-ATP, 5'-ADP, 3', 5'-ADP y PAPS, en el medio de incubación. La tabla V-5 muestra que ni PAPS ni 3', 5'-ADP fueron capaces de promover un intercambio específico con el ATP radioactivo mitocondrial, en condiciones en que el 5'-ADP lo hizo muy activamente.

Tampoco dieron resultados positivos los experimentos de transporte directo de PAPS en la mitocondria (datos no mostrados). El conjunto de estos resultados demuestran casi con certeza que PAPS no es translocado por las membranas mitocondriales.

DISCUSION:

La inhibición producida por DIDS sobre la translocación de PAPS a través de la membrana del aparato de Golgi ha provisto la evidencia más fuerte hasta el momento, de que la transferencia del sulfato de PAPS a macromoléculas es precedida por el transporte de dicha molécula hacia el lumen de las vesículas (Tabla V-2).

Estudios previos en otras membranas han hecho uso de DIDS radioactivo para purificar la proteína transportadora de aniones de la membrana del eritrocito (92) y para identificar el presunto translocador de glucosa 6-fosfato del retículo endoplasmático (94). Sin embargo los resultados presentados en este capítulo, donde se demuestra la falta de especificidad del efecto inhibitorio de DIDS sobre el transporte de nucleótido azúcares y PAPS a través de la membrana del Golgi (figura V-1), hacen mucho menos atractivo el uso de DIDS para aislar esas presuntas proteínas translocadoras.

Las concentraciones de DIDS y SITS requeridas para inhibir la translocación de nucleótido azúcares y PAPS resultaron considerablemente menores que aquellas reportadas para producir el mismo efecto sobre el transporte de glucosa 6-fosfato a través de la membrana del retículo endoplasmático, así para inhibir este último proceso en un 50 % se requirieron 35 μM DIDS y 230 μM SITS (93). Sin embargo las concentraciones necesarias para obtener un efecto inhibitorio en la membrana del Golgi fueron entre 8 y 16 veces mayores que las reportadas para producir un 50 % de inhibición

sobre el transporte de cloruro y sulfato a través de la membrana plasmática del glóbulo rojo (92).

El resultado más sorpresivo obtenido en este proyecto fue la inhibición producida por CAT y AT sobre el transporte de PAPS en el Golgi a concentraciones similares a las reportadas para inhibir el intercambio de ATP/ADP en la mitocondria (por ejemplo, 2μM AT se requieren para inhibir en un 35 % el intercambio de ATP/ADP y 8μM para obtener el mismo porcentaje de inhibición sobre la translocación de PAPS).

Además, este efecto inhibitorio aparece como específico para PAPS ya que prácticamente no se detectó ningún efecto sobre el transporte de nucleótido azúcares, ni de los que derivan de purinas ni de los que derivan de pirimidinas (tabla V-4).

Estos resultados sugieren que el translocador de ATP/ADP mitocondrial y el hipotético translocador de PAPS del Golgi tienen características estructurales en común, aunque es improbable que sean idénticos en virtud de la incapacidad para transportar PAPS de la mitocondria (tabla V-5).

El atractilósido ha sido usado en numerosos estudios sobre la inhibición del intercambio de ATP/ADP en mitocondrias aisladas (82-91) y también en células totales (97-99). Los resultados mostrados sugieren que deberá tenerse un gran cuidado en el análisis de los datos obtenidos con células enteras, ya que el efecto de ese inhibidor no parece estar restringido a una función particular de una dada organela (mitocondria).

La inhibición específica producida por pal-CoA sobre la translocación de PAPS, en cambio, era predecible en vista de la presencia de grupos fosfato en las posiciones 3' y 5' de la adenosina. Sin embargo, lo sorprendente fue que la CoA por si sola no inhibiera eficazmente. Es posible que la porción hidrofóbica del ácido graso permite una unión mejor de la coenzima con el sitio activo de la proteína translocadora de PAPS.

La falta de inhibición producida por pal-CoA sobre el transporte de los nucleótido azúcares, sumado a la baja concentración necesaria para inhibir el de PAPS (por debajo de la concentración miscelar crítica), descarta la posibilidad de que la inhibición se deba a un efecto de detergente, es decir por solubilización de la membrana del Golgi.

Es tentador especular que el efecto producido por pal-CoA es fisiológicamente significativo, aunque no hay resultados para substanciar esta hipótesis.

En el caso de la mitocondria de hígado existen resultados que sugieren que el efecto de pal-CoA sobre la translocación de ATP/ADP puede producir un aumento de la velocidad de carboxilación de piruvato versus oxidación. Lo cual a su vez podría tener un rol en la regulación de la gluconeogénesis (80, 100-101).

Tanto pal-CoA como atroctilósido radioactivo han sido utilizados previamente para aislar la proteína translocadora de ATP/ADP de la mitocondria (85-91). La especificidad de la inhibición producida por estos compuestos sobre el transporte de PAPS, hace muy atractivo su uso para tratar de identificar y aislar la proteína translocadora de nucleótido sulfato en el aparato de Golgi.

TABLA V-1

UNION DE DIDS Y 3', 5'-ADP A LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI:

Concentración en el medio (μM)		Transporte de PAPS
Inicial	Final	S_i exptal./S_i control
DIDS		
10	10	0,83
40	40	0,06
40	10	0,05
40	0 (reaislada con ASB)	0,19
20	20	0,39
60	60	0,01
60	20	0,01
60	0 (reaislada con ASB)	0,06
3',5'-ADP		
2	2	0,32
10	10	0,09
10	2	0,34
10	0 (reaislada con ASB)	0,98

Alícuotas de 1 ml de una preparación de vesículas de Golgi se incubaron con 10 μM 3', 5'-ADP, con 40 y 60 μM DIDS o sin ningún tipo de adición por 20 min en hielo, luego se diluyeron con 9 ml de 0,5 % ASB en STM, se precipitaron a 10^5 x g por 30 min y se resuspendieron en el volumen inicial de STM.

Fracciones de 100 μl (0,44 mg de proteína) de vesículas obtenidas como se indica más arriba fueron incubadas en los volúmenes apropiados, o bien con las concentraciones iniciales indicadas de DIDS y 3', 5'-ADP (aquellas preincubadas sin ninguna adición), o sin ningún agregado (aquellas pretratadas con DIDS y 3', 5'-ADP.)

Después de 20 min en hielo todas las muestras se llevaron a un volumen de 990 μl, e inmediatamente se inició el ensayo de penetración por adición de 10 μl de [^{35}S]PAPS (0,73 nmol) y elevación de la temperatura a 25°C. El S_i del control fue de 21,9 pmol/mg.P/10 min., y los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes.

TABLA V-2

EFECTO DE DIDS SOBRE LOS PROCESOS DE SULFATACION EN EL GOLGI

DIDS	S_i exp/ S_i cont.	Ins. exp/ Ins. cont.	AST exp/ AST cont.
10 μ M	0,88	0,77	0,97
40 μM	0,23	0,27	0,99

Vesículas de Golgi (0,6 mg.P/ml) fueron incubadas con 10 μM y 40 μM DIDS a 25°C y reaisladas como se describe en la leyenda de la tabla V-1. La translocación de PAPS (S_i) y la incorporación de sulfato a macromoléculas (Ins.) fueron medidas como se describe previamente (capítulos II y III). La cantidad de solutos dentro de las vesículas para los controles fue de 20 pmol/mg.P/10 min. y la de sulfato incorporado a macromoléculas endógenas fue de 59 pmol/mg.P/10 min.

La actividad de sulfotransferasa (AST) fue medida usando 10 μM[^{35}S]PAPS (0,2 Ci/mmol) con vesículas tratadas como se describe más arriba (0,17 mg.P) en un volumen de 200 μl de buffer (16 mM fosfato de sodio pH 7,5; 0,1 M FNa; 0,1 % Tritón X-100). Después de una incubación a 37°C por 1 hora, la radioactividad ácido insoluble se midió como se describe para la sialiltransferasa. Los controles incorporaron 72 pmol/mg.P/h.

Todos los valores son duplicados de experimentos independientes.

TABLA V-3

EFECTO PRODUCIDO SOBRE LA TRANSLOCACION DE NUCLEOTIDO DERIVADOS AL APARATO DE GOLGI POR PALMITATO, COENZIMA-A Y SUS TIOESTERES

	S_i experimental/S_i control		
	GDP-F	PAPS	CMP-AS
Palmitoil-CoA (μM)			
5		0,70	
10		0,46	
20	0,97	0,34	0,97
30		0,17	
50	0,71	0,07	0,82
Palmitato de sodio (μM)			
20		1,11	
50		1,26	
100		1,06	
Coenzima A (μM)			
5		0,78	
20		0,86	
30		0,93	
Acetil-CoA (μM)			
30		0,83	
Octanoil-CoA (μM)			
30		0,56	

Las vesículas de Golgi (0,3 a 0,4 mg de proteína) fueron incubadas por 10 min a 25ºC con los diferentes nucleótido derivados radioactivos. La translocación se midió como se describe en el capítulo II y los resultados obtenidos con los controles fueron: para PAPS 29 pmol/mg.P/10 min; para CMP-AS, 224 pmol/mg.P/10 min. y para GDP-F, 31 pmol/mg.P/10 mi·· Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes.

TABLA V-4

EFECTO PRODUCIDO SOBRE LA TRANSLOCACION DE NUCLEOTIDO DERIVADOS AL APARATO DE GOLGI POR ATRACTILOSIDOS Y ACIDO BONGKREKICO:

	S_i experimental/S_i control		
	PAPS	CMP-SA	GDP—F
Carboxiatractilósido (μM)			
5	0,78		
10	0,58		
20	0,46	1,07	0,90
50	0,35	1,03	0,87
100	0,23	0,92	0,89
50 CAT + 50 AT	0,23	0,95	0,85
Atractilósido (μM)			
5	0,75		
10	0,59		
20	0,46	0,96	0,91
50	0,31	0,97	0,85
100	0,27	1,03	0,88
Acido bongkrekico (μM)			
5	0,85		
20	0,87		
50	0,89		

Las vesículas de Golgi (0,3 a 0,4 mg de proteínas) fueron incubadas como se describe en la leyenda de la tabla V-3. Los resultados obtenidos con los controles fueron: para PAPS 41 pmol/mg.P/10 min, para CMP-AS 284 pmol/mg.P/10 min y para GDP-F 25 pmol/mg.P/10 min. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes.

TABLA V-5

INTERCAMBIO DE [^{3}H]ATP, PRECARGADO EN MITOCONDRIAS, CON NUCLEOTIDOS EXTERNOS

Nucleótido (300 μM)	% de [^{3}H]ATP intercambiado	
	+ CAT	– CAT
sin	0	0
5'–ATP	6,5	54,4
5'–ADP	12,3	76,5
PAPS	5,2	8,2
3',5'–ADP	9,6	7,3

Mitocondrias de hígado de rata fueron preparadas como se describió previamente (102). Para cargarlas con ATP, las mismas (12,4 mg.P) fueron incubadas por 1 hora en hielo con 10 μCi de [adenina-2,8–^{3}H]ATP en un volumen de 1 ml de buffer (0,25 M sacarosa; 20 mM Tris/ClH pH 7,2; 1 mM EDTA; 5 mM succinato de sodio; 0,4 μg de rotenona y 1 μM ATP frío).

Después de la incubación las mitocondrias fueron lavadas con tres ciclos de centrifugación (5 min a 8.000 x g) y resuspensión en el mismo buffer sin ATP.

Para medir el intercambio del [^{3}H]ATP mitocondrial con diversos nucleótidos del medio, 1 mg de mitocondrias precargadas fueron incubadas por 5 min a 25° C en un ml del buffer (sin ATP) más los nucleótidos respectivos. Cuando las muestras fueron pretratadas con carboxiatractilósido, 50 μM CAT fue agregado al medio de incubación (en hielo) 5 min antes de comenzar el ensayo de intercambio.

Las reacciones fueron detenidas poniendo las muestras en hielo y agregando 50 μM CAT a aquellas que no lo tuvieran. Inmediatamente fueron centrifugadas a 11.000 x g durante 5 min.

La radioactividad del sobrenadante y del pellet (previa disolución de éste en 1 ml de 1N (OHNa) fue determinada en Aquasol-2. El intercambio se calculó como está descripto (103) y los resultados son el promedio de dos experimentos independientes.

FIGURA V-1

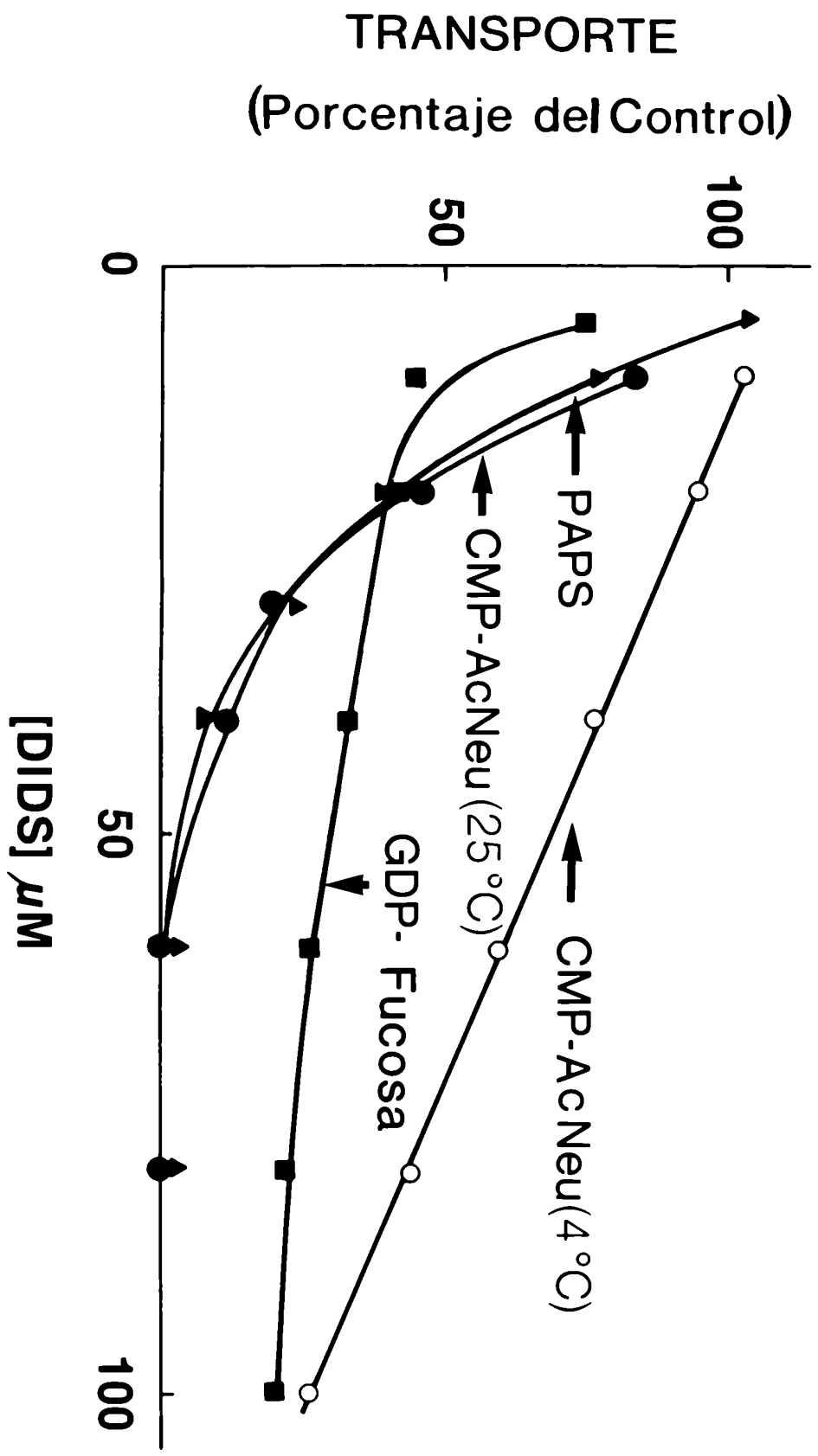

TRANSPORTE
(Porcentaje del Control)
0
50
100
[DIDS] µM
50
100
PAPS
CMP-AcNeu (25 °C)
GDP- Fucosa
CMP-AcNeu (4 °C)

FIGURA V-1

Efecto de DIDS sobre la translocación de nucleótido derivados hacia el lumen de vesículas de Golgi. Las vesículas (0,4 a 0,6 mg de proteínas) fueron incubadas en un volumen de 0,95 ml de medio de penetración con diferentes concentraciones de DIDS por 10 min a 4ºC o 25ºC. El ensayo se inició mediante la adición de 50 µl con la concentración apropiada de nucleótido derivados radioactivos. La translocación se midió como se describe en el capítulo II. La preincubación a 25ºC produjo una reducción en la actividad de transporte con respecto a los controles de un 10%, no se detectó esta disminución cuando la preincubación se realizó a 4ºC.

Las actividades de translocación en ausencia de DIDS fueron: 213 pmol/mg.P/10 min para CMP–AS, 29 pmol/mg.P/10 min para PAPS y 31 pmol/mg.P/10 min para GDP–F. Los resultados están expresados como porcentaje de los controles preincubados sin DIDS, y son el promedio de dos determinaciones separadas.

Los símbolos negros representan una preincubación a 25ºC y los círculos blancos una preincubación a 4ºC.

CAPITULO VI

MECANISMO DEL PROCESO DE TRANSPORTE A TRAVES DE LA MEMBRANA DEL APARATO DE GOLGI

INTRODUCCION:

Después de haber demostrado la existencia, en la membrana de Golgi, de un sistema de transportadores para diversos nucleótido azúcares y PAPS, de haber estudiado las características estructurales requeridas a un nucleótido derivado para que éste sea reconocido y translocado por dichos translocadores y de haber descubierto el efecto inhibitorio producido por ciertos compuestos no relacionados con los substratos, el paso lógico a seguir fue el de tratar de dilucidar el mecanismo por el cual se produce el fenómeno de transporte.

Era obvio por todo lo descripto en los capítulos anteriores que no se trataba de un fenómeno de simple difusión (no mediado), ya que:

a) el proceso es saturable por el substrato, teniendo una Vmax y una KM característica para cada uno de ellos,

b) tiene una dependencia de la temperatura muy acentuada, por ejemplo en el caso de PAPS, una diferencia de 20°C produce un aumento de 12,5 veces en la velocidad de transporte, cuando lo esperado para un proceso no mediado es de apenas 2 veces,

c) es específico con respecto a la molécula transportada, es inhibido competitivamente por análogos estructurales y en forma casi irreversible por compuestos que tienen el mismo efecto sobre otros sistemas de transporte.

Todas estas son las características determinantes de un sistema de transporte mediado o como también se llama de difusión facilitada. Por lo tanto el objetivo de este proyecto fue el de determinar si este proceso era pasivo o activo y si existía o no cotransporte.

RESULTADOS:

El transporte activo está caracterizado por un estrecho acople del mismo con una fuente de energía, ya sea directa (normalmente hidrólisis de ATP) o indirectamente (existencia de gradientes electroquímicos a través de la membrana). Por lo tanto esta posibilidad fue descartada rápidamente al comprobarse que ni la presencia de ATP (salvo su actividad inhibitoria como análogo estructural), ni la de compuestos que colapsan gradientes electroquímicos, como ser valinomicina y CCFP que hacen la membrana libremente permeable a K^+ y H^+ respectivamente, tienen efecto sobre el transporte.

Por otra parte, era sabido por experimentos previos de doble marca, que las vesículas no solamente eran capaces de concentrar nucleótidos con respecto a su concentración en el medio de incubación (en algunos casos varios cientos de veces), sino que además, estos parecían salir de las mismas (52, 55-56).

Estos hechos, sumados a las semejanzas detectadas entre el transportador de PAPS y el translocador de ATP/ADP mitocondrial (capítulo 5), sugirieron la hipótesis de que la translocación se produciría a través de un mecanismo de intercambio mediado (antiport), entre el nucleótido azúcar o sulfato y alguno de los metabolitos nucleotídicos que generan las reacciones propias del lumen del aparato de Golgi.

La entrada de GDP-F parece ser concomitante con la salida de GMP:

El primer experimento realizado para comprobar si existía un acoplamiento entre la entrada del nucleótido azúcar y la salida del nucleótido fue de tipo estático. Es decir vesículas derivadas del aparato de Golgi se preincubaron con GDP-F, marcada con ^{3}H en la posición 8 del anillo guanidílico, durante 15 min a 25ºC, se precipitaron, lavaron y resuspendieron en el medio apropiado.

Posteriormente, alícuotas de esta preparación fueron incubadas a 25ºC sin o con 5μM GDP-F fría en el medio por 5 min y reaisladas.

Una vez realizadas las mediciones radioactivas pertinentes, pudo comprobarse que la presencia de GDP-F en el medio había provocado una liberación de un 61 % de la radioactividad contenida en las vesículas, mientras que en el otro caso la totalidad de las especies radioactivas permanecieron asociadas con las mismas.

Con el fin de obtener una mayor cantidad de datos y más precisos, se diseñó un experimento de tipo dinámico, para lo cual las vesículas fueron incubadas con [^{3}H]GDP-F por distintos tiempos, y fue determinada la cantidad total de especies radioactivas solubles en el interior de las mismas.

Como puede verse en la figura VI-1 hubo una acumulación de solutos radioactivos en las vesículas que fue dependiente del tiempo y que después de unos 10 min. la concentración de aquellos permaneció constante.

No se detectó, como era de esperar, radioactividad ácido insoluble.

En experimentos paralelos se agregó GDP—[^{14}C]F a suspensiones de vesículas de Golgi que habían sido preincubadas con [^{3}H]GDP-F por 1, 5 y 10 min, continuándose la incubación por 0,5 y 2 min adicionales.

La fig. VI-1 muestra que la adición de GDP-[^{14}C]F resulta en: a) un concomitante decrecimiento de solutos tritiados (más adelante se demuestra que es [^{3}H]GMP) y b) un incremento paralelo de especies marcadas con ^{14}C en las vesículas. Estas últimas demostraron ser, como se determinó previamente, la suma de compuestos radioactivos solubles en el lumen y de aquellos ligados covalentemente a macromoléculas que están en contacto con el mismo compartimento (52).

Por ejemplo, cuando vesículas que habían sido incubadas con [^{3}H]GDP-F por 10 min fueron tratadas por 2 min más con GDP-[^{14}C]F, un 50 % de la [^{14}C] fucosa dentro de las mismas fue insoluble en ácido.

Las especies solubles dentro de las vesículas, después de una incubación de 10 min con [^{3}H]GDP-F fueron: [^{3}H]GMP (65% a 90%) y [^{3}H] guanosina (10% a 35 %).

Los solutos marcados con ^{14}C dentro de las vesículas, después de 2 min adicionales de incubación con GDP-[^{14}C]F, resultaron ser fucosa, mientras que la radioactividad ácido insoluble se encontró en fucoproteínas. Todo lo cual coincide con resultados previos de nuestro laboratorio (52).

La salida de GMP depende específicamente de la entrada de GDP-F:

Dos tipos de experimentos se llevaron a cabo para determinar que la salida de GMP desde las vesículas de Golgi está acoplada específicamente a la entrada de GDP-F al lumen de las mismas:

a) Virtualmente no se detectó ninguna salida de solutos marcados con ^{3}H de vesículas que habían sido incubadas primero con [^{3}H]GDP-F durante 10 min y luego con GDP-[^{14}C]M por 5 min adicionales (fig. VI-1). Como se detalla en el capítulo IV este nucleótido azúcar no penetra en el aparato de

Golgi. Estos resultados sugieren fuertemente que la salida de [^{3}H]GMP detectada en el experimento previo es efectivamente dependiente de la entrada de GDP-F a la vesícula.

b) Cuando lo que se agregó a las vesículas tratadas con [^{3}H]GDP-F fue [^{35}S]PAPS, tampoco se detectó la salida de [^{3}H] GMP (fig. VI-1), sin embargo como era de esperar acumularon [^{35}S] sulfato, tanto en forma soluble como insoluble en ácido, en su interior. De acuerdo a lo que se ha demostrado en capítulos anteriores.

Por lo tanto el experimento descripto demuestra que después de 10 min. de incubación con [^{3}H]GDP-F, las vesículas de Golgi mantienen intacta su capacidad de translocar otros nucleótido derivados y una vez más que la salida de GMP depende únicamente de la entrada de GDP-F.

Evidencia adicional sobre la especificidad de la estimulación de la salida de GMP desde las vesículas se muestra en la tabla VI-1. En la misma puede verse que la adición de 1 y 10 μM GDP-F a preparaciones precargadas con [^{3}H]GDP-F producen la salida del 68 % y del 89 % respectivamente del [^{3}H]GMP que se encontraba en ellas. Por contraposición un efecto casi nulo fue producido por UDP-gal y UDP-N-AcGA, los cuales se sabe que son capaces de penetrar al Golgi (61).

La misma tabla muestra también que la salida de [^{3}H]GMP fue dependiente de la temperatura.

La adición de DIDS, un conocido inhibidor del transporte de GDP-F (capítulo V), a vesículas preincubadas con [^{3}H]GDP-F, produjo una inhibición de la salida de [^{3}H]GMP estimulada por GDP-F (tabla VI-1).

Todos estos resultados proveen evidencia adicional de que la salida de GMP es dependiente en forma estricta de la entrada de GDP-F a la vesícula.

Estequiometría entre la salida de GMP y la entrada de GDP-F:

Para medir la estequiometría de entrada de GDP-F a las vesículas y de salida de GMP de las mismas, debió hacerse una hipótesis realmente importante, que consiste en suponer que la actividad específica del GMP interno es, después de 10 min. de incubación, igual a la AE del nucleótido azúcar antes de empezarla, y ese valor fue el utilizado en los cálculos. Lo cual pareció estar razonablemente apoyado por los datos derivados de la fig. VI-1 que muestran que la cantidad de solutos tritiados dentro de las vesículas se mantiene constante después de los 10 min. de incubación, pareciendo indicar que se ha producido en ese tiempo un equilibrio entre el pool interno y el externo de nucleótidos.

Este problema deviene de que no puede calcularse la AE de cada especie soluble en el Golgi ya que se desconoce el tamaño del pool endógeno de GMP no radioactivo.

La tabla VI-2 muestra que existe una relación estequiométrica entre la salida de [^{3}H]GMP y la entrada de GDP-[^{14}C]F después de 1 y 2 min de incubación. Se interpretó que la pequeña diferencia existente entre la cantidad de [^{3}H]GMP que ha salido en comparación con la de GDP-[^{14}C]F que ha entrado era aparente y debida al hecho de haber supuesto que la AE del [^{3}H]GMP interno es exactamente igual a la AE inicial de la [^{3}H]GDP-F en el medio de incubación.

La AE del [^{3}H]GMP es obviamente siempre menor que esta última, alcanzando su máximo valor cuando los dos compartimentos están completamente equilibrados, lo cual se logra después de unos 10 min. de preincubación.

Como consecuencia de la presunción antedicha se predijo que a menores tiempos de preincubación, previos al equilibrio, la diferencia aparente entre la entrada y la salida de nucleótidos debía magnificarse. En la tabla VI-2 se muestra que eso fue lo sucedido, cuando la relación entrada/salida se calculó después de preincubar las vesículas con [^{3}H]GDP-F por solamente 1 min. y estimular

el intercambio con GDP-[^{14}C]F durante 1 min. adicional, la misma resultó mucho mayor que la unidad, reflejando una entrada aparentemente mayor de GDP-F con respecto a la salida de GMP. Por otra parte cuando fueron preincubadas por 5 min con [^{3}H]GDP-F, un tiempo mucho más próximo al de equilibrio (fig. VI-1), la diferencia aparente entre entrada y salida resultó similar a la obtenida después de 10 min. (tabla VI-2).

La salida de GMP de vesículas precargadas con GMP es específica:

Los experimentos descriptos en las secciones anteriores indican que la translocación de GDP-F a través de la membrana de las vesículas de Golgi está acoplada con la salida de GMP desde las mismas en una relación estequiométrica de 1:1.

Experimentos previos habían mostrado que las vesículas de Golgi (in-vitro) eran capaces de translocar GMP de un compartimento externo a su lumen.

Como además era sabido que el translocador de nucleótidos mitocondrial es no solamente capaz de intercambiar ATP/ADP, sino también ADP/ADP y ATP/ATP, fue importante determinar si era posible medir una salida de GMP estimulada por GDP-F, de vesículas precargadas con [^{3}H]GMP.

Con este propósito, suspensiones de vesículas fueron preincubadas con [^{3}H]GMP durante 20 min. a dicho tiempo GDP-[^{14}C]F fue agregada al medio y la cantidad de especies tritiadas remanentes en las vesículas como así también la de las especies marcadas con ^{14}C acumuladas dentro de las mismas, fue medida a diferentes tiempos de incubación (hasta 10 min.).

En la fig. VI-2 se muestra que después de la adición de GDP-[^{14}C]F a la suspensión se produjo: a) un rápido decrecimiento de la cantidad de solutos tritiados presentes en las vesículas y b) una veloz acumulación en el lumen de especies que contienen ^{14}C,solubles e insolubles en ácido.

Por ejemplo, la incubación con GDP-[^{14}C]F por 0,5 min produjo una salida de 2,6 pmol de [^{3}H]GMP y una entrada de 2,9 pmol de especies que contienen ^{14}C.

Estos resultados indican en forma similar a los mostrados en la fig. VI-1 y en la tabla VI-2, un intercambio equimolar entre GMP y GDP-F.

El estudio de la fig. VI-2, con respecto a la estequiometría del intercambio, a tiempos de incubación mayores que 0,5 min. sugirió que la cantidad de nucleótido azúcar que entra a la vesícula es mayor que la de nucleótido que sale (tabla VI-2). En realidad esta discrepancia es más aparente que real, ya que a tiempos más largos de incubación con GDP-[^{14}C]F, la hipótesis de que la AE de los solutos internos es igual a la AE de los solutos en el medio de incubación pierde su validez debido a que GMP no radioactivo, derivado del GDP-[^{14}C]F que ha entrado, produce una disminución de la AE del pool lumenal de [^{3}H]GMP.

La fig. VI-2 muestra también que la salida de GMP fue específica. Después de la adición a las vesículas de CMP-AcNeu, no pudo detectarse la salida de GMP a pesar de que las mismas son capaces de translocar este nucleótido azúcar con gran eficiencia.

El análisis por HPLC de los solutos presentes en el lumen de las vesículas precargadas con [^{3}H]GMP, antes y después del intercambio, demuestra que GDP-F estimula la salida de [^{3}H]GMP pero no la de [^{3}H]guanosina, por ejemplo el cociente entre la cantidad de [^{3}H]guanosina antes del intercambio y la cantidad después del mismo es de 1,1; mientras que la misma relación para [^{3}H]GMP es igual a 7.

También fue interesante determinar si la adición de GTP o GDP a vesículas precargadas con [^{3}H]GMP estimulaba la salida de este último. La tabla VI-3 muestra que efectivamente ambos son capaces de provocar la salida de [^{3}H]GMP, si bien el efecto resultó menor que el producido por la misma concentración de GMP. Lo cual sugiere que los nucleósidos tri y difosfatos fueron convertidos a monofosfatos antes de su entrada a las vesículas (presumiblemente por fosfatasas superficiales del Golgi). Sin embargo, la posibilidad de que la selectividad del transportador no sea absoluta, no puede descartarse totalmente.

Evidencia preliminar acerca de la generalidad de este mecanismo:

Estudios previos habían demostrado que las vesículas de Golgi son capaces de translocar también: CMP-AcNeu, PAPS, UDP-N-AcGa y UDP-gal. Por lo tanto se postuló la hipótesis de que estos cuatro nucleótido derivados entran a las vesículas del Golgi vía un intercambio acoplado con los nucleótidos monofosfatos correspondientes, el cual es equimolar.

Con el fin de obtener evidencia preliminar sobre la validez de la misma, las vesículas fueron incubadas durante 20 min con: [^{14}C]CMP, [^{3}H])UDP-N-AcGA, o [^{3}H]PAPS. Los resultados expuestos en la tabla VI-3 muestran que, efectivamente, la salida desde las vesículas de nucleótidos monofosfatos fue específicamente estimulada por el correspondiente nucleótido azúcar o nucleótido sulfato.

La cuantificación de los solutos que entran y salen de las vesículas mostró que lo hacen en una relación cercana a la unidad.

Como se discutió anteriormente, en relación con el par GDP-F/GMP, parte de la desviación con respecto a la unidad es debida a presunciones sobre la actividad específica de los solutos lumenales. Desgraciadamente no puede hacerse una determinación exacta de este parámetro debido a que se desconocen las concentraciones de los nucleótidos intrínsecos del Golgi.

Es también posible que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio sea para los derivados de pirimidina, diferente al de los derivados de purina.

Estos resultados por lo tanto, sugieren en forma preliminar, que el mecanismo de intercambio descripto en detalle para GDP-F es también válido para otros nucleótido azúcares y PAPS.

Efecto sobre la translocación de varios potenciales perturbadores:

Los siguientes compuestos carecieron de efecto sobre la translocación de CMP-AcNeu a través de la membrana de vesículas derivadas del aparato de Golgi, cuando fueron agregados al medio de incubación: ATP (200 μM), valinomicina (20 μg/ml), insulina (1 unidad/ml), CCFP (1 a 10 μM), citochalasina B (2 μg/ml), nigericina (1 a 10 μg/ml) y monensina (1 a 20 μM).

Los mismos compuestos más los siguientes: fosfoenolpiruvato (100 μM) y oligomicina (10 μg/ml), tampoco tuvieron efecto sobre la translocación de PAPS.

La acción de los ionóforos antes mencionados fue estudiada en el medio estándar del ensayo de penetración y también en presencia de distintas concentraciones de K^+ y/o Na^+.

DISCUSION:

La evidencia obtenida in-vitro ha demostrado que la entrada de GDP-F al lumen del Golgi parece estar acoplada a la salida de GMP en una relación equimolar (fig. VI-1). Este fenómeno resultó ser: dependiente de la temperatura (tabla VI-1), inhibido por un inhibidor específico de la translocación como es DIDS y específico con respecto al tipo de nucleótido azúcar. Así GDP-M, que es incapaz de penetrar la membrana del Golgi, no pudo estimular la salida de GMP (fig. VI-1).

Las vesículas utilizadas en estos estudios tuvieron la misma orientación topográfica que poseen in-vivo (63). Esto, en conjunto con el hecho de que GDP-F es sintetizada en el citoplasma (49) y con la evidencia previa de que la molécula intacta de GDP-F es translocada al lumen de dichas vesículas (52), nos llevó a postular que este proceso de translocación detectado in-vitro se produce también in-vivo, y es fisiológicamente relevante.

Los resultados descriptos en este capítulo nos llevan a postular que la translocación in-vivo de GDP-F se produce a través de un mecanismo antiport como el que se muestra en la fig. VI-3.

Varias líneas de evidencia soportan el modelo presentado:

GDP-F es sintetizada en el citoplasma (49) y translocada intacta a través de la membrana (52) vía una proteína translocadora antiport.

Los nucleótido azúcares se unen a la proteína antiport a través de su parte nucleotídica, aunque el azúcar determina si se producirá o no la translocación (capítulo IV, 57).

Una vez en el lumen, la GDP-F sirve como substrato juntamente con aceptores endógenos (glicoproteínas y glicolípidos) de la fucosilación catalizada por las fucosil transferasas. Se sabe que estas enzimas se encuentran en el Golgi (43, 104) y evidencia consistente con una orientación lumenal de las mismas, como así también de los productos fucosilados, ha sido obtenida (52).

El GDP producto de la acción de las fucosil transferasas es posteriormente degradado a GMP por una nucleósido difosfatasa. Esta enzima, que parece ser la misma que la tiamina pirofosfatasa (105), tiene su centro activo hacia el lumen del Golgi según resultados bioquímicos y citoquímicos (15, 106-109). Además la presencia de GMP en el lumen de las vesículas de Golgi ha sido detectada (52, 110) y puede en consecuencia salir de las mismas, vía un intercambio equimolar acoplado con GDP-F adicional.

También se ha obtenido evidencia sugiriendo que otros nucleótido azúcares y PAPS entran al Golgi vía "antiports" específicos. Fue mostrado que la salida de nucleótido monofosfatos radioactivos (los cuales han sido cargados en las vesículas durante una incubación inicial) puede ocurrir únicamente si los correspondientes nucleótido azúcares entran al Golgi (tabla VI-3). Este intercambio acoplado también parece ser equimolar, sin embargo son necesarios estudios definitorios sobre el particular.

Un intercambio acoplado específico y equimolar fue también observado con vesículas precargadas con UDP-N-AcGA o PAPS marcados en el nucleótido. Estudios previos de nuestro y otros laboratorios sugieren que las especies que dejan el Golgi son UMP y 3'-AMP respectivamente (76, 55).

En el caso de los nucleótido azúcares el modelo propuesto no es electrogénico, ya que el intercambio se produce entre moléculas de igual carga, 2 unidades negativas en todos los casos.

El caso de PAPS es diferente, ya que el intercambio parece producirse entre una molécula con carga -4 (PAPS) y una de carga -2 (3'-AMP), sin embargo esto no representa un problema ya que en un sistema tan complejo como el Golgi, el equilibrio eléctrico puede restablecerse por el transporte de otros iones. Como ejemplo clásico, algo similar ocurre con el intercambiador mitocondrial de

ATP^{-4}/ADP^{-3}, en el cual la diferencia de carga es equilibrada por el transportador de fosfato. Tampoco puede descartarse la posibilidad de que in-vivo el par de intercambio sea $PAPS^{-4}$/3',5'—ADP^{-4} a pesar de que in vitro no hayamos podido detectar la presencia de este nucleótido en las vesículas de Golgi (capítulo 3).

Kuhn y White (77) y Brandan y Fleisher (76) han mostrado previamente que UMP (derivado de UDP-gal) salía del lumen de vesículas de Golgi derivadas de glándula mamaria e hígado de rata. Esto fue postulado como un mecanismo para evitar la acumulación de UMP en las mismas.

Nuestros resultados están de acuerdo con esas observaciones y además sugieren que ambos, la entrada de nucleótido azúcar y la salida de nucleótido monofosfato, están acoplados en forma equimolar. Constituyendo un sistema de transporte por difusión facilitada del tipo antiport.

TABLA VI-1

EFECTO DE NUCLEOTIDO AZUCARES, TEMPERATURA E INHIBIDORES DEL TRANSPORTE ANIONICO SOBRE LA SALIDA DE [^{3}H]GMP DE VESICULAS PREINCUBADAS DURANTE 10 MIN CON [^{3}H]GDP–F

	Incubación	Salida
Substrato	Tiempo (min)	% [^{3}H]GMP remanente
GDP–F (1 μM)	10	32
GDP–F (10 μM)	10	11
GDP–F (1 μM)/DIDS	10	68
GDP–F (2 μM)/4°C	10	80
UDP–N–AcGA (3 μM)	2	100
	5	100
UDP–gal (25 μM)	10	89
PAPS (2 μM)	2	100
	5	100

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descriptas en la leyenda de la figura VI–1. DIDS (5 μl, 100 μM de concentración final) fue agregado después de la preincubación y 5 min más tarde se adicionó 1 μM GDP-F. Para estudiar el efecto de la temperatura, la reacción fue enfriada a 4°C después de preincubar y el ensayo se continuó a dicha temperatura.

Los resultados mostrados son el promedio de tres o más experimentos independientes.

TABLA VI–2

ESTEQUIOMETRIA DE LA ENTRADA Y LA SALIDA DE NUCLEOTIDOS DE GUANIDINA EN LAS VESICULAS DE GOLGI

Preincubación		Incubación		^{3}H	^{14}C	
Substrato	Tiempo min	Substrato	Tiempo min	Salida pmol	Entrada pmol	E/S
[^{3}H]GDP-F	1	GDP-[^{14}C]F (2 μM)	1	4,8	19,0	4,0
	5		1	16,0	19,1	1,2
	10	GDP–[^{14}C]F (0,45 μM)	1	8,2	9,5	1,2
	10		2	10,8	13,3	1,2
[^{3}H]GMP	20	GDP–[^{14}C]F (2 μM)	0,5	2,6	2,9	1,1
	20		1	10,7	25,4	2,4
	20		10	14,9	47,1	3,2

Las vesículas fueron incubadas primero con [^{3}H]GDP-F o [^{3}H]GMP como se describe en las leyendas de las figuras VI-1 y VI-2. A diferentes tiempos se agregó GDP–[^{14}C]F a la suspensión durante 0,5 a 10 min. La determinación de la cantidad de solutos que entraron o salieron de las vesículas se hizo como se describe en la fig. VI-1.

E/S: Cociente entre la entrada de GDP–F y la salida de GMP.

Los resultados mostrados son el promedio de por lo menos tres experimentos independientes.

TABLA VI–3

EFECTO DE NUCLEOTIDO DERIVADOS SOBRE LA SALIDA DE NUCLEOSIDO MONOFOSFATOS DE VESICULAS DE GOLGI PRECARGADAS CON NUCLEOSIDO MONOFOSFATOS O NUCLEOTIDO AZUCARES

Preincubación (20 min)	Incubación		Salida		Entrada	E/S
Substrato	Substrato	Tiempo min.	% Remanente	pmol	pmol	
[^{3}H]GMP (0,4 μM)	GTP (1 μM)	1	60			
	GDP (1 μM)		46			
	GMP (1 μM)		22			
	GDP-[^{14}C]F (1 μM)		29	19,3	22,9	1,2
	GDP–M (1 μM)		93			
[^{14}C]CMP (0,48 μM)	CMP–[^{3}H]AcNeu (1 μM)		43	70,7	124,8	1,8
	CMP (1 μM)		33			
	UDP-N-AcGA (1 μM)	5	85			
[^{3}H]PAPS (0,5 μM)	[^{35}S]PAPS (1 μM)	1	59	25,3	29,2	1,2
	GDP–F (1 μM)	5	96			
[^{3}H]UDP-N-AcGA (0,39 μM)	UDP-[^{14}C]N-AcGA (2,1 μM)	1	46	121,5	248,7	2,0
	[^{14}C]UMP (2μM)	1	50	109,3	262,4	2,4

Las vesículas fueron incubadas primero por 20 min con: [^{3}H]GMP, [^{14}C]CMP, [^{3}H]PAPS y [^{3}H]UDP-N-AcGA. Posteriormente diferentes nucleótido derivados radioactivos y no radioactivos fueron agregados al medio de incubación por 1 a 5 min. Todos los cálculos fueron hechos de acuerdo a lo descripto en la leyenda de la fig. VI-1.

E/S: Cociente entre la entrada y la salida.

Los resultados mostrados son el promedio de por lo menos tres experimentos independientes.

FIGURA VI-1

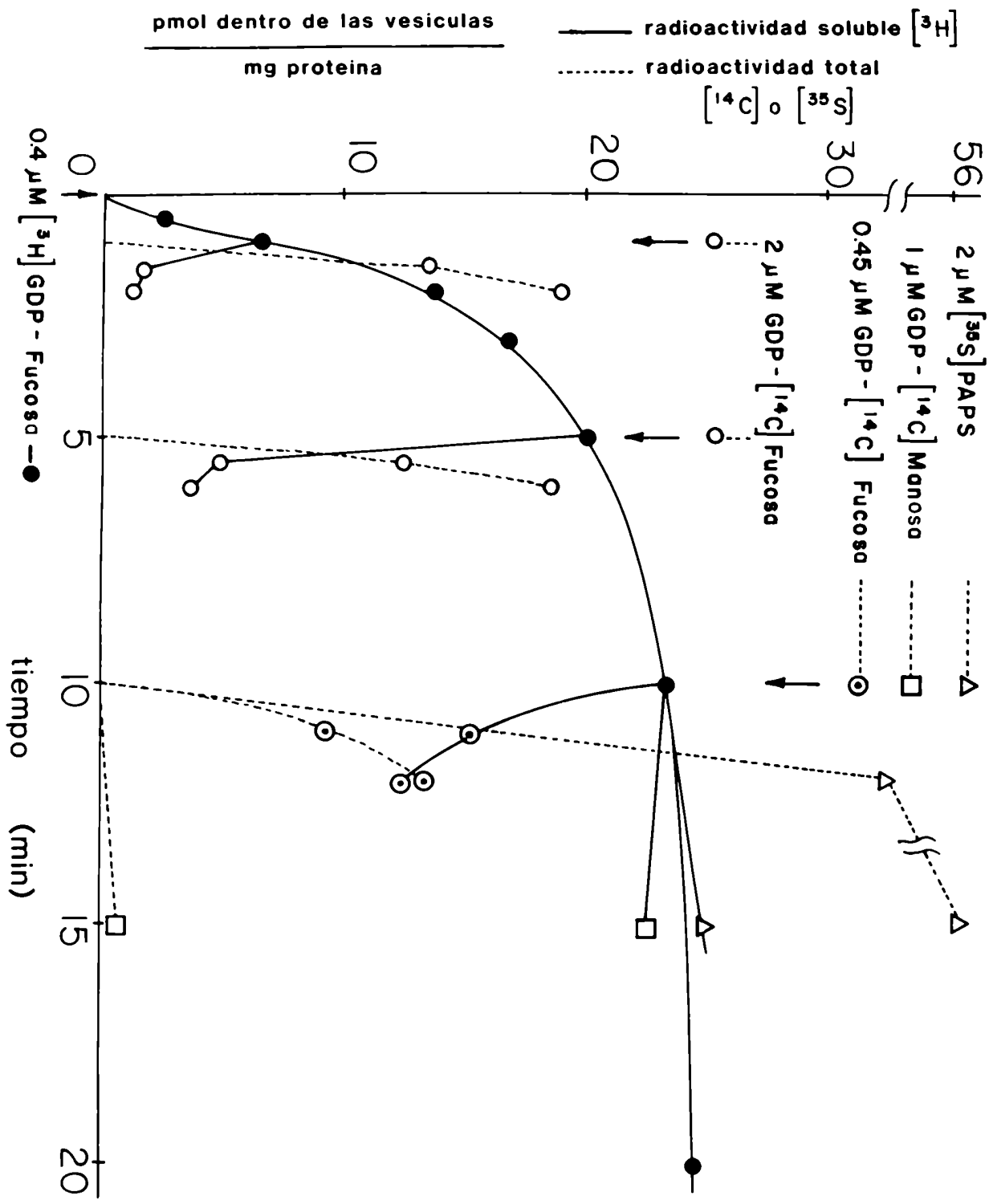

pmol dentro de las vesiculas
mg proteina
radioactividad soluble [3H]
radioactividad total
[14C] o [35S]
0 10 20 30 56
2 µM [35S]PAPS
1 µM GDP-[14C]Manosa
0.45 µM GDP-[14C] Fucosa
2 µM GDP-[14C]Fucosa
0.4 µM [3H] GDP-Fucosa
0 5 10 15 20
tiempo (min)

FIGURA VI-1

Translocación de [^{3}H]GDP–F al lumen de vesículas de Golgi y subsecuente intercambio de los solutos radioactivos internos con solutos del medio de incubación. Las vesículas (0,4 mg de proteína por ensayo) fueron incubadas en tubos de ultracentrífugas, en un volumen total de 1 ml de medio estándar de penetración (capítulo II), a 25°C por diferentes tiempos (flecha 1) con 0,27 μCi de [guanidina-8-^{3}H]GDP–L-fucosa en una concentración final de 0,4 μM (círculos negros).

A muestras que habían sido incubadas por 1 min (flecha 2) y 5 min (flecha 3), se les agregó en un volumen de 5 μl GDP–[^{14}C]fucosa (0,12 μCi, 2 nmol) y la incubación se continuó por 0,5 y 1 min (círculos blancos).

A muestras que habían sido incubadas por 10 min (flecha 4) se les agregó:

(círculos punteados) 5 μl de GDP–[^{14}C] fucosa (0,12 μCi, 0,45 nmol) y se continuó la incubación por 1 y 2 min.

(cuadrados blancos) 5 μl de GDP–[^{14}C]manosa (0,31 μCi, 1 nmol) y se continuó incubando por 5 min.

(triángulos blancos) 5 μl de [^{35}S]PAPS (0,44 μCi, 2 nmol) y se incubaron por 2 y 5 min adicionales.

Todas las reacciones se pararon poniendo los tubos en una mezcla de hielo y ClNa e inmediatamente fueron precipitadas las vesículas.

La cantidad de radioactividad soluble (————^{3}H) y soluble más insoluble en ácido (– – – – ^{14}C o ^{35}S) dentro de las vesículas fue determinada como se describe en el capítulo II.

FIGURA VI-2

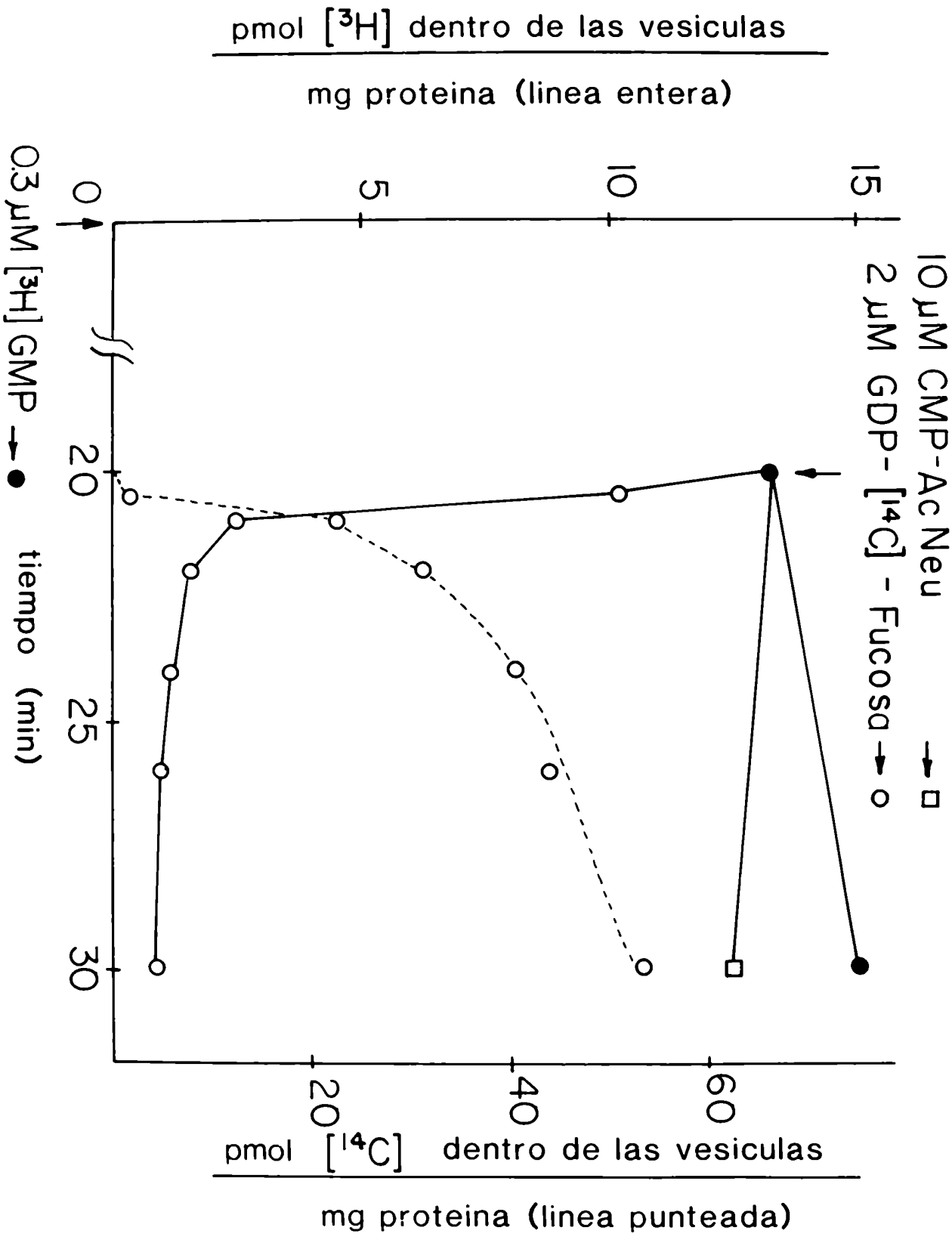

pmol [3H] dentro de las vesiculas
mg proteina (linea entera)
0
5
10
15
0.3 µM [3H] GMP → ● tiempo (min)
20
25
30
10 µM CMP-Ac Neu
2 µM GDP- [14C] - Fucosa → o
□
20
40
60
pmol [14C] dentro de las vesiculas
mg proteina (linea punteada)

FIGURA VI-2

Translocación de [^{3}H]GMP al lumen de vesículas de Golgi y subsecuente intercambio de los solutos radioactivos internos con solutos del medio de incubación. Las vesículas fueron incubadas como se describe en la fig. VI-1 durante 20 min (flecha 1) con 0,3 μCi de [guanidina-8-^{3}H]GMP en una concentración final de 0,3 μM (círculos negros).

A ese tiempo (flecha 2) se les agregó a los tubos:

(círculos blancos) 5 μl de GDP–[^{14}C]fucosa (0,13 μCi, 2 nmol) y la incubación fue continuada por 0,5, 1, 2, 4, 6 y 10 min.

(cuadrados blancos) 5 μl de CMP–AcNeu (10 nmol) y se incubaron durante 10 min.

Los resultados se obtuvieron y graficaron como se describe en la leyenda de la fig. VI-1.

FIGURA VI-3

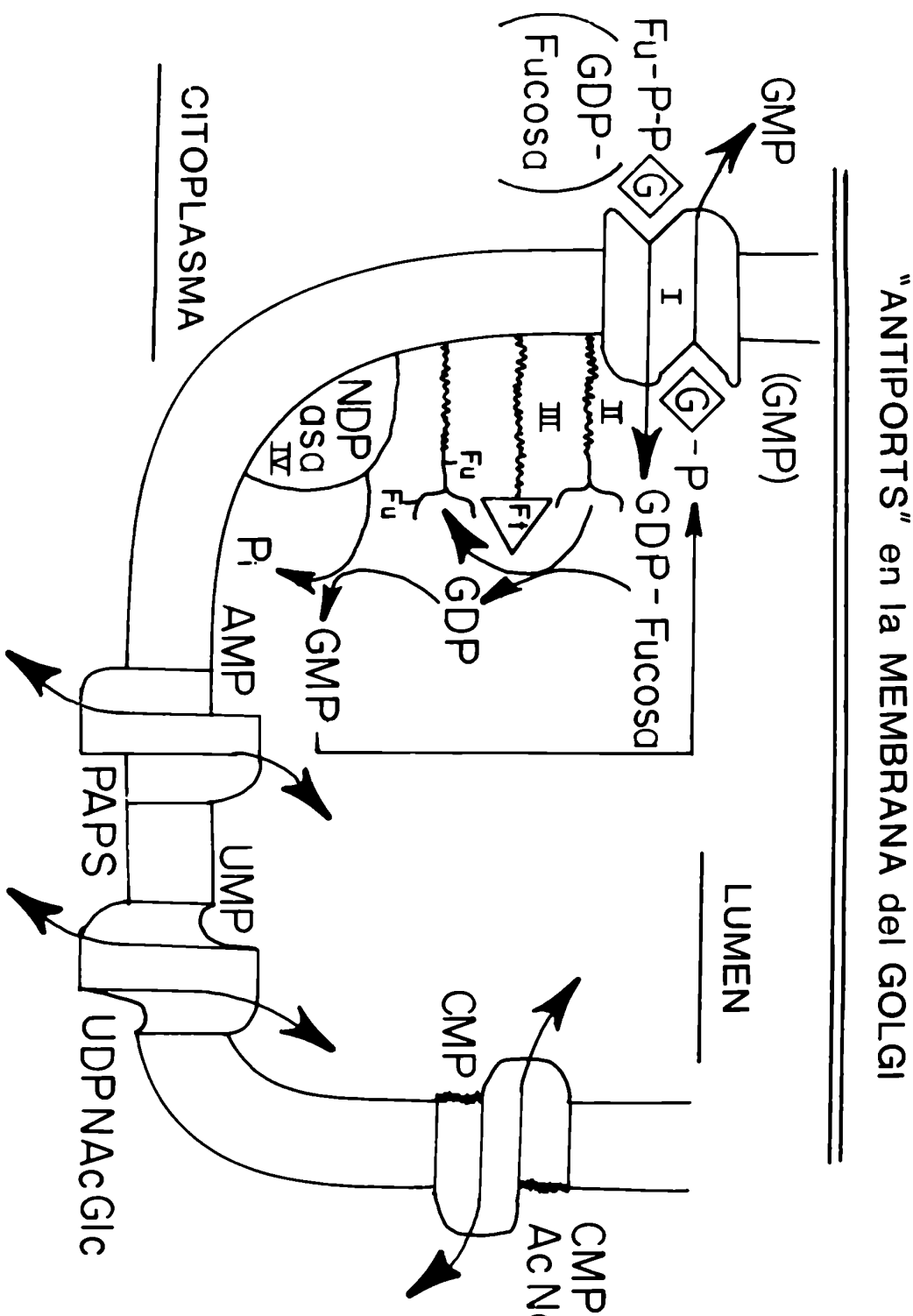

"ANTIPORTS" en la MEMBRANA del GOLGI
GMP
Fu-P-P
(GDP-Fucosa)
G
I
(GMP)
G-P
II
III
GDP-Fucosa
Ft
Fu
Fu
GDP
GMP
NDP asa
IV
Pi
AMP
CITOPLASMA
PAPS
UMP
UDPNAcGlc
LUMEN
CMP
CMP-AcNeu

FIGURA VI-3

Mecanismo propuesto para la translocación de nucleótido azúcares y PAPS a través de la membrana del aparato de Golgi.

La GDP–F se une por su parte guanidílica al dominio citoplasmático de una proteína antiport específica (I) constituyente integral de la membrana del Golgi. El nucleótido azúcar es luego translocado intacto al lumen de la vesícula, y una vez dentro del mismo, sirve conjuntamente con glicoproteínas y glicolípidos endógenos (II), como substrato de reacciones de fucosilación catalizadas por las fucosiltransferasas (III).

El GDP generado puede entonces ser convertido a GMP por la NDPasa (IV), éste se une luego al dominio lumenal de la proteína antiport y es intercambiado por GDP–F citoplasmática en una relación estequiométrica equimolar.

Se postula también que proteínas antiport específicas similares son responsables de la translocación de PAPS, CMP-AcNeu, UDP–N–AcGA y UDP–gal (no mostrado).

CAPITULO VII

CONCLUSIONES:

A través del extenso proyecto de investigación llevado a cabo, cuyos resultados se exponen en los capítulos precedentes, la totalidad de los objetivos propuestos han sido alcanzados y todos los interrogantes planteados han sido solucionados. Quedando de esta forma aclarado un viejo problema que está explícitamente expuesto aun en la literatura de muy reciente data (6, 111).

Una larga serie de datos experimentales demuestran que la translocación es el resultado de la actividad de proteínas transportadoras, entre ellos:

Sensibilidad a la digestión con proteasas.

Saturación por substrato, pudiéndose determinar una KM y una Vmax.

Inhibición competitiva producida por análogos de los substratos.

Dependencia de la velocidad de transporte con respecto a la temperatura.

Inhibición por compuestos, como DIDS y AT, que son inhibidores de otros sistemas de transporte que se sabe son llevados a cabo por proteínas.

Posibilidad de obtener células mutantes, por métodos estándar de mutagénesis, deficientes en su capacidad de transporte de nucleótido azúcares.

El hecho de que al inhibirse el transporte de PAPS mediante, por ejemplo, DIDS, se inhiba en forma paralela el proceso de sulfatación, aunque el DIDS no tiene efecto inhibitorio per se sobre las sulfotransferasas. Y que por otra parte la inhibición de la sulfatación por DIDS puede ser revertida cuando la barrera de permeabilidad es eliminada por la acción de detergentes, demuestran que la translocación de nucleótido derivados a través de la membrana es un paso previo imprescindible y diferente de la transferencia de azúcar o sulfato a macromoléculas.

Esto sugiere que el transporte de estas moléculas, que ha sido descubierto mediante experimentos in-vitro, también existe en la célula viva. Una prueba contundente de que esto es así ha sido proporcionada por recientes resultados obtenidos en nuestro laboratorio. Estos demostraron que una línea celular mutante de ovario de hamster chino (CHO) caracterizada por una marcada reducción en el contenido de sialoglicoproteínas (pero que tienen niveles normales de síntesis de proteínas, síntesis de CMP-AS y actividad de sialiltransferasas) son deficientes en la capacidad de transportar CMP-AS a través de la membrana del Golgi (112).

Se ha demostrado que las membranas del aparato de Golgi son capaces de translocar la molécula íntegra de PAPS de un compartimento citoplasmático a uno lumenal, aunque son totalmente impermeables al sulfato libre.

Además se ha establecido que éste es un fenómeno generalizado, ya que dichas membranas pueden hacer lo mismo con CMP-AcNeu, GDP-F (52), UDP-gal, UDP-N-AcGA, 5'-GMP y 5'-CMP.

Además se ha podido demostrar que cada nucleótido derivado es translocado por un transportador específico, ya sea midiendo el transporte simultáneo de dos moléculas distintas marcadas con diferentes radioisótopos, o bien determinando que ninguna de ellas tiene efecto inhibitorio sobre el transporte de cualquiera de las otras.

También por los experimentos realizados con la mutante antes mencionada, ya que ésta, a pesar de ser incapaz de transportar CMP-AS, puede translocar a niveles normales PAPS, UDP-gal y UDP-N-AcGA.

Finalmente, por el hecho de que CAT, AT y pal-CoA inhiben específicamente el transporte de PAPS, y por la forma diferencial en que DIDS inhibe la translocación de CMP-AS, GDP-F y PAPS, con respecto a la concentración del mismo y a la temperatura de incubación.

Las características estructurales críticas que son requeridas en el nucleótido derivado para que se produzca la interacción con el transportador son: la posición del grupo o de los grupos fosfato (así 5'-CMP y 3', 5'-ADP son fuertes inhibidores del transporte de CMP-AS y PAPS, mientras que 3'- o 2'-CMP y 2', 5'-ADP carecen de efecto inhibitorio) y el tipo de base nitrogenada (así 5'-GDP es inhibidor del transporte de GDP-F pero 5'-UDP no lo es).

Otra característica, como el número de grupos fosfato en la posición crítica o substituyentes en la base o en la ribosa, no parecen ser tan importantes.

Se pudo demostrar mediante experimentos de inhibición con análogos de substrato que el proceso de translocación parece estar dividido en dos fases, durante la primera se produce la unión con el transportador, de lo cual es responsable la parte nucleotídica de la molécula, posteriormente la translocación propiamente dicha, durante la cual el tipo de azúcar juega un papel preponderante. Así mientras que 5'-GDP y GDP-M inhiben el transporte de GDP-F, es decir interactúan con el transportador, GDP-M no es translocado por el mismo.

Se ha descubierto que compuestos inhibidores de otros sistemas de transporte: como DIDS y SITS del transportador de aniones de la membrana del glóbulo rojo, y pal-CoA, CAT y AT del translocador de ATP/ADP mitocondrial, tienen también efecto sobre el sistema de transportadores del Golgi, ya sea en forma inespecífica como es el caso de los dos primeros, o específicamente sobre la translocación de PAPS, como es el caso de los tres últimos.

Estos compuestos han sido de gran utilidad durante la ejecución de este proyecto y además sugieren la existencia de semejanzas estructurales y funcionales entre el transportador de PAPS y el de ATP/ADP mitocondrial.

Es de destacar que AT y CAT eran considerados hasta ahora inhibidores específicos de este último y han sido utilizados como tales en diversos experimentos con células enteras.

Se ha demostrado que este sistema de transporte no depende de ninguna fuente de energía, ya que es un proceso pasivo de difusión facilitada.

El mecanismo por el cual se produce es un intercambio equimolar acoplado entre el nucleótido azúcar o PAPS y los nucleótidos correspondientes y es llevado a cabo por una proteína transportadora de tipo antiport.

Es decir, al mismo tiempo que el nucleótido derivado es translocado desde el citoplasma hacia el lumen del Golgi, el nucleótido correspondiente producido por la actividad de las transferasas es translocado desde el lumen hacia el citoplasma.

Durante el mismo se mantiene el balance de cargas, con la posible excepción del transporte de PAPS (ver discusión del capítulo VI).

Este sistema de proteínas antiport parecía estar restringido a la membrana del Golgi, ya que por ejemplo la mitocondria no es capaz de translocar PAPS, ni el retículo endoplasmático es capaz de translocar GDP-manosa, ni por supuesto GDP-fucosa que fue usada como control (datos no mostrados).

Sin embargo recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que el retículo es capaz de translocar UDP-N-AcGA en forma semejante a lo que ocurre en el aparato de Golgi (61). Esto constituye también una prueba adicional sobre la especificidad de los transportadores (incluso con respecto a dos nucleótido azúcares que comparten la misma parte nucleotídica) y del importante papel que tiene el azúcar en la translocación, ya que el Golgi es capaz de transportar tanto UDP-gal como UDP-N-AcGA, sin embargo el retículo es impermeable a UDP-gal.

De acuerdo a todos los datos expuestos, la estrategia más promisoria para identificar las proteínas transportadoras es mediante la síntesis de derivados fotorreactivos marcados con radioisótopos de los inhibidores descubiertos, ya sean de los competitivos o de los que no lo son, para ser utilizados en experimentos de marcado de fotoafinidad y posterior análisis por electroforesis y radioautografía o fluorografía.

Con este fin ya se han sintetizado, por medios químicos o enzimáticos, varios de ellos como son por ejemplo:

3'-O-(4-benzoil)benzoil [^{3}H]CMP-[^{14}C]AS (113)

3'-O-(4-benzoil)benzoil [^{32}P]dCMP

8-azido-[^{32}P]GDP-F

6'-O-(3-(N-(4-azido-2-nitrofenil)-amino)-propionil atractilósido (91)

La purificación de las mismas parece ser todavía más complicada, debido a que la actividad de las proteínas aisladas de la membrana no puede ser detectada. Sin embargo la estrategia más realista es utilizar cromatografía de afinidad en columnas de Sepharosa modificada con inhibidores competitivos como ser 3', 5'-ADP-Sepharosa, o por electroforesis preparativa.

En todos los casos deberán hacerse experimentos de reconstitución en liposomas para verificar la identidad de la molécula purificada.

El hecho de que el transporte de nucleótido derivados a través de la membrana de Golgi sea el primer paso del complejo mecanismo de síntesis, procesamiento y distribución de glicoproteínas lo señala como un punto potencial de regulación del mismo.

Es fácil especular como, por ejemplo, la inhibición del transportador de UDP-N-AcGA, no sólo interrumpiría inmediatamente el procesamiento, sino que impediría que las enzimas lisosomales fueran correctamente marcadas y por lo tanto serían dirigidas hacia el exterior de las células.

Sin embargo, a pesar de que no se han obtenido pruebas experimentales de que efectivamente sea un paso de regulación, existen ciertas analogías sugerentes. Por ejemplo el hecho de que existan semejanzas estructurales y funcionales entre el translocador de PAPS y el de ATP/ADP de la mitocondria, siendo que a nivel de este último parece estar regulada la síntesis de ATP (114, 115).

Por otra parte, recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio, con otra línea celular mutante, deficiente en galactosa y ácido siálico, que el defecto se encuentra a nivel del transportador de UDP-gal y que esas células son por lo tanto un transportador puro de CMP-AS, ya que éste no puede donar su azúcar por carecer de aceptor.

De cualquier forma, esta última cuestión deberá aguardar para ser aclarada que las proteínas

translocadoras sean purificadas, reconstituidas y que se preparen anticuerpos contra las mismas, quedando mientras tanto la hipótesis como una especulación lógica.

En resumen, se ha descubierto en la membrana del aparato de Golgi un sistema de transporte de nucleótido azúcares y PAPS que soluciona una serie de problemas derivados de los procesos de glicosilación y sulfatación, éste ha sido caracterizado, su mecanismo de acción ha sido elucidado y una serie de excitantes posibilidades quedan formuladas.

BIBLIOGRAFIA

1) Golgi, C. (1898) Arch. Ital. Biol. 30, 60-71.
2) Dalton, A. J. and Felix, M. D. (1954) Am. J. Anat. 94, 171-208.
3) Sjöstrand, F. S. and Hanzon, V. (1954) Exp. Cell Res. 7, 415-429.
4) Farquhar, M. G. and Rinehart, J. F. (1954) Endocrinology 55, 857-876.
5) Rhodin, J. Tésis de doctorado. Instituto Karolinska, Estocolmo.
6) Farquhar, M. G. and Palade, G. E. (1981) J. Cell Biol. 91, 77-103.
7) Morré, D. J., Mollenhauer, H. H., Hamilton, R. L., Mahley, R. W., Cunningham, W. P., Cheetha, R. D. and Lequire, V. S. (1970) J. Cell Biol. 44, 484-491.
8) Fleischer, B. and Fleischer, S. (1970) Biochim. Biophys. Acta 219, 301-319.
9) Leelavathi, D. E., Estes, L. W., Feingold, D. S. and Lombardi, B. (1970) Biochim. Biophys. Acta 211, 124-138.
10) Keenan, T. W. and Morré, D. J. (1970) Biochemistry 9, 19-25.
11) van Golde, L. M. G., Raben, J., Batenburg, J. J., Fleischer, B., Zambrano, F. and Fleischer, S. (1974) Biochem. Biophys. Acta 360, 179-192.
12) Schachter, H., Jabbal, I., Hudgin, R. L., Pinteric, L. McGuire, E. J. and Roseman, S. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1090-1100.
13) Novikoff, P. M., Novikoff, A. B., Quintana, N. and Hauw, J. J. (1971) J. Cell Biol. 50, 859-886.
14) Friend, D. S. and Murray, M. J. (1965) Am. J. Anat. 117, 135-149.
15) Farquhar, M. G., Bergeron, J. J. M. and Palade, G. E. (1974) J. Cell Biol. 60, 8-25.
16) Cheng, H. and Farquhar, M. G. (1976) J. Cell Biol. 70, 660-684.
17) Rambourg, A. and Leblond, C. P. (1967) J. Cell Biol. 32, 27-53.
18) Bergmann, J. E. and Singer, S. J. (1983) J. Cell Biol. 97, 1777-1787.
19) Dunphy, W. G., Fries, E., Urbani, L. J. and Rothman, J. E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7453-7457.
20) Griffiths, G., Quinn, P. and Warren, G. (1983) J. Cell Biol. 96, 835-850.
21) Deutscher, S. L., Creek, K. E., Merion, M. and Hirschberg, C. B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3938-3942.
22) Rothman, J. E., Miller, R. L. and Urbani, L. J. (1984) J. Cell Biol. 99, 260-271.
23) Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A. and Rothman, J. E. Cell (en prensa).
24) Tabas, I. and Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11655-11663.
25) Tulsiani, D. R. P., Opheim, D. J. and Touster, O. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3227-3232.
26) Leblond, C. P. and Bennet, G. (1977) International Cell Biology, B. R. Brinkley y K. R. Porter editores. The Rockefeller University Press, NY. 326-336.
27) Schachter, H. and Roseman, S. (1980) The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, W. Lennarz editor. Plenum Press, NY. 85-160.
28) Richardson, C. L., Keenan, T. W. and Morré, D. J. (1977) Biochem. Biophys. Acta 488, 88-96.
29) Fleischer, B. and Zambrano, F. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5995-6003.
30) Lane, N., Caro, L., Otero Vilardebo, L. R. and Godman, G. C. (1964) J. Cell Biol. 21, 339-352.
31) Godman, G. C. and Lane, N. (1964) J. Cell Biol. 21, 353-366.
32) Young, R. W. (1973) J. Cell Biol. 57, 175-189.
33) Steiner, D. F., Clark, J. L., Nolan, C., Rubenstein, A. H., Margoliash, E., Melani, F. and Oyer, P. E. (1970) The Pathogenesis of Diabetes Mellitus, E. Cerasi y R. Luft editores. Almqvist and Wiksell, Estocolmo, 123-132.

34) Habener, J. F. Chang, H. T. and Potts, J. T. (1977) Biochemistry 16, 3910-3917.
35) Capasso, J. M., Abeijón, C. and Hirschberg, C. B. (1985) J. Biol. Chem (en prensa).
36) Jamieson, J. D. and Palade, G. E. (1971) J. Cell Biol. 48, 503-522.
37) Palade, G. E. (1975) Science 189, 347-358.
38) Gainer, H., Sarne, Y. and Brownstein, M. J. (1977) J. Cell Biol. 73, 366-381.
39) Varki, A. and Kornfeld, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10847-10858.
40) Reitman, M. and Kornfeld, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4275-4281.
41) Neutra, M. and Leblond, C. P. (1966) J. Cell Biol. 30, 119-136 y 137-150.
42) Whur, P., Herscovics, A. and Leblond, C. P. (1969) J. Cell Biol. 43, 289-311.
43) Haddad, A., Smith, M. D., Herscovics, A., Nadler, N. J. and Leblond, C. P. (1971) J. Cell Biol. 49, 856-876.
44) Carey, D. J. and Hirschberg, C. B. (1979) J. Biol. Chem. 255, 4348-4354.
45) Hubbard, S. C. and Ivatt, R. J. (1981) Ann. Rev. Biochem. 58, 555-583.
46) Snider, M. D. and Rogers, O. C. (1984) Cell 36, 753-761.
47) Hanover, J. A. and Lennarz, W. J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2787-2794.
48) Hanover, J. A. and Lennarz, W. J. (1980) J. Biol Chem. 255, 3600-3604.
49) Coates, S. W., Gurney, T. Jr., Sommers, L. W., Yeh. M. and Hirschberg, C. B. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9225-9229.
50) Robbins, P. W. and Lipmann, F. (1958) J. Biol. Chem. 233, 681-685 y 686-691.
51) Carey, D. J., Sommers, L. W. and Hirschberg. C. B. (1980) Cell 19, 597-605.
52) Sommers, L. W. and Hirschberg, C. B. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10811-10817.
53) Capasso, J. M., Schwartz, J. and Hirschberg, C. B. (1983) Federation Proceedings 42, 1822.
54) Capasso, J. M., Schwartz, J. and Hirschberg, C. B. (1983) J. Cell Biol. 97, 441.
55) Schwartz, J., Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3554-3559.
56) Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) J. Biol. Chem. 259, 4263-4266.
57) Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) Biochem. Biophys. Acta 777, 133-139.
58) Hirschberg, C. B., Capasso, J. M., Perez, M. and Deutscher, S. L. (1984) Federation Proceedings 43, 1978.
59) Hirschberg, C. B. and Capasso, J. M. (1984) J. Cell Biol. 99, 230.
60) Capasso, J. M. and Hirschberg, C. B. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7051-7055.
61) Perez, M. and Hirschberg, C. B. (1985) J. Biol. Chem. (en prensa).
62) Singer, S. (1979) Anal. Biochem. 96, 34-38.
63) Carey, D. J. and Hirschberg, C. B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 989-993.
64) Omura, T. and Takesue, S. (1970) J. Biochem. 67, 249-257.
65) Peterson, G. L. (1977) Anal. Biochem. 83, 346-356.
66) Laemli, V. K. (1970) Nature 227, 680-685.
67) Bonner, L. W. and Laskey, R. A. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83-88.
68) Robbins, P. W. and Lipmann, F. (1957) J. Biol. Chem. 229, 837-851.
69) Reggio, H. A. and Palade, G. E. (1978) J. Cell Biol. 77, 288-314.
70) Rosenzweig, L. J. and Farquhar, M. G. (1980) Endocrinology 107, 422-431.
71) Farrell, D. F. and McKhann, G. M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4694-4702.
72) Tartakoff, A., Green, L. J. and Palade, G. E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7420-7431.
73) Fleischer, B. and Smigel, M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1632-1638.
74) Rodriguez-Boulan, E., Kreibich, G. and Sabatini, D. D. (1978) J. Cell Biol. 78, 874-893.
75) Zambrano, F., Fleischer, S. and Fleischer, B. (1975) Biochim. Biophys. Acta 380, 357-369.

76) Brandan, E. and Fleischer, B. (1982) Biochemistry 21, 4640-4645.
77) Kuhn, N. J. and White, A. (1977) Biochem. J. 168, 423-433.
78) Creek, K. and Morré, D. (1981) Biochim. Biophys. Acta 643, 292-305.
79) Pande, S. V. and Blanchaer, M. C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 402-411.
80) Lerner, E., Shug, A. L., Elson. C. and Shrago, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1513-1519.
81) Woldegiorgis, G., Yousufzai, S. Y. K. and Shrago, E. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14783-14787.
82) Pfaff, E., Klingenberg, M. and Held, H. W. (1965) Biochim. Biophys. Acta 104, 312-315.
83) Winkler, H. H., Bygrave, F. L. and Lehninger, A. L. (1968) J. Biol. Chem. 243, 20-28.
84) Winkler, H. H. and Lehninger, A. L. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3000-3008.
85) Brandolin, G., Meyer, C., Defaye, G., Vignais, P. M. and Vignais, P. V. (1974) FEBS Lett. 46, 149-153.
86) Egan, R. and Lehninger, A. L. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 195-201.
87) Riccio, P., Aquila, H. and Klingenberg, M. (1975) FEBS Lett. 56, 129-132.
88) Riccio, P., Aquila, H. and Klingenberg, M. (1975) FEBS Lett. 56, 133-138.
89) Bojanovski, D., Schlimme, E., Wang, C. and Alaupovic, P. (1976) Eur. J. Biochem. 71, 539-548.
90) Klingenberg, M., Riccio, P. and Aquila, H. (1978) Biochim. Biophys. Acta 503, 193-210.
91) Boulay, F., Lauquin, G. J. M., Tsugita, A. and Vignais, P. V. (1983) Biochemistry 22, 477-484.
92) Cabantchik, Z. I., Knauf, P. A. and Rothstein, A. (1978) Biochim. Biophys. Acta 515, 289-302.
93) Zoccoli, M. A. and Karnovsky, M. L. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1113-1119.
94) Zoccoli, M. A., Hoopes, R. R. and Karnovsky, M. L. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3919-3924.
95) Powel, G. L., Grothusen, J. R., Zimmerman, J. K., Anderson Evans, C. and Fish, W. W. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12740-12747.
96) Henderson, P. J. F. and Lardy, H. A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1319-1326.
97) Akerboom, T. P. M., Bookelman, H. and Tager, J. M. (1977) FEBS Lett. 74, 50-54.
98) Zuurendonk, P. F. and Tager, J. M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 393-399.
99) Stubbs, M., Vignais, P. V. and Krebs, H. (1978) Biochem. J. 172, 333-342.
100) Meijer, A. J. and Van Dam, K. (1974) Biochim. Biophys. Acta 346, 213-244.
101) Vignais, P. V. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456, 1-38.
102) Schneider, W. C. (1948) J. Biol. Chem. 176, 259-266.
103) Kleineke, J., Sauer, H. and Söling, H. D. (1973) FEBS Lett. 29, 82-86.
104) Schachter, H. (1974) Biochim. Soc. Symp. 40, 50-71.
105) Ohkubo, I., Ishibashi, T., Tanigushi, N. and Makita, A. (1980) Eur. J. Biochem. 112, 111-118.
106) Little, J. S. and Widnell, C. C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4013-4017.
107) Novikoff, A. B. and Goldfischer, S. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 802-810.
108) Goldfischer, S., Essner, E. and Schiller, B. (1971) J. Histochem. Cytochem. 19, 349-360.
109) Kuriyama, Y. (1972) J. Biol. Chem. 247, 2979-2988.
110) Fleischer, B. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 212, 602-610.
111) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1983) Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc. New York & London.
112) Deutscher, S. L., Nuwayhid, N., Stanley, P., Barak Briles, E. I. and Hirschberg, C. B. (1984) Cell 39, 295-299.
113) Abeijón, C., Capasso, J. M., Tal, D. M. and Hirschberg, C. B. (1984) Federation Proceedings 43, 1715.
114) Lemasters, J. J. and Powers, A. E. (1979) J. Biol. Chem. 1248-1254.
115) Jacobus, W. E., Moreadith, R. W. and Vandegaer, K. M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2397-2402.