

## Tesis de Posgrado

# Identificación, caracterización parcial y purificación de la UDP: GLC: glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata, una nueva reacción de procesamiento de glicoproteínas

Trombetta, Eduardo Sergio

1992

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Trombetta, Eduardo Sergio. (1992). Identificación, caracterización parcial y purificación de la UDP: GLC: glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata, una nueva reacción de procesamiento de glicoproteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2551\\_Trombetta.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2551_Trombetta.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Trombetta, Eduardo Sergio. "Identificación, caracterización parcial y purificación de la UDP: GLC: glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata, una nueva reacción de procesamiento de glicoproteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2551\\_Trombetta.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2551_Trombetta.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y PURIFICACIÓN  
DE LA UDP:GLC:GLICOPROTEÍNA  
GLUCOSILTRANSFERASA DE HÍGADO DE RATA  
UNA NUEVA REACCIÓN DE PROCESAMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS**

Autor: Eduardo Sergio Trombetta

Director: Armando J. Parodi

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
"Fundación Campomar"

*Tesis  
2551  
ej. 2.*

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

1992

*Al director de Tesis, Dr. Armando J. Parodi por su apoyo, paciencia, ejemplo y enseñanzas.*

*A los profesores y miembros del Instituto que me brindaron su apoyo y ayuda,*

*A los compañeros que me ayudaron y acompañaron durante estos años.*

*A la Comisión Directiva de la Fundación Campomar por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires.*

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	4
MATERIALES Y METODOS .....	15
Standards y Sustratos Radioactivos.....	15
Material Biológico.....	16
Preparación de Glicopéptidos de tipo Polimanosa .....	16
Preparación de Microsomas.....	16
Determinación de la integridad de las vesículas microsomales.....	17
Obtención de Membranas de Retículo Endoplásmico Rugoso, Liso y .....	18
Purificación parcial de la Glucosidasa II de Hígado de Rata .....	18
Ensayo de Glucosidasas I y II.....	19
Tratamientos Efectuados sobre la Tiroglobulina Bovina .....	19
S-carboximetilación .....	19
Desnaturalización con urea 8 M.....	19
Tratamiento con Endo H .....	19
Tratamiento con $\alpha$ -Manosidasa .....	20
Tratamiento con ácido nitroso .....	20
Solubilización y Ensayo de Glicosiltransferasas .....	20
Actividad glucosilante de tiroglobulina desnaturalizada.....	20
Dolicol-P-Glc sintasa.....	20
Oligosacariltransferasa.....	21
Ensayo de Glicosiltransferasa .....	21
Obtención de Suero Antitiroglobulina .....	22
Glucosilación de Tiroglobulina .....	22
Tratamiento de los Microsomas con Tripsina.....	22
Solubilización de la Glicosiltransferasa .....	23
Caracterización de los Productos de Glucosilación Endógena .....	23
Purificación de la glicosiltransferasa de hígado de rata.....	23
Extracción.....	23
Precipitación con sulfato de amonio .....	24
DEAE-celulosa.....	24
Concanavalina A-Sepharose .....	25
Mono Q.....	25
Fenil-Superose .....	25
Superosa 12.....	26
Ultrogel .....	26
HPLC Fase reversa.....	26
Alquilación con 4-vinilpiridina .....	26
Digestión con Endo Lys-C.....	26

Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	26
Anticuerpos contra la Glucosiltransferasa de Hígado de Rata.....	27
Inmunoprecipitación de la glucosiltransferasa .....	27
Western Blot .....	27
RESULTADOS .....	29
Estimulación de la Glucosilación de Proteínas por Tiroglobulina .....	29
Efecto de Inhibidores de las Glucosidasas I y II. ....	31
Caracterización de los Productos Glucosilados .....	32
En la Glucosilación de Glicoproteínas no Participan Derivados de Dolicol .....	34
Influencia de los Oligosacáridos de Tipo Polimánosa y los Residuos de Asn de la Tiroglobulina sobre su Capacidad de Actuar como Sustrato Aceptor .....	37
Caracterización de la Unión Glucosa-Manosa Formada .....	38
Los Tripanosomátidos Tienen Glucosidasa II pero no Glucosidasa I .....	40
Glucosilación de Glicopéptidos .....	44
Glucosilación de Tiroglobulina por Microsomas de Poroto y de <i>Mucor rouxii</i> .....	46
Glucosilación de Tiroglobulina por Microsomas de <i>Crithidia fasciculata</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	47
TOPOGRAFIA.....	49
Distribución Subcelular .....	49
Glucosilación de un Aceptor Exógeno.....	50
Proteolisis de las Vesículas .....	52
Solubilización de la UDP-Glc:glicoproteína Glucosiltransferasa .....	53
Se Glucosilan Glicoproteínas Solubles y de Membrana .....	56
Purificación a Homogeneidad de la UDP-Glc:Glicoproteína Glucosiltransferasa de Hígado de Rata .....	57
Requerimiento de Cationes y pH .....	61
Requerimiento de Nucleótido Azúcares de la Enzima Pura .....	62
Peso Molecular de la Enzima Pura .....	63
Glucosilación de Glicoproteínas Nativas y Desnaturalizadas por la Glucosiltransferasa Pura .....	64
Caracterización de los Productos de Reacción Formados por la Glucosiltransferasa Pura .....	66
Anticuerpos contra la UDP-Glc glicoproteína Glucosiltransferasa de Hígado de Rata .....	68
Secuencia Parcial de Amino Acidos de la UDP-Glc:glicoproteína Glucosiltransferasa de Hígado de Rata .....	70
DISCUSION .....	71
BIBLIOGRAFIA.....	77

## ABREVIATURAS

Abs: absorbancia  
ác: ácido  
ADP-Glc: adenina difosfato Glucosa  
Asn: asparagina  
ConA: concanavalina A  
cpm: cuentas por minuto  
DEAE: dietilaminoetil  
Dol: dolicol  
Dol-P: dolicol fosfato  
Dol-P-P: dolicol difosfato  
DTT: ditioneitol  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
Endo H: Endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H  
Fig: figura  
Fuc: fucosa  
Gal: galactosa  
°C: grado centígrado  
GDP-Man: guanosina difosfato manosa  
Glc: glucosa  
GlcNAc: N-acetilglucosamina  
8MU-Tg: tiroglobulina desnaturalizada con urea 8M.  
Man: manosa  
min: minuto  
nm: nanometros  
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro  
POPOP: 2,2-p-fenilenbis-5-fenil oxazol  
PPO: 2,5-difeniloxazol  
Prot: proteína  
PVDF: polivinilidendivinilfluoruro  
RE: retículo endoplásmico  
Rf: relación de frente  
SCAM-Tg: tiroglobulina S-carboximetilada  
Ser: serina  
TCA: ácido tricloroacético  
TDP-Glc: Timidina difosfato glucosa  
TFA: ácido trifluoroacético  
TLCK: tosil-lisil-clorometilcetona  
Tg: tiroglobulina Thr: treonina  
Tris: tris-(hidroximetil)aminometano  
UDP-Gal: uridina difosfato galactosa  
UDP-Glc: uridina difosfato glucosa

## RESUMEN

La N-glicosilación de proteínas se inicia en el retículo endoplásmico con la transferencia de un oligosacárido de estructura  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  desde dolicol-P-P a polipéptidos nacientes [1]. El oligosacárido unido a la proteína es inmediatamente procesado por glucosidasas específicas en el lumen del retículo endoplásmico. La glucosidasa I hidroliza el residuo de Glc más externo en unión  $\alpha(1,2)$  y luego la glucosidasa II hidroliza los dos residuos de Glc más internos en unión  $\alpha(1,3)$ . También pueden removerse algunas manosas por acción de manosidasas en el RE. Luego las glicoproteínas son procesadas a lo largo del camino secretorio por una serie de glicosidasas y glicosiltransferasas, con hidrólisis de restos de manosa, transferencia de N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico y fucosa, lo que da lugar a la variedad de estructuras encontrada en las glicoproteínas maduras.

Por marcación con  $[^{14}\text{C}]$ glucosa en células de mamíferos, plantas, hongos y tripanosomátidos se detectó la formación de [*glucosa*- $^{14}\text{C}$ ]- $\text{Glc}_1\text{Man}_{5,9}\text{GlcNAc}_2$  unidos a proteínas [2-10]. Los resultados experimentales indicaban que estos compuestos se formaron en parte por glucosilación de los correspondientes  $\text{Man}_{5,9}\text{GlcNAc}_2$ -Prot sin intervención de derivados de dolicol. En todos los casos los restos de Glc fueron removidos y no aparecieron en las glicoproteínas maduras.

Se han hecho algunos estudios en sistemas libres de células con microsomas de hígado de rata para estudiar estas reacciones de glucosilación de oligosacáridos unidos a glicoproteínas [10]. En ellos se aprovecharon los aceptores endógenos presentes en los microsomas utilizados como fuente de actividad glucosilante.

Con el objeto de estudiar en detalle esta nueva reacción de procesamiento de glicoproteínas ampliamente distribuída en la naturaleza, en el presente trabajo de Tesis se desarrolló un ensayo *in vitro* específico para esta serie de reacciones. El ensayo utiliza UDP- $[^{14}\text{C}]$ Glc como sustrato dador de restos de Glc radioactivos y una glicoproteína con oligosacáridos de tipo polimansosa como sustrato aceptor. Las glicoproteínas deben estar desnaturalizadas para poder actuar comoceptoras. La reacción necesita  $\text{Ca}^{++}$  y pH neutro.

Mediante este ensayo se detectó la actividad de glicosiltransferasa en microsomas de hígado de rata, porotos, *Mucor rouxii*, *Crithidia fasciculata* y *Trypanosoma cruzi*.

En el ensayo de actividad de la UDP-Glc:glicoproteína glicosiltransferasa, el resto de Glc es transferido en el mismo tipo de unión  $\alpha(1,3)$  y al mismo resto de Man que en el intermediario  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -P-P-dolicol. En *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas samueli* y *Trypanosoma cruzi* se encontró una actividad equivalente a la glucosidasa II de otros eucariontes pero no se encontró actividad de glucosidasa I. Estos resultados sugieren que la glucosidasa II es la enzima que hidroliza *in vivo* los restos de Glc transferidos por este mecanismo.

La actividad se localizó por fraccionamiento subcelular en el retículo endo-

plásmico. Utilizando vesículas microsomales intactas de hígado de rata se caracterizó a la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa como una proteína soluble del interior del retículo endoplásmico: Mostró latencia para la glucosilación de un aceptor exógeno y fue resistente a proteólisis en dichas vesículas. Se la pudo extraer soluble en medio isotónico con bajas concentraciones de detergentes, mediante métodos mecánicos sin utilizar detergentes y con pH alcalino. Se extrajo en la fase acuosa por partición con Triton X-114.

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata se purificó a homogeneidad. En electroforesis desnaturante en medio reductor corrió como una única banda de peso molecular aparente 160 kDa y en condiciones nativas se comportó como un homodímero. La enzima pura exhibió las mismas propiedades observadas en preparaciones crudas al desarrollar el ensayo *in vitro*: pH óptimo neutro, requerimiento absoluto de  $\text{Ca}^{++}$  para su actividad y de UDP-Glc como dador de Glc. Reconoció como sustrato aceptor únicamente a glicoproteínas desnaturadas y no a las mismas glicoproteínas en estado nativo. Esto no se debió a una diferente accesibilidad del oligosacárido entre la forma nativa y la desnaturada sino al reconocimiento por parte de la glucosiltransferasa de algún factor estructural en las glicoproteínas desnaturadas.

Se generó un antisuero de conejo contra la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata capaz de reconocer a la proteína desnaturada y nativa. Se obtuvo la secuencia de amino ácidos del extremo amino terminal y de fragmentos internos de la glucosiltransferasa de hígado de rata.

Los datos previos junto con los presentados en esta Tesis permiten en conjunto confirmar la existencia de un mecanismo de transferencia de un resto de Glc a oligosacáridos de tipo polimánosa en glicoproteínas. La glucosiltransferasa involucrada, una proteína soluble del retículo endoplásmico, reconoce como sustratos a glicoproteínas que aún no han adoptado su estructura nativa. La glucosidasa II hidroliza el residuo de Glc transferido por ésta glucosiltransferasa. Este ciclo de glucosilación-deglucosilación continuaría hasta que las glicoproteínas adoptan su estructura nativa y dejan de ser sustrato de la glucosiltransferasa.



Parte de los resultados presentados en esta Tesis fueron publicados en:

Characterization of Dolichol Diphosphate Oligosaccharide:Protein Oligosacaryltransferase and Glycoprotein-processing Glucosidases Occurring in Trypanosomatid Protozoa.

Margarita Bosch, Sergio Trombetta, Ulla Engstrom and Armando J. Parodi.

*J. Biol. Chem.* (1988) 263, 17360-17365.

Glucosylation of Glycoproteins by Mammalian, Plant, Fungal and Trypanosomatid Protozoan Microsomal Membranes.

Sergio Trombetta, Margarita Bosch & Armando J. Parodi.

*Biochemistry* (1989) 28, 8108-8116.

The UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase is a Soluble Protein of the Endoplasmic Reticulum.

Sergio Trombetta, Sandra Gañan & Armando J. Parodi.

*Glycobiology* (1991) 1, 155-161.

Purification to Apparent Homogeneity and Partial Characterization of Rat Liver UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase.

Sergio Trombetta & Armando J. Parodi.

*J. Biol. Chem.* (1992) 267, 9236-9240.

INTRODUCCION

Las estructuras encontradas en los oligosacáridos unidos a los restos de asparagina de las glicoproteínas se pueden dividir en tres grandes grupos (Fig. 1) [11, 12]. Los de alta manosa o polimanosos, compuestos de GlcNAc y Man. Los complejos, compuestos de GlcNAc, Man, Gal, ácido siálico y Fuc formando una familia de estructuras muy variadas. Por último, los híbridos tienen algunas características de los de polimanosos y de los complejos.

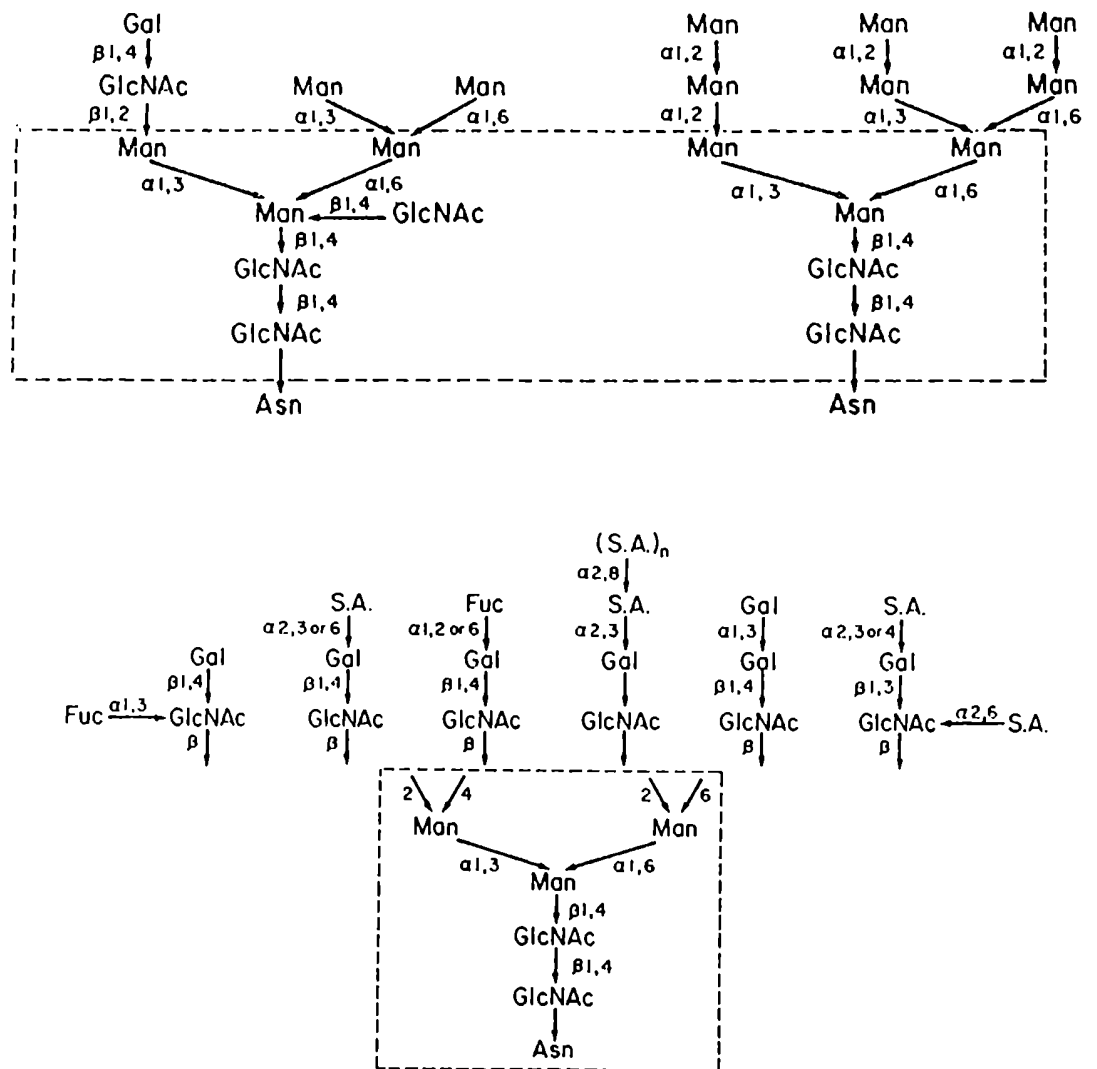
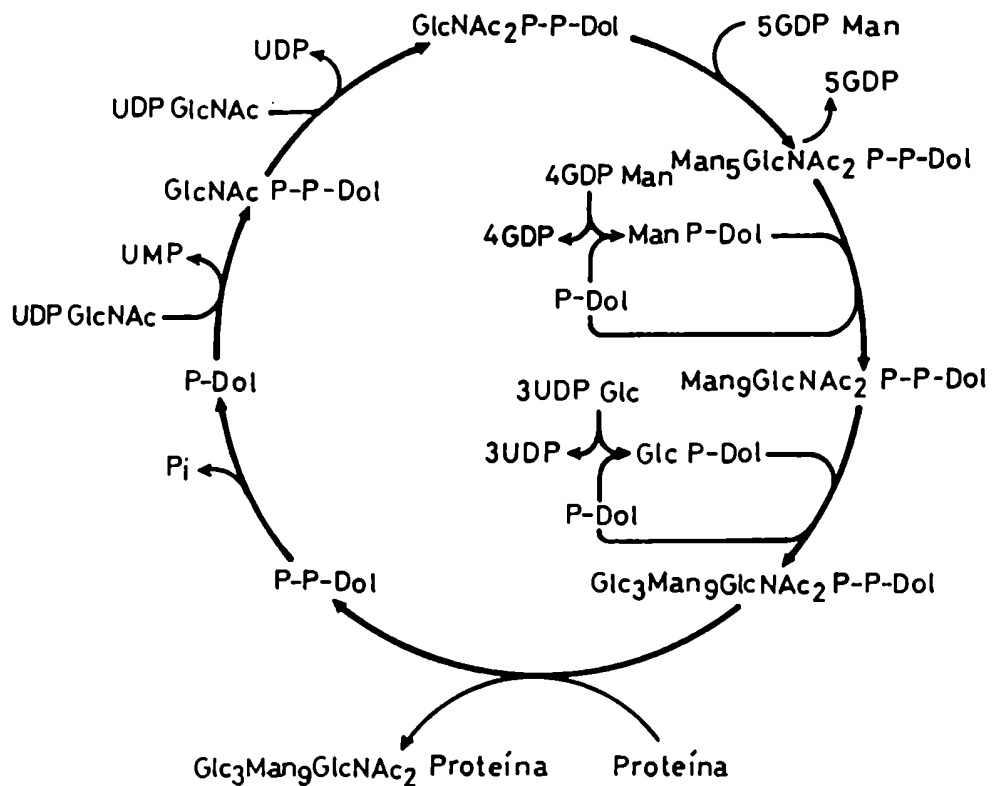


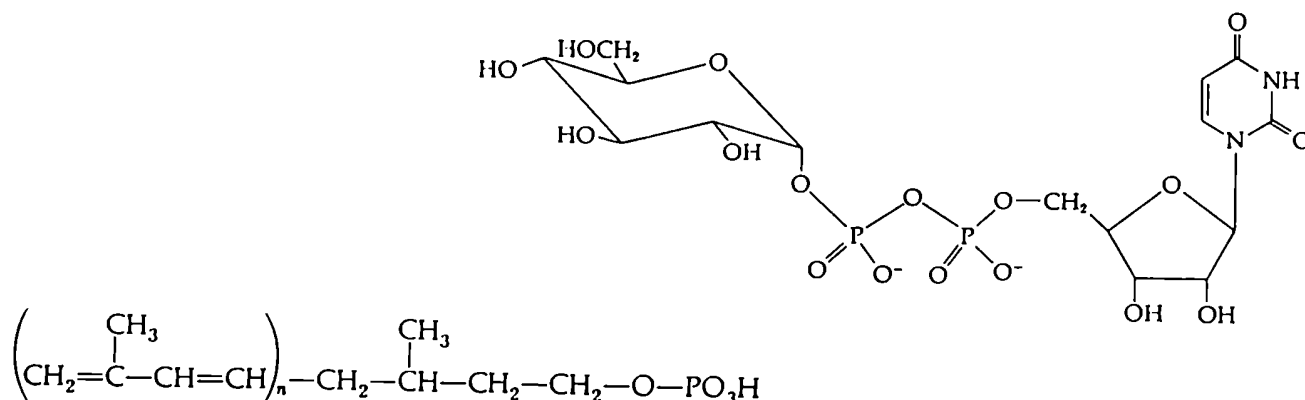
Figura 1. Estructura de N-oligosacáridos representativos

La gran variedad de estructuras posibles tiene un origen biosintético común. La glicosilación de residuos de asparagina no ocurre por el agregado de los sucesivos monosacáridos componentes a la proteína portadora, sino que todas tienen un mismo precursor que luego se procesa para dar origen a las distintas estructuras finales. En prácticamente todos los eucariotes la N-glicosilación de proteínas comienza con la formación de un oligosacárido de estructura  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  unido a un lípido. El oligosacárido se biosintetiza en el retículo endoplásmico (RE) mediante la acción concertada de glicosiltransferasas que da como resultado un solo isómero para cada uno de los oligosacáridos con número creciente de monosacáridos (Fig. 4). El oligosacárido completo es transferido en bloque desde el lípido a los residuos de Asn de las proteínas nacientes en el RE mediante una oligosacariltransferasa (Fig. 2). A continuación la acción ordenada de glicosidasas y glicosiltransferasas da origen a las estructuras encontradas en las glicoproteínas maduras.



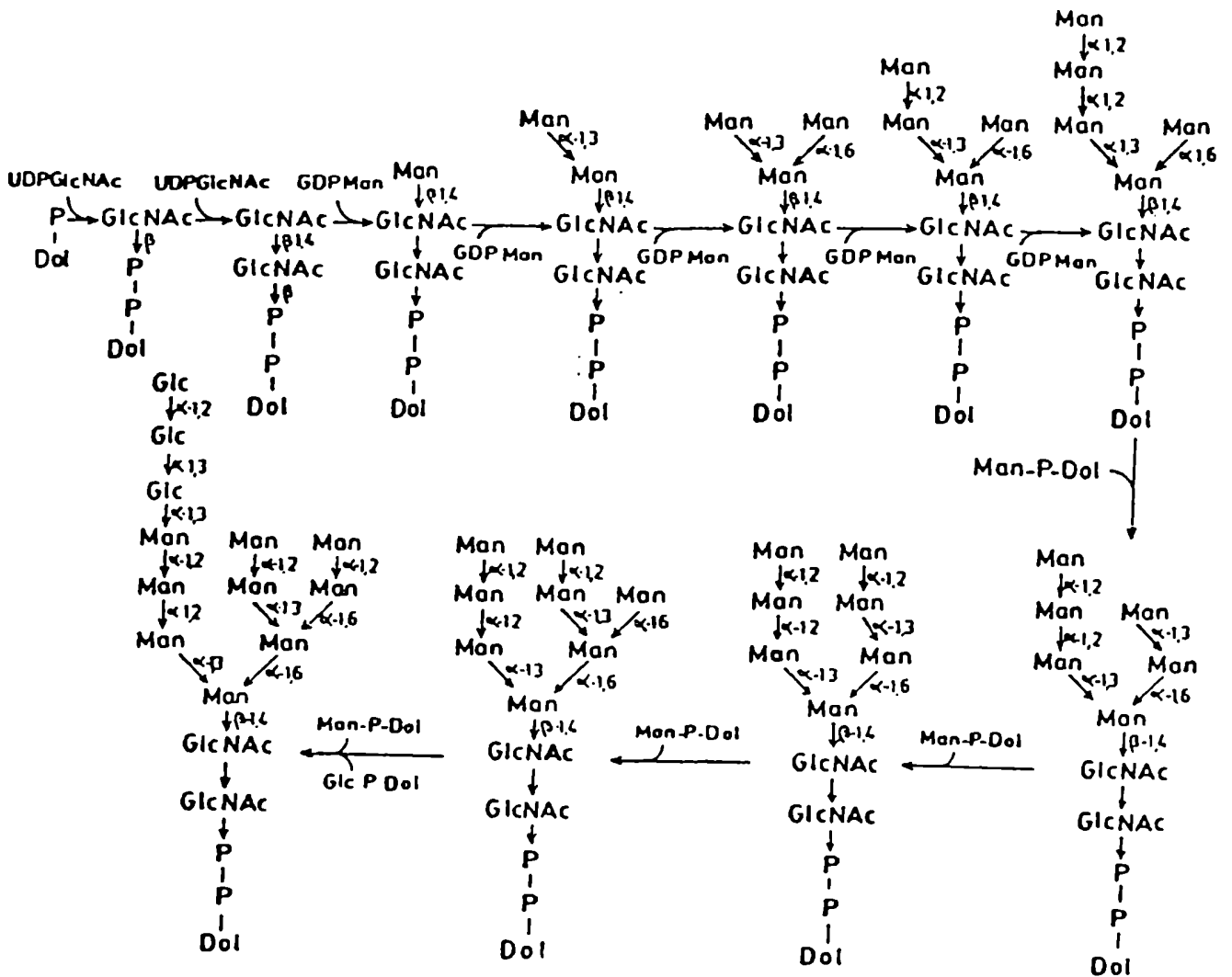
**Figura 2. Ciclo del dolicol**

En 1970 se describió por primera vez la síntesis *in vitro* de un oligosacárido glucosilado unido a un lípido y su transferencia a proteínas [13]. A partir de entonces, se elucidó la secuencia detallada de reacciones que conduce a la formación del intermediario, su transferencia a proteína y posterior procesamiento [1, 14, 15]. El lípido al cual está unido el oligosacárido por un puente pirofosfato es el dolicol, compuesto de 10-12 unidades de isopreno en tripanosomátidos y 18-21 en mamíferos [16, 17]. En todos los casos la primera unidad de isopreno está saturada y tiene una función alcohol que puede estar esterificada con fosfato. El dolicol-fosfato (Fig. 3) actúa como transportador de Man y de Glc y el dolicol-difosfato participa como transportador del oligosacárido intermediario.



**Figura 3. Estructura del dolicol-fosfato y del uridina difosfato glucosa (UDP-Glc)**

En la Fig. 4 se detalla la secuencia de reacciones que conduce a la formación del oligosacárido transferido en las reacciones de N-glicosilación. Los primeros siete monosacáridos son transferidos directamente desde sus correspondientes nucleótido azúcares. Con la transferencia de GlcNAc-P a Dol-P a partir de UDP-GlcNAc, se forma Dol-P-P-GlcNAc al que se le agrega otro resto de GlcNAc también a partir de UDP-GlcNAc (Fig. 4, I y II). Luego se transfieren cinco restos de manosa a partir de GDP-Man (Fig. 4, III-VII). Estas reacciones utilizan los nucleótido azúcares disponibles en el citoplasma y son catalizadas por glicosiltransferasas situadas en la cara citoplasmática del RE [18, 19].



**Figura 4. Secuencia de reacciones en la biosíntesis de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$**

El intermediario  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  (Fig. 4, VII) se transloca hacia el interior del RE donde continúa la adición de restos de  $\text{Man}$  (Fig. 4, VIII-XI). El dador de los 4 últimos restos de  $\text{Man}$  es el  $\text{Dol-P-Man}$ . El agregado secuencial de tres restos de  $\text{Glc}$  utilizando  $\text{Dol-P-Glc}$  como dador de  $\text{Glc}$  completa la síntesis del  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  (Fig. 4, XI). Los sustratos dadores de  $\text{Man}$  y  $\text{Glc}$  en estas reacciones de glicosilación que ocurren en el interior del RE,  $\text{Dol-P-Man}$  y  $\text{Dol-P-Glc}$ , son sintetizados en la cara externa del RE a partir de  $\text{Dol-P}$  y los correspondientes nucleótidos azúcares. Luego son translocados hacia el interior del RE donde son utilizados como dadores de  $\text{Man}$  y  $\text{Glc}$  [18, 19].

La transferencia del oligosacárido precursor a las proteínas tiene lugar en forma co-traducciona l o post-traducciona l en interior del RE y es catalizada por la dolicol difosfato oligosacárido:proteína oligosacáridil transferasa [20, 21]. Esta enzima

parece reconocer la presencia de los tres residuos de glucosa en el oligosacárido transferido: la remoción de la glucosa más externa disminuye la velocidad de transferencia 10-20 veces. No se sabe aún qué es lo que determina que un resto de Asn sea glicosilado o no [22] pero se sabe que la oligosacariltransferasa reconoce específicamente al tripéptido Asn-X-Ser/Thr (X puede ser cualquier amino ácido excepto Pro) dentro de un marco adecuado, pero aún no identificado de la proteína aceptora. El oligosacárido transferido comienza a ser procesado inmediatamente después de ser transferido a la proteína. Los tres residuos de glucosa son removidos por dos glucosidasas específicas localizadas en el RE. La glucosidasa I, específica de uniones  $\alpha(1,2)$ , hidroliza el resto de glucosa más externo. La glucosidasa II remueve los dos residuos de glucosa más internos en unión  $\alpha(1,3)$ . También algunas manosas son removidas por manosidasas específicas localizadas en el retículo endoplásmico.

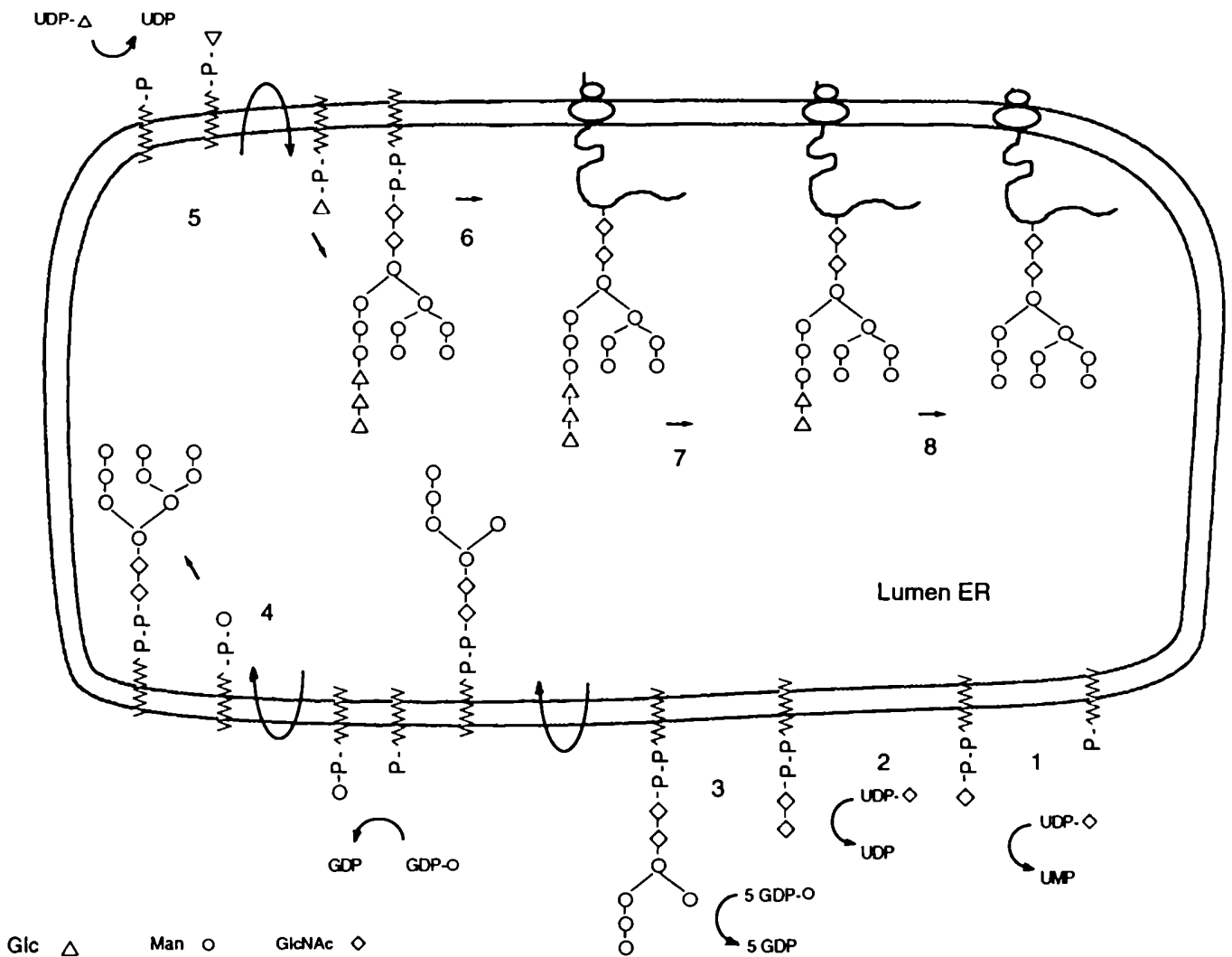


Figura 5. Topografía de las reacciones de N-glicosilación en el RE

## INTRODUCCION

Un procesamiento adicional de los oligosacáridos unidos a proteína ocurre a medida que las glicoproteínas migran a través de las distintas cisternas del Aparato de Golgi donde se exponen a las sucesivas glicosidasas y glicosiltransferasas que dan por resultado las distintas estructuras encontradas en las glicoproteínas maduras. En la Fig. 5 se resumen las reacciones de N-glicosilación y su topografía en el RE.

Los protozoarios de la familia de los tripanosomátidos poseen una serie de particularidades en su mecanismo de N-glicosilación de proteínas [23]. Son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc [24], el dador de los residuos de glucosa en el oligosacárido completo en otros eucariotes, por lo que transfieren a proteínas oligosacáridos no glucosilados de estructura  $\text{Man}_{6,7,9}\text{GlcNAc}_2$ , dependiendo de las especies. Estos oligosacáridos tienen la misma estructura que los correspondientes intermediarios en la síntesis del  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  de otros eucariontes.

Los tripanosomátidos que transfieren  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  o  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  resultaron ser deficientes en las manosiltransferasas involucradas en la transferencia del séptimo, octavo, y noveno o en las responsables de la transferencia del octavo y noveno residuos de manosa, respectivamente, en la síntesis de los oligosacáridos unidos a Dol-P-P [24].

La oligosacariltransferasa de los tripanosomátidos difiere de la enzima presente en otros eucariotes ya que no requiere la presencia de residuos de glucosa en el oligosacárido para catalizar su transferencia eficientemente, transfiriendo en ensayos libres de células  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$  con igual eficiencia [25]. Los mecanismos de N-glicosilación de proteínas descritos para varios tripanosomátidos se presentan en la Fig. 6.

**Crithidia fasciculata**

**Crithidia hamosa**

Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - P-P-dolicol

Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

**Leishmania mexicana**

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-dolicol

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

**Leishmania adleri**

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - P-P-dolicol

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>- Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

**Trypanosoma cruzi** (epimastigotes y amastigotes intracelulares)

**Trypanosoma conorhini**

**Trypanosoma dionisii**

Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - P-P-dolicol

Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>- Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot

Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot

**Trypanosoma cruzi** (amastigotes axénicos)

Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - P-P-dolicol

Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot

Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot

**Trypanosoma cruzi** (tripomastigotes)

Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> -P-P-dolicol

Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot  $\rightleftharpoons$  Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> -P-P-dolicol

Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot  $\rightleftharpoons$  Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> -Prot

Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> -Prot  $\rightleftharpoons$  Glc<sub>1</sub>Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot  $\rightleftharpoons$  Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> -Prot  $\rightleftharpoons$  Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Prot

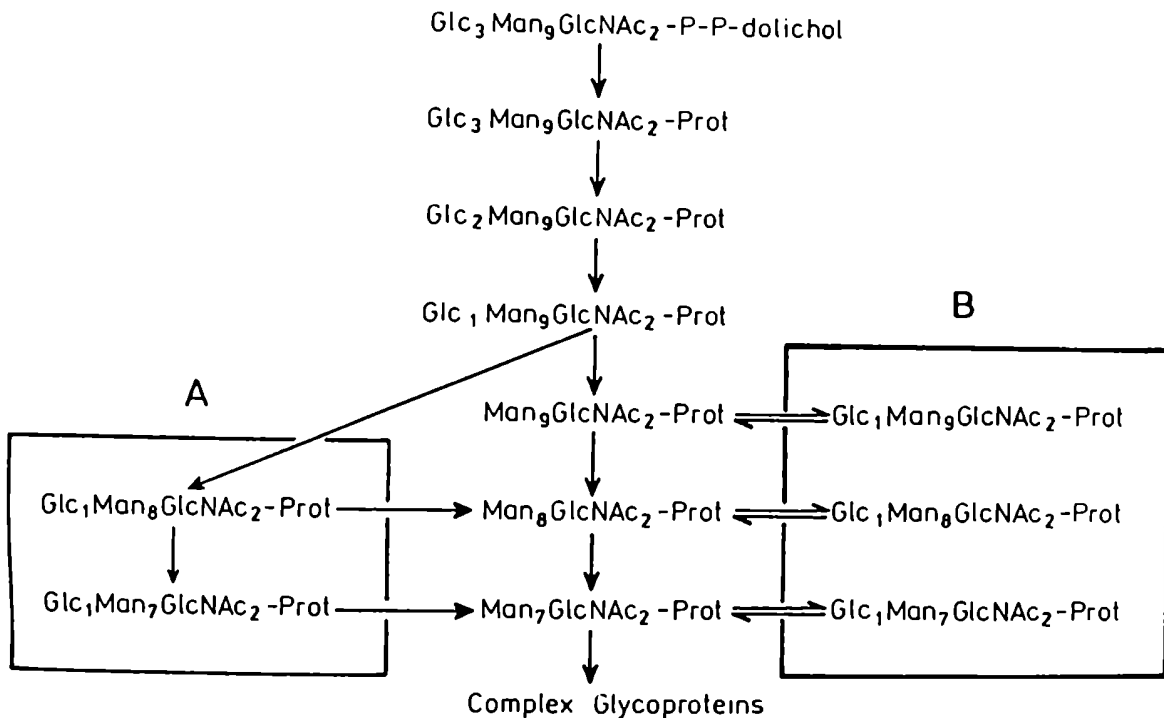
**Figura 6. Mecanismos de N-glicosilación de proteínas en tripanosomátidos**



## INTRODUCCION

A pesar de que estos microorganismos transfieren a proteína oligosacáridos no glucosilados, se encontraron oligosacáridos unidos a proteína glucosilados transitoriamente, de estructura  $\text{Glc}_1\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ , en células incubadas con  $^{14}\text{C}$ -glucosa [2-8]. Estos microorganismos no sintetizan derivados de dolicol glucosilados, por lo que la única vía para la aparición de glicoproteínas glucosiladas debía ser por glucosilación directa de los oligosacáridos unidos a las glicoproteínas. Los compuestos glucosilados desaparecieron tras un "chase" con glucosa no radioactiva.

Al realizar experimentos diseñados para estudiar la existencia del mecanismo de re-glucosilación de oligosacáridos unidos a proteínas en otros organismos, la formación transitoria de  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$  unidos a proteína a partir de los correspondientes  $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$  fue también encontrada en células de mamíferos, plantas y hongos incubadas con  $^{14}\text{C}$ -glucosa [9, 10]. Las evidencias obtenidas tanto *in vivo* como *in vitro* mostraron que en dichas células  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y parte de  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  se formaron por glucosilación de  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (camino B, Fig. 7) y no solamente por deglucosilación y demanosilación sucesivas de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (camino A, Fig. 7). Incubando las células con  $^{14}\text{C}$ -glucosa la marca en los restos de glucosa de  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  apareció casi instantáneamente mientras que hubo una demora en la marcación de los restos de manosa. La marca en los restos de manosa de los compuestos glucosilados apareció solamente cuando el tiempo de incubación fue suficiente para la aparición de marca en  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ . El intervalo de tiempo necesario para la marcación de restos de manosa y de glucosa en los compuestos glucosilados debería haber sido semejante si la formación de  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  hubiera ocurrido de acuerdo al camino A pero la diferencia observada en el intervalo fue compatible con el camino B.



**Figura 7. Mecanismos posibles para la formación de compuestos glucosilados**

A principio de los '80 ya se conocían los aspectos básicos del mecanismo de N-glicosilación de proteínas, al menos en las etapas iniciales de síntesis del precursor, su transferencia y procesamiento [1, 15]. A pesar de eso el mecanismo de re-glicosilación transitoria había quedado enmascarado ya que siempre se interpretó que los compuestos glucosilados provenían del camino A, Fig. 7. En los casos en que se encontraban oligosacáridos monoglucosilados unidos a proteínas, en diversas condiciones experimentales, se interpretaba que la glucosidasa II actuaba mucho más rápidamente sobre el  $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$  que sobre el  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$  (por ejemplo referencias [1, 26-34]).

Se hicieron algunos experimentos en sistemas libres de células para estudiar la glucosilación de glicoproteínas en los que se aprovecharon los aceptores endógenos presentes en la fracción microsomal utilizada como fuente de actividad enzimática [10]. En ellos se propuso que la glucosilación de glicoproteínas utilizaba UDP-Glc como dador de Glc, sin la intervención de derivados de Dol-P-Glc, lo que concuerda con que los compuestos monoglucosilados se hayan detectado en tripanosomátidos, los cuales no forman Dol-P-Glc. La actividad se localizó en el RE por fraccionamiento subcelular y requirió  $\text{Ca}^{++}$ , pero no  $\text{Mg}^{++}$  ni  $\text{Mn}^{++}$ . También se determinó que el resto de Glc transferido estaba unido al mismo resto de Man que en  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-}$

## INTRODUCCION

P-Dol.

El uso de aceptores endógenos no permitía demostrar inequívocamente la transferencia de un resto de Glc a N-oligosacáridos unidos a proteína, ni caracterizar el mecanismo de esta serie de reacciones o purificar las actividades enzimáticas involucradas. Con esa finalidad, en el trabajo presentado en esta Tesis se desarrolló un método para ensayar en forma específica la actividad glucosilante de glicoproteínas. Con él se logró detectar esta reacción en sistemas libres de células en mamíferos, hongos, plantas, tripanosomátidos y purificar a homogeneidad la glucosiltransferasa a partir de hígado de rata y estudiar algunas de sus propiedades.

## MATERIALES Y METODOS

## STANDARDS Y SUSTRATOS RADIOACTIVOS

*[<sup>14</sup>C]Glc<sub>1.3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol*: se obtuvieron incubando 3 g de crestas de oviducto de gallina ponedora con 500 µCi de [<sup>14</sup>C]glucosa (285 Ci/M, New England Nuclear) en 7 ml de solución de marcación conteniendo 40 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 85 mM NaCl, 5 mM sodio piruvato, 2 mM glutamina, vitaminas y amino ácidos no esenciales 1x (Gibco) y amino ácidos no esenciales 1x (Gibco). Luego de 4 hs a 37 °C se agregaron 14 ml de metanol y 21 ml de cloroformo y se desintegró la mezcla en un *Omni-Mixer*<sup>®</sup> (Sorvall). La interfase proteica se lavó una vez con 25 ml de cloroformo/metanol/agua (3:2:1), luego tres veces con 10 ml de agua y finalmente se extrajo 4 veces con 5 ml de cloroformo/metanol/agua (1:1:0.3). Los 4 extractos se combinaron, se secaron y se redisolviéron en el mismo solvente y se sembraron en una columna de DEAE-celulosa (forma acetato) equilibrada en el mismo solvente. Se lavó con 15 ml de cloroformo/metanol/agua (1:1:0.3) y los Dol-P-P-oligosacáridos se eluyeron con 15 ml de formiato de amonio 30 mM en el mismo solvente.

*[<sup>14</sup>C]Man<sub>7.9</sub>GlcNAc*: se obtuvieron por degradación con pronasa de la interfase proteica delipidada obtenida en la preparación anterior. Los glicopéptidos se trataron con Endo H y los oligosacáridos se aislaron por cromatografía descendente en papel con 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4).

*[glucosa-<sup>14</sup>C]Glc<sub>1.3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc*: se obtuvieron por hidrólisis ácida suave, 15 min 100 °C, 20 mM HCl de los derivados de Dol-P-P formados al incubar microsomas de hígado de rata con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc.

*[glucosa-<sup>14</sup>C]Glc<sub>1.3</sub>Man<sub>7.9</sub>GlcNAc*: se obtuvieron por tratamiento con pronasa de la interfase proteica delipidada obtenida en la preparación anterior, posterior tratamiento con Endo H de los glicopéptidos y aislamiento de los oligosacáridos por cromatografía descendente en papel con 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4).

*[<sup>14</sup>C]Man<sub>2</sub>* y *[<sup>14</sup>C]Man<sub>3</sub>*: se obtuvieron por acetólisis de [<sup>14</sup>C]Man<sub>7.9</sub>GlcNAc.

*UDP-[<sup>14</sup>C]Glc*: se obtuvo por la técnica descrita en [35].

El hexapéptido Tyr-Asn-Leu-Thr-Ser-Val con el C-term amidado se sintetizó en un sintetizador automático utilizando t-BOC-amino ácidos y se purificó por HPLC en fase reversa.

Para la acetólisis de los oligosacáridos se utilizó la técnica descrita en [7].

La aglutinina de soja se purificó como se describe en [36].

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry [37] o del Biuret [38]. La concentración de azúcares se determinó por el método del fenol-sulfúrico [39].

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

Se utilizaron ratas *Albinus wistar* adultas, machos o hembras.

Se utilizaron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen (stock Tul 2). Se cultivaron a 28 °C en medio compuesto por infusión cerebro corazón (33 g/l), Triptosa (3 g/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4 g/l), KCl (0.4 g/l), hemina (0.02 g/l) y 10% suero fetal bovino inactivado por calor, pH 7.2-7.4.

*Crithidia fasciculata* y *Leptomonas samueli* se cultivaron a 28 °C en un medio compuesto por NaCl (5 g/l), KCl (2 g/l), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5 g/l), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g/l), ácido ascórbico (0.2 g/l), sacarosa (2.5 g/l), ácido 3-[N-Morfolino]propanosulfónico (MOPS, 0.5 g/l), hemina (0.02 g/l), proteosa peptona (7.5 g/l), infusión cerebro corazón (7.5 g/l). El medio llevaba también infusión de hígado a razón de 5 g/l, agregados de la siguiente forma: se disuelven los 5 g en 100 ml de agua y se calientan con agitación durante 20 min a 65 °C y luego se agregan a los otros componentes, llevándolo al volumen final y ajustando el pH a 6.7-7.2.

*Mucor rouxii* se cultivó a 28 °C en medio compuesto por glucosa (20 g/l), peptona (20 g/l) y extracto de levadura (10 g/l).

### **PREPARACIÓN DE GLICOPÉPTIDOS DE TIPO POLIMANOSA**

Se incubaron 100 mg de tiroglobulina bovina (Sigma) en 3.5 ml de una solución conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 8.0, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mg de proteasa de *S. griseus* (Sigma) durante 4 días a 37 °C en atmósfera de tolueno. La reacción se calentó 5 min a 100 °C y se sembró en una columna de Concanavalina A-Sepharose (Pharmacia) de 0.5 x 7 cm equilibrada en buffer ConA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 150 mM). La columna se lavó con 20 ml del mismo buffer y luego con 15 ml de buffer ConA conteniendo 10 mM α-metil glucósido. Los glicopéptidos de tipo polimanosa se eluyeron con 20 ml de buffer ConA conteniendo 0.1 M α-metilmanósido. Este eluido se dividió en dos, cada una de las mitades se concentró a 0.5 ml y se pasaron por una columna de Sephadex G-10 fino (Pharmacia) equilibrada y corrida en isopropanol 7%. Se reunieron los excluidos conteniendo glicopéptidos, se concentraron y se determinó la concentración de azúcares con reactivo de antrona [39]. El rendimiento en glicopéptidos (mg de azúcar en los glicopéptidos/mg proteína) estimado usando [<sup>14</sup>C]Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc como standard interno, fue de 1.5-2% y concuerda bien con lo descrito [40].

### **PREPARACIÓN DE MICROSOMAS**

Para preparar microsomas de hígado de rata se utilizó el método clásico de fraccionamiento subcelular [41] con el que se obtienen vesículas microsomales cerradas orientadas correctamente (conservan la cara citoplasmática hacia afuera y el contenido del RE en su interior). Las ratas se dejaron en ayuno (sin comida pero con agua) 18 horas antes de sacrificarlas por decapitación en guillotina o por dislocación cervical. Se extrajeron los hígados y se colocaron inmediatamente en sacarosa 0.25 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, pH 7.4 (solución A) en hielo. Cuando los

microsomos se prepararon con la finalidad de purificar la glucosiltransferasa, se incluyó en esta solución 0.5 mM TPCK, 0.5 mM TLCK y 1 mM PMSF. Todos los pasos posteriores se realizaron en hielo o a 0-4 °C. Se perfundieron con solución A o se cortaron en trozos pequeños y se lavaron con la misma solución para limpiarlos de sangre. Finalmente se mezclaron los hígados con solución A en proporción 1:2 (Ej. 150 g de hígado con 300 ml de solución A). Se licuaron en *Omni-Mixer*<sup>®</sup> (Sorvall) ≈20 seg a máxima velocidad y se pasaron 4 veces por un homogeneizador (Potter) vidrio-*Teflon*<sup>®</sup>. El homogenato se centrifugó 10 min a 5,000 x g. El sobrenadante se centrifugó 10 min a 12,000 x g y el sobrenadante se ultracentrifugó 60 min a 100,000 x g. El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen posible de solución A con ayuda de un Potter, luego se diluyó hasta una concentración de proteínas ≈2-8 mg/ml y se ultracentrifugó nuevamente 60 min a 100,000 x g (lavado). El precipitado se resuspendió en solución A hasta una concentración de proteína ≈60 mg/ml. El rendimiento fue de 9-12 mg de proteína microsomal por cada gramo de hígado fresco.

También se prepararon microsomos de hígado de rata por cromatografía en Sepharose 2B<sup>®</sup> (Pharmacia) [42]. Con este método se evitan las ultracentrifugaciones, los microsomos resultan mucho menos contaminados con sangre y se adaptan perfectamente a los subsiguientes pasos de purificación.

Para preparar microsomos de otros orígenes se adaptó el protocolo descrito. Se procedió a la ruptura celular por el método más adecuado según el caso siempre utilizando solución A. Posteriormente se aplicó el método de fraccionamiento descrito para obtener lo que equivaldría a un sobrenadante postmitocondrial, para luego a partir de él obtener una fracción microsomal por ultracentrifugación a 100,000 x g 60 min. De esta forma se obtuvieron microsomos de *T. cruzi*, *C. fasciculata*, *L. samueli*, *M. rouxii* (la ruptura celular se hizo en un mortero con arena) y de porotos (la ruptura celular se hizo licuandolos en *Omni-Mixer*<sup>®</sup> y luego homogeneizando con Potter). Cuando se prepararon microsomos de *T. cruzi*, *C. fasciculata* y *L. samueli* con el fin de ensayar actividad de glucosidasa, en lugar de solución A. se utilizó buffer fosfato 0.1 M pH 7.1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM TLCK.

### *Determinación de la integridad de las vesículas microsomales*

Se determinó por la latencia de la glucosa-6-fosfatasa a la manosa-6-fosfato [43, 44]. En un volumen final de 100 µl se incubaron los microsomos (≈100 µg de proteína) en 50 mM Tris-maleato pH 6.5 y 20 mM manosa 6-fosfato durante 5 min a 37°C, en presencia o ausencia de 0.5% Triton X-100. La reacción se detuvo con 1 ml de TCA 10% y en los sobrenadantes se determinó el fosfato liberado por un método colorimétrico [45].

### **OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO, LISO Y APARATO DE GOLGI DE HÍGADO DE RATA**

Se preparó un sobrenadante post-mitocondrial como se describe más arriba para la preparación de microsomas de hígado de rata, pero en lugar de solución A se utilizó una solución compuesta de sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub>, 5 mM, KCl 25 mM.

Se colocaron fracciones de 10 ml de este sobrenadante post-mitocondrial en cada tubo del rotor SW40. Estos contenían 5 ml de sacarosa 2 M en el fondo del tubo y sobre esos 5 ml habían 10 ml de sacarosa 1.35 M. Luego de agregar los 10 ml de sobrenadante post-mitocondrial se cargaron otros 10 ml de sacarosa 0.25 M y se centrifugaron durante 120 min a 25.000 rpm.

Se tomó la interfase comprendida entre 0.25 M y 1.35 M (A) y la interfase comprendida entre 1.35 M y 2.0 M (B). A y B se diluyeron con sacarosa 0.25 M y se centrifugaron 60 min a 100,000 x g. El precipitado de A se resuspendió en 30 ml y el de B en 15 ml de sacarosa 1.35 M y se homogeneizaron con Potter. Se colocaron fracciones de 8 ml de A ó de B así resuspendidos, en tubos del rotor SW40 conteniendo 7.5 ml de sacarosa 2.0 M. Sobre esos 8 ml de A o de B se agregaron 7.5 ml de sacarosa 1.0 M y sobre éstos otros 6 ml de sacarosa 0.5 M. Se centrifugaron durante 120 min a 25,000 rpm.

Se tomaron las interfases comprendidas entre 0.5 M y 1.0 M (G), entre 1.0 M y 1.35 M (REL) y la comprendida entre 1.35 M y 2.0 M (RER).

REL y RER se resuspendieron en 50 ml y G en 25 ml de sacarosa 0.25 M, se homogeneizaron con Potter y se ultracentrifugaron 60 min a 100,000 x g.

Los precipitados se resuspendieron con Potter en 15 ml de sacarosa 1.35 M. Se cargaron de a 8 ml en tubos del rotor SW40 igual que en la última centrifugación en gradiente y se centrifugaron nuevamente 120 min a 25,000 rpm. De los tubos en que se había cargado la interfase "G" se tomó nuevamente la interfase blanquecina comprendida entre 0.5 M y 1.0 M, conteniendo las membranas del Aparato de Golgi. De los tubos en que se había cargado la interfase "REL" se tomó la interfase comprendida entre 1.0 M y 1.35 M, conteniendo membranas del retículo endoplásmico liso.

De los tubos en que se había cargado la interfase "RER" se tomó la interfase comprendida entre 1.35 M y 2.0 M, compuesta por membranas del retículo endoplásmico rugoso.

### **PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA GLUCOSIDASA II DE HÍGADO DE RATA**

Para el ensayo de actividad y la purificación parcial hasta la cromatografía en ConA-Sepharose se siguió el método previamente descrito [46, 47].

### **ENSAYO DE GLUCOSIDASAS I Y II**

Las mezclas de incubación contenían en un volumen total de 100  $\mu$ l, buffer fosfato 40 mM pH 7.1, 600-1000 cpm de los sustratos apropiados, 0.3% Triton X-100 y 0.4-0.9 mg de proteína microsomal. Luego de incubarlas durante el tiempo indicado a 30 °C se detuvieron con 0.1 ml de metanol y se calentaron 5 min a 60 °C. El sobrenadante se corrió en cromatografía ascendente en papel en 2-propanol/acético/agua (29:4:9) donde el oligosacárido queda en el origen de siembra y la glucosa liberada migra con un  $R_f \approx 0.4$ . También se corrió en 1-butanol/piridina/agua (6:4:3) para identificar el producto liberado.

### **TRATAMIENTOS EFECTUADOS SOBRE LA TIROGLOBULINA BOVINA**

#### *S-carboximetilación*

Las mezclas de reacción contenían en un volumen total de 5 ml, 50 mg de tiroglobulina bovina (Sigma), 150 mg de DTT, 2.4 g de urea, 2 mM EDTA y 0.2 M Tris-HCl pH 8.0. Luego de 3 horas a 40 °C se agregaron 940 mg de iodoacetamida ajustando el pH a 7-9 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Luego se dializaron contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y la proteína se precipitó con 4 volúmenes de metanol. Se resuspendió con urea 8 M a unos 10 mg/ml y se dializó contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0. A esta preparación se la llamará SCAM-Tg.

#### *Desnaturalización con urea 8 M*

La tiroglobulina se desnaturalizó por agregado de urea sólida a una solución de tiroglobulina bovina 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (0.95 g de urea por cada ml) o por diálisis de 1 ml de la solución de tiroglobulina contra 200 ml de urea 8 M. En ambos casos el tratamiento con urea se hizo durante 4-8 hs a temperatura ambiente o a 60 °C y luego la urea se retiró por diálisis contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 8.0. Ambos métodos producen tiroglobulina desnaturalizada con una capacidad semejante para actuar como sustrato aceptor de la glucosiltransferasa. La tiroglobulina así desnaturalizada con urea se llamará 8MU-Tg. Para desnaturalizar otras glicoproteínas que contienen oligosacáridos de tipo polimanosos para utilizarlas como aceptoras (Tiroglobulina porcina [48], RNAasa B (Sigma) [49], aglutinina de poroto de soja [50] se les agregó urea sólida hasta 8 M, se las incubó 4 hs a 60 °C y luego se dializaron contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0.

#### *Tratamiento con Endo H*

Se dializó 1 ml de 8MU-Tg contra 50 mM trietilamina acetato pH 5.5. El dializado se dividió en dos mitades de 0.5 ml c/u. A una de ellas se le agregaron 5 mU de Endo H (Sigma) y ambas se incubaron 24 hs a 37 °C. Luego se dializaron contra 100 mM acetato de sodio pH 3.5 y se dejaron en ese buffer 6 hs a 37 °C para inactivar la Endo H [51]. Ambas mitades se dializaron luego contra urea 8 M, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 4 horas y luego contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0.



*Tratamiento con  $\alpha$ -Manosidasa*

Se dializó 8MU-Tg contra 50 mM citrato de sodio pH 4.5, 0.1 mM acetato de zinc. El dializado se dividió en dos mitades de 0.5 ml c/u y a una de ellas se le agregaron 1.2 unidades de  $\alpha$ -manosidasa de *jack bean* (Sigma) previamente dializada contra el mismo buffer. Las dos mitades se incubaron a 37°C 20 min y luego se dializaron 4 horas contra urea 8 M, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 y por último contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0.

*Tratamiento con ácido nitroso*

Se disolvieron 10 mg de tiroglobulina en 1 ml de 10 mM acetato de sodio pH 3.5. La solución se dividió en dos mitades de 0.5 ml c/u y a una de ellas se le agregó 0.5 ml de nitrito de sodio 0.33 M y a la otra 0.5 ml de agua. Ambas se incubaron 5 hs a 28 °C, luego se dializaron 4 horas contra urea 8 M, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 y luego contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0.

**SOLUBILIZACIÓN Y ENSAYO DE GLICOSILTRANSFERASAS**

Se incubaron microsomas de hígado de rata en sacarosa 0.25 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, pH 7.4 (concentración de proteína 20 mg/ml) conteniendo 0.6% Triton X-100 durante 10 min a 0 °C y luego se centrifugaron 60 min a 100,000 x g. Se ensayaron las glicosiltransferasas en la mezcla de extracción con detergente antes de ultracentrifugarla y en el sobrenadante de la ultracentrifugación preincubado durante diferentes tiempos a 37 °C.

*Actividad glucosilante de tiroglobulina desnaturalizada*

Las mezclas de incubación contenían en un volumen total de 100  $\mu$ l, 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6% Triton X-100, 5  $\mu$ M UDP-[<sup>14</sup>C]Glc (285 Ci/mol), 50  $\mu$ M desoxinorjirimicina, 480  $\mu$ g de 8MU-Tg y 100  $\mu$ g de proteína microsomal (ya sea del sobrenadante de la extracción con detergente preincubado a 37 °C por diferentes tiempos o de la extracción sin centrifugar). Las reacciones se incubaron 3 min a 37 °C, se detuvieron con 1 ml de TCA 10% y se contaron como se indica en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA". Se tomó como 100% la incorporación obtenida usando como fuente de enzima la extracción sin centrifugar (2400 cpm).

*Dolicol-P-Glc sintasa*

Las mezclas de incubación contenían en un volumen total de 100  $\mu$ l, 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6% Triton X-100, 5  $\mu$ M UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, 10  $\mu$ g de Dol-P (Sigma) y 100  $\mu$ g de proteína microsomal (ya sea del sobrenadante de la extracción con detergente y preincubado a 37 °C por diferentes tiempos o de la extracción sin centrifugar). Las reacciones se incubaron 3 min a 37 °C y se detuvieron agregando 1 ml de cloroformo/metanol (3:2). La fase inferior se extrajo tres veces con cloroformo/metanol/agua (1:16:16) y luego se contó por centelleo líquido. Se tomó como 100% la incorporación obtenida usando como fuente de enzima la extracción sin centrifugar (7600 cpm).

### *Oligosacariltransferasa*

Las mezclas de incubación contenían en un volumen de 50  $\mu$ l, 50 mM Tris-maleato pH 7.6, 10 mM  $MnCl_2$ , 0.6% Triton X-100, 2 mM del hexapéptido Tyr-Asn-Leu-Thr-Ser-Val, 50  $\mu$ M desoxinorjirimicina, 10.000 cpm de [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_1$ - $_3$ Man $_9$ -GlcNAc $_2$ -P-P-Dol y 100  $\mu$ g de proteína microsomal (ya sea del sobrenadante de la extracción con detergente preincubado a 37 °C por diferentes tiempos o de la extracción sin centrifugar). Las reacciones se incubaron 3 min a 37 °C y se detuvieron con 0.25 ml de metanol/agua (1:1). Los precipitados se lavaron con 0.5 ml de metanol/agua (1:1), se combinaron ambos sobrenadantes y se corrieron en electroforesis en papel en ácido fórmico 10% a 25 volt/cm 2 horas. Se tomó como glicopéptido a la radioactividad que corrió como un pico cargado positivamente. Se tomó como 100% la incorporación obtenida usando como fuente de enzima la extracción sin centrifugar (2400 cpm).

### **ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA**

Las mezclas de reacción contenían en un volumen final de 50  $\mu$ l, 10 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 2  $\mu$ M UDP-[ $^{14}C$ ]glucosa (285 Ci/mol), 200  $\mu$ g de tiroglobulina bovina o aglutinina de soja desnaturalizadas y 5  $\mu$ l de la fracción a ensayar. Si es necesario, como en el caso de usar membranas no permeabilizadas como fuente de enzima, se incluye 0.5% Lubrol o Triton X-100 en las mezclas de reacción sin interferencia. Se incubaron un cierto tiempo a 37 °C (5 min cuando se analizaron los diferentes pasos de purificación; el consumo de sustrato dado en general no supera el 20%) y se detiene la reacción con 1 ml de TCA 10%. El precipitado proteico se lava 2 veces con 1 ml de TCA 10%. El precipitado del último lavado se disuelve en 0.5 ml de alguna mezcla solubilizadora comercial (Hyamine®, Protosol®, Soluene®) compatible con la solución centelleadora (tolueno/PPO/POPOP) o en 0.5 ml de NaOH 0.5 N en metanol. Luego se le agregan 3 ml de solución centelleadora, 15  $\mu$ l de acético glacial y se cuenta por centelleo líquido.

Para analizar los oligosacáridos formados se detuvieron las reacciones con 3 volúmenes de metanol y se calentaron a 50 °C 5 min. El precipitado proteico se degradó en 3 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, 2 mM  $CaCl_2$  y 2 mg de proteasa de *S. griseus* (Sigma) 48 hs a 37 °C bajo atmósfera de tolueno. La digestión se concentró a 1 ml por evaporación, se centrifugó y el sobrenadante se desaló en una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia) equilibrada y corrida en isopropanol 7%. Los glicopéptidos excluidos se corrieron en electroforesis en papel en ácido fórmico 10% 2 hs a 25 volt/cm. El pico cargado positivamente se eluyó del papel y se trató con 1 mU de Endo H (Sigma) en un volumen total de 350  $\mu$ l de 50 mM acetato de trietilamina pH 5.5 a 37 °C 20 hs. Esta reacción se corrió nuevamente en electroforesis en papel en ácido fórmico 10% a 25 volt/cm 2 horas. El pico neutro, correspondiente a los oligosacáridos liberados por la Endo H se eluyó y se corrió en cromatografía descendente en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4).

**OBTENCIÓN DE SUERO ANTITIROGLOBULINA**

Se inyectaron en un conejo 5 mg de tiroglobulina bovina en adyuvante completo de Freund por vía intramuscular. A los 15 días se inyectaron otros 5 mg en adyuvante incompleto por vía subcutánea y 15 días después se sangró al conejo. El suero obtenido se precipitó llevándolo a 50% de saturación de sulfato de amonio. El precipitado se disolvió y se dializó contra 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl. La especificidad del suero obtenido se determinó por inmunodifusión radial (método de Ouchterlony).

**GLUCOSILACIÓN DE TIROGLOBULINA (TABLA V)**

Las mezclas de reacción contenían en un volumen de 100  $\mu$ l 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2  $\mu$ M UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (285 Ci/mol), 450  $\mu$ g de proteína microsomal como vesículas intactas o sonicadas, 500 o 200  $\mu$ g de 8MU-Tg (experimento 1 y 2 respectivamente) y 0.5% Triton X-100 cuando se indica. Luego de 5 min a 37 °C se agregaron 100  $\mu$ l de 0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA y 0.5 ó 1% Triton X-100 (según las reacciones tuvieran o no detergente respectivamente). En estas condiciones tanto la glucosidasa II como la glucosiltransferasa resultaron completamente inhibidas (por la elevada concentración de Tris y de EDTA respectivamente). Las reacciones se ultracentrifugaron 60 min a 100,000 x g y a 150  $\mu$ l del sobrenadante se le agregaron 100  $\mu$ l de antisuero anti-tiroglobulina (o suero preinmune), que en el experimento 2 contenían además las adiciones que se indican en la tabla. Para permitir la formación y precipitación de los inmunocomplejos, se incubaron primero 10 min a 37 °C y luego 30 min a 0 °C. Finalmente se centrifugaron 5 min a 3,000 x g. Los precipitados se lavaron dos veces con 0.4 ml de NaCl 0.15 M, 50 mM Tris-HCl pH 7.4 y luego se contaron por centelleo líquido como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA".

**TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS CON TRIPSINA (TABLA VIII)**

Se incubaron los microsomas (100  $\mu$ g de proteína) en sacarosa 0.25 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, pH 7.4 con 1 mg de tripsina en presencia o ausencia de 0.5% Lubrol durante 30 min a 37°C. Luego se agregaron 1.5 mg de inhibidor de tripsina de soja y se incubó 5 min a 37°C. La glucosiltransferasa se ensayó en 50  $\mu$ l de volumen final conteniendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\mu$ M UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (285 Ci/mol), 0.5% lubrol, 250  $\mu$ g de 8MU-Tg, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 10  $\mu$ l de las vesículas a ensayar. Las reacciones se incubaron 5 min a 37 °C y se procesaron como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA".

La Dol-P-Glc sintasa se ensayó en 50  $\mu$ l de volumen final conteniendo 10  $\mu$ g de Dol-P, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.6% Triton X-100, 2  $\mu$ M UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (285  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol), 50 mM Tris-maleato pH 7.6 y 30  $\mu$ l de las vesículas a ensayar. Las reacciones se incubaron a 37°C y a los 10 min se agregó 0.15 ml de agua y 1 ml de cloroformo/metanol (3:2). La fase inferior se lavó tres veces con cloroformo/metanol/agua (1:16:16) y se contó por centelleo líquido.

**SOLUBILIZACIÓN DE LA GLUCOSILTRANSFERASA**

*Experimento 1:* se sometieron microsomas de hígado de rata (14 mg/ml) en solución A a pasaje por French press (20 ml/min, 100 Kg/cm<sup>2</sup>) o a sonicación (Branson Sonifier Cell Disruptor Model W 140, 6 veces 10 segundos c/u, intensidad 3, micro-tip). Ambas muestras y el control sin tratamiento se ultracentrifugaron 60 min a 100,000 x g. Se midió la glucosiltransferasa en los tres tratamientos (control, French press y sonificado) tanto en las mezclas sin centrifugar como en los sobrenadantes de las ultracentrifugaciones como en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" pero incluyendo 0.5% Lubrol en las reacciones.

*Experimento 2: Partición en Triton X-114.* El detergente se lavó con TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl), 5 mM 2-mercaptoetanol a 0 °C y luego se llevó la mezcla homogénea a 30 °C. Tras centrifugar, la fase inferior se lavó otras dos veces de la misma manera. Para la extracción de la glucosiltransferasa se agregaron 10 µl de microsomas (65 mg/ml) a una mezcla formada por 480 µl de TBS más 10 µl de Triton X-114 lavado. La extracción se incubó 5 min a 0 °C, seguidos de 5 min a 30 °C y luego se centrifugó 2 min a 3,000 x g. Se tomaron 250 µl del sobrenadante a los que se le agregaron otros 5 µl de Triton X-114 y se incubó 5 min a 0 °C seguidos de 5 min a 30 °C y se centrifugó 2 min a 3,000 x g, tomando este sobrenadante como extracto soluble. Se midió la glucosiltransferasa en el extracto soluble y en la mezcla de extracción sin particionar. Las condiciones de reacción fueron como las de "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" incluyendo 0.5% Lubrol en las reacciones.

**CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE GLUCOSILACIÓN ENDÓGENA (TABLA X)**

Se incubaron microsomas de hígado de rata (1 mg de proteína) en un volumen total de 60 µl de 0.25 M sacarosa, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, y 2 µM UDP-[<sup>14</sup>C]Glc (285 Ci/mol) durante 5 min a 37 °C al cabo de los cuales se agregaron 40 µl de una solución conteniendo 0.25 M sacarosa, 50 mM UDP-Glc y 2.5 mM desoxinorjirimicina (para detener la incorporación de [<sup>14</sup>C]-Glc e impedir la deglucosilación de los productos formados). De esta mezcla se retiraron alícuotas de 10 µl que se diluyeron con: (a) 190 µl de sacarosa 0.25 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, pH 7.4 (b) lo mismo que (a) pero se sonicó (idem "SOLUBILIZACIÓN DE LA GLUCOSILTRANSFERASA") y (c) 190 µl de 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Las tres fracciones se ultracentrifugaron 60 min a 100,000 x g, se separaron los sobrenadantes y se midió la radioactividad tanto en los precipitados como en los sobrenadantes de la ultracentrifugación luego de lavarlos tres veces con TCA 10%.

**PURIFICACIÓN DE LA GLUCOSILTRANSFERASA DE HÍGADO DE RATA***Extracción*

Como material de partida se utilizaron microsomas de hígado de rata preparados como se describe más arriba. Estos pueden guardarse varios días a -20 °C. Se diluyeron hasta una concentración de 10 mg/ml y se ajustaron a 20 mM Tris-HCl

pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoetanol. Se pasaron por *French Press* a unos 20 ml/min y 100 Kg/cm<sup>2</sup>. Luego se ultracentrifugaron 60 min a 100,000 x g y se tomó el sobrenadante conteniendo mayoritariamente el contenido soluble de la fracción microsomal y el 100% de la glucosiltransferasa.

La glucosiltransferasa se pudo extraer en forma soluble llevando los microsomas diluïdos en solución A a una concentración de Lubrol o de Triton X-100 de 0.1-0.2% en lugar de pasarlos por *French press*, también con un 100% de rendimiento. Pero si bien utilizando detergentes se evitó el pasaje por *French press*, el extracto no se pudo precipitar con sulfato de amonio; se insolubilizó una fracción proteica en la cual estaba la glucosiltransferasa pero esta fracción no precipitó, sino que al centrifugarla floculó. De todos modos se pudo continuar la purificación con las cromatografías descritas más adelante con resultados equivalentes, sin hacer la precipitación con sulfato de amonio, sólo que al final del proceso aumentó la cantidad de algunos contaminantes. En estos casos el detergente se utilizó sólo en la extracción y no fue necesario incluir detergentes en ninguno de los pasos posteriores.

También se solubilizó la glucosiltransferasa tratando los microsomas diluïdos en solución A, pH 7,4-8.0, con saponina 0.5%. Este extracto se fraccionó con sulfato de amonio o se siguió con las distintas cromatografías sin hacer la precipitación con sulfato de amonio. La saponina se utilizó sólo en la extracción y no se incluyó saponina ni otros detergentes en los sucesivos pasos de purificación.

#### *Precipitación con sulfato de amonio*

Al extracto soluble obtenido con la *French Press* se le agregó un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio pH 8.0, gota a gota y con agitación suave llevando a 50% de saturación (pudo agregarse el sulfato de amonio sólido con iguales resultados). Se dejó 30 min a 0 °C con agitación suave y se centrifugó 10 min a 8,000 x g. El precipitado se resuspendió en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 5 mM 2-mercaptoetanol (solución B) y se dializó contra el mismo buffer. La bolsa de diálisis contenía una suspensión con abundante cantidad de material insoluble que no se clarificó totalmente por centrifugación por lo que fue necesario ultracentrifugarlo 60 min a 100,000 x g. El rendimiento de glucosiltransferasa en el material contenido en el interior de la bolsa de diálisis fue alto (80-100%) pero en el sobrenadante de la ultracentrifugación no se recuperó la totalidad de la actividad, lo que dejó un rendimiento que varió entre un 50 y un 80%. Este sobrenadante es lo que se consideró la fracción purificada por precipitación con sulfato de amonio. La preparación pudo congelarse entre cualquiera de los pasos descritos hasta aquí sin pérdida significativa de actividad en 24-48 hs.

#### *DEAE-celulosa*

Cuando el extracto soluble no se obtuvo con detergentes, luego del sulfato de amonio se agregó a la muestra Lubrol concentrado hasta una concentración final de 0.1%. Se sembró en una columna de DEAE-celulosa pre-equilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 5 mM 2-mercaptoetanol (solución B). El 2-mercaptoetanol resultó necesario

para aumentar la estabilidad de la enzima y para permitir una buena resolución en las sucesivas cromatografías, por lo que se lo incluyó en los buffers de todos los pasos de purificación. Generalmente se utilizó una columna de 1.8 x 20 cm en la que se cargaron hasta 400 mg de proteínas totales. Luego de lavarla con un volumen de columna de solución B. se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 150 ml entre 0 y 0.5 M en solución B. Se utilizaron distintos tipos de soportes con iguales resultados: DE-52 (Whatman), DEAE-Sephacel o DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia). Dependiendo de la cantidad de muestra a cromatografiar, se emplearon columnas de diferentes dimensiones con resultados semejantes, eluyendo siempre con un gradiente lineal de 0 a 0.5 M NaCl de 5 volúmenes de columna. El eluido de la DEAE es inestable: a 0 °C y a -20 °C pierde actividad en pocos días. Reduciendo la concentración de NaCl por diálisis aumenta ligeramente la estabilidad pero es aconsejable hacer la cromatografía en ConA-Sepharose inmediatamente después de la DEAE, sin almacenar las preparaciones.

#### *Concanavalina A-Sepharose*

Al pico de actividad eluido de la DEAE se lo llevó a 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub> y 2 mM MgCl<sub>2</sub>. y se lo pasó 2 veces por una columna de Con A-Sepharose (Pharmacia) de 1.6 x 2 cm equilibrada en buffer ConA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 150 mM). Se lavó con buffer ConA hasta absorbancia a 280 nm ≈ 0 y luego se pasaron por la columna 5 ml de buffer ConA conteniendo α-metilmanósido al 8% a 0 °C. Luego se dejó la columna a 37 °C durante 30-60 min al cabo de los cuales se eluyó a 37 °C con buffer ConA conteniendo 8% α-metil manósido. La estabilidad del eluido de la ConA-Sepharose es semejante al de la DEAE.

#### *Mono Q*

Se utilizó una columna *Mono Q*<sup>®</sup> HR 5/5 (Pharmacia) corrida a un flujo de 1 ml/min en un equipo de FPLC o de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. El pico de actividad eluido de la ConA-Sepharose se diluyó a la mitad con Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 5 mM 2-mercaptoetanol (solución B) y se sembró en la columna equilibrada en la misma solución. Se eluyó con un gradiente de NaCl en solución B, de 0 a 0.25 M en 5 minutos y luego de 0.25 M a 0.45 M en otros 20 minutos (25 minutos en total). El pico de actividad eluido de esta primera *Mono Q* se recromatografió en idénticas condiciones (se diluyó con 4 volúmenes de solución B para sembrarlo en la columna). La estabilidad del eluido de la *Mono Q* es muy reducida pero se puede aumentar disminuyendo la concentración de NaCl por diálisis y agregando sacarosa en altas concentraciones (10-30%). Es aconsejable realizar la Phenyl-Superose inmediatamente después de la *Mono Q* (1ra. o 2da.).

#### *Phenyl-Superose*

Se utilizó una columna *Phenyl-Superose*<sup>®</sup> HR 5/5 (Pharmacia) corrida a un flujo de 0.5 ml/min en un equipo de FPLC o de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. El

pico de actividad eluido de la Mono Q se diluyó con 10 volúmenes de sulfato de amonio 1 M, 5 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM imidazol pH 7.0 (solución C) y se sembró en la columna equilibrada en el mismo buffer. Se eluye con un gradiente lineal de 20 ml desde 100% solución C hasta 100% solución D (5% sacarosa, 5 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM imidazol pH 7.0) y luego se continuó la elución con solución D. El eluido de esta columna es estable, conservando 70-100% de actividad luego de 2-3 semanas a -20 °C.

#### *Superosa 12*

Se utilizó una columna *Superose*<sup>®</sup> 12 HR 10/30 (Pharmacia) corrida a un flujo de 0.5 ml/min en un equipo de FPLC o de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. La glucosiltransferasa se corrió en Imidazol 10 mM pH 7.0, 5 mM 2-mercaptoetanol, 5% sacarosa. Los marcadores de peso molecular se corrieron en fosfato 100 mM pH 7.0.

#### *Ultrogel AcA 34 y AcA*

Se corrieron columnas de 1 x 90 cm a 0-4 °C. La glucosiltransferasa se corrió en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 5 mM 2-mercaptoetanol, 5% sacarosa. Los marcadores de peso molecular se corrieron en fosfato de sodio 100 mM pH 7.0

#### *HPLC Fase reversa*

Se utilizó una columna Aquapore Butyl (Brownlee<sup>™</sup> RP-butyl 300, 7 micrones, Applied Biosystems) 2.1 x 30 mm corrida en HPLC a 0.1 ml/min con monitoreo continuo a 215 o 280 nm o por arreglo de diodos. Se eluyó con un gradiente lineal desde 2% hasta 82% de isopropanol 50 %, ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 %. El eluido de esta columna se analizó únicamente por electroforesis en SDS-PAGE.

#### *Alquilación con 4-vinilpiridina*

Se trató la proteína en un volumen total de 100 µl (≈100 µg de proteína) de Tris-HCl 100 mM pH 8.0 con 10 µl de DTT (1 mg/ml) 2 horas a temperatura ambiente o 30 min a 50 °C. Luego se agregó 1 µl de 4-vinilpiridina y se incubó nuevamente 2 horas a temperatura ambiente o 30 min a 50 °C [52]. Se detuvo la reacción desalando la proteína en una columna de Sephadex G-25 superfino equilibrada y eluida en 0.13% TFA.

#### *Digestión con Endo Lys-C*

Se disolvieron ≈50 µg de glucosiltransferasa de hígado de rata pura, reducida y alquilada con 4-vinilpiridina en 100 µl de Tris-HCl 100 mM pH 8.0, 1 M guanidina y se agregó 1 µg de endoLys-C (Wako). Se incubó a 37 °C 16 hs. Los péptidos generados se separaron en una columna Aquapore Butyl (Brownlee<sup>™</sup> RP-butyl 300, 7 micrones, Applied Biosystems) 2.1 x 30 mm, eluida con un gradiente lineal de isopropanol, 0.1% TFA.

#### *Electroforesis y electrotransferencia de proteínas*

Se utilizaron geles de poliacrilamida de 8 x 10 x 0.1 cm con sistema de buffer discontinuo [53]. Los geles se fijaron con metanol/ácido acético/agua (50:10:40), luego se

tiñieron con Coomasie Blue R-250 (Sigma) al 0.1% en la misma solución y se destiñieron con la solución de fijación.

Para transferir las proteínas se corrió la muestra en SDS-PAGE y luego se transfirió en un aparato de electrotransferencia semiseca *Semiphor™ TE 77* (Hoefer). Se utilizó el buffer de electroforesis conteniendo 10% metanol, y se transfirió durante 30 min a 80 mA (10 volt iniciales) a una membrana de PVDF (*ProBlot™*, Applied Biosystems) o de nitrocelulosa (*Hybond™-C*, Amersham). Las membranas de PVDF se tiñieron con Coomasie Blue R-250 al 0.1% en metanol/ácido acético/agua (50:10:40) durante 1 min, se destiñieron en la misma solución pero sin colorante y luego se enjuagaron con agua destilada. Las membranas de nitrocelulosa se tiñieron con Ponceau S (Sigma) 0.1% en ácido acético 1% durante 1 min, se destiñieron la misma solución sin colorante y luego se enjuagaron con agua destilada.

#### **ANTICUERPOS CONTRA LA GLUCOSILTRANSFERASA DE HÍGADO DE RATA**

Para obtener anticuerpos contra la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata se utilizó una preparación parcialmente purificada. Se corrió en electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) preparativa y se electroeluyó la banda correspondiente a la glucosiltransferasa. Se controló la pureza del material electroeluido por SDS-PAGE. Se inyectaron en un conejo 300 µg de la proteína electroeluida en adyuvante completo de Freund por vía intradérmica (día 1). A los 30 días se inyectaron otros 300 µg en adyuvante incompleto por vía subcutánea (día 31). 30 días después (día 61) se inyectaron otros 200 µg en adyuvante incompleto por vía subcutánea y 30 días después (día 91) se sangró al conejo.

#### *Inmunoprecipitación de la glucosiltransferasa*

Para inmunoprecipitar la glucosiltransferasa se utilizó un extracto con detergente de microsomas de hígado de rata. Las mezclas de inmunoprecipitación contenían en un volumen total de 100 µl, 10 µl del extracto, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl (TBS) y los siguientes agregados: (1) 10 µl de suero antiglucosiltransferasa; (2) 10 µl de suero preinmune; (3) 10 µl de 0.5% BSA. Se incubaron 60 min a temperatura ambiente al cabo de los cuales se agregaron 100 µl de proteína A-Sepharose (Sigma, 1:1 en TBS) y se incubaron otros 60 min a temperatura ambiente. Luego se retiraron los sobrenadantes y las perlitas de proteína A-Sepharose se lavaron 3 veces con 0.5 ml de TBS. Se midió la actividad de glucosiltransferasa en los inmunoprecipitados en un ensayo similar al descrito en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA".

#### *Western Blot*

Las hojas de nitrocelulosa se enjuagaron 5 min en TBS y luego se bloquearon durante 60 min en 3% BSA en TBS. Luego se incubaron con el anticuerpo a ensayar diluido en 3% BSA en TBS durante 60 min. Se lavaron 2 veces con TBS 5 min, una vez con 0.05% Nonident-P40 en TBS 5 min y otras 2 veces con TBS 5 min. Luego se incubaron con <sup>125</sup>I-Proteína A (Sigma, 500.000 cpm/ml) disuelta en 3% BSA en TBS, 60 min y se repitieron los lavados anteriores y se expuso a autoradiografía.

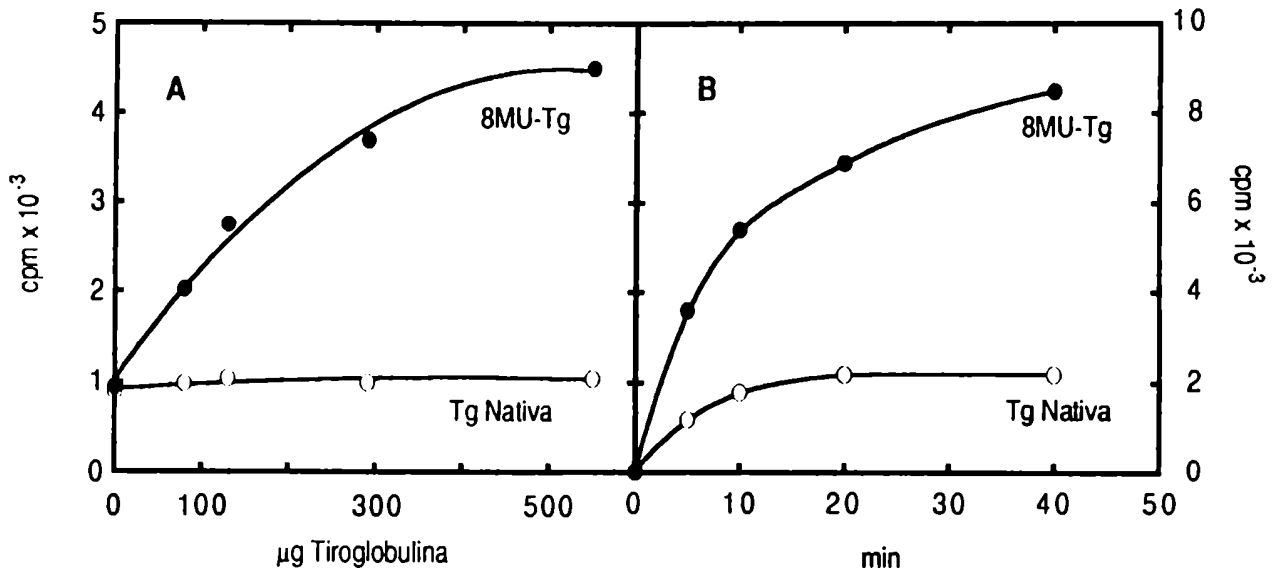


## RESULTADOS

### **ESTIMULACIÓN DE LA GLUCOSILACIÓN DE PROTEÍNAS POR TIROGLOBULINA**

Como se describiera en *INTRODUCCIÓN*, había dos tipos de evidencias que indicaban la transferencia de un resto de glucosa a oligosacáridos unidos a proteínas. Primero, por experimentos de pulso y *chase in vivo* y segundo, por la formación en sistemas libres de células de [*glucosa*-<sup>14</sup>C]-Glc<sub>1</sub>Man<sub>7-9</sub>GlcNAc unidos a proteínas al incubar UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y microsomas de hígado de rata, los que contenían la actividad glucosilante y los aceptores endógenos. El punto de partida para tratar de estudiar esta reacción fue disponer de un ensayo en el que se pudieran hacer reaccionar los sustratos en presencia de una fracción con la actividad enzimática propuesta y lograr obtener los productos. Como sustrato aceptor se buscó una glicoproteína con alto contenido de oligosacáridos de tipo polimanosa y para ello se eligió la tiroglobulina bovina [54]. Como sustrato dador de restos de Glc se utilizó UDP-[<sup>14</sup>C]Glc.

En la Fig. 8 puede verse que incubando microsomas de hígado de rata con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc se forma material radioactivo insoluble en 10% TCA identificado como [*glucosa*-<sup>14</sup>C]-Glc<sub>1</sub>Man<sub>7-9</sub>GlcNAc [4]. El agregado de tiroglobulina nativa a las mezclas de reacción, en presencia o ausencia de detergentes, no aumentó ni disminuyó la formación de estos compuestos (Fig. 8, A). Dado que se acepta que el procesamiento de oligosacáridos se detiene en la etapa de polimanosa cuando los oligosacáridos están poco accesibles a las enzimas procesadoras [55, 56], se consideró la posibilidad de que los oligosacáridos de tipo polimanosa de la tiroglobulina nativa fueran poco accesibles para la hipotética actividad glucosilante. La tiroglobulina se desnaturizó con urea 8 M y así desnaturizada logró estimular la formación de material radioactivo insoluble en 10% TCA (Fig. 8, A). Otros tratamientos desnaturizantes como S-carboximetilación, calentamiento a alto o bajo pH [57-60] resultaron igualmente efectivos en convertir a la tiroglobulina nativa en aceptoras. Otras glicoproteínas que contienen oligosacáridos de tipo polimanosa como la tiroglobulina porcina [48], la aglutinina de poroto de soja [50] y la RNAasa B [49] desnaturizadas con urea 8 M también resultaron aceptoras, pero en todos los casos sólo reaccionó la forma desnaturizada y no la forma nativa.



**Figura 8. Glucosilación de tiroglobulina por microsomas de hígado de rata**

(A) Las mezclas de incubación contenían en un volumen final de 100 µl, 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6% Triton X-100, 6 µM UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, 200 µg proteína microsomal, 200 µM desoxinorjirimicina y cantidades variables de tiroglobulina desnaturalizada (●-●) o nativa (○-○) (en ambos casos la tiroglobulina se dializó contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0 antes de los ensayos). Luego de 4 min a 37 °C se detuvieron las reacciones con 1 ml de TCA 10% y se procesaron como se describe en *MATERIALES Y METODOS*.

(B) Las mezclas de incubación contenían en un volumen final de 100 µl, 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6% Triton X-100, 3 µM UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, 250 µg proteína microsomal y (●-●) 150 µg de tiroglobulina desnaturalizada. Se incubaron durante los tiempos indicados a 37 °C, se detuvieron con 1 ml de TCA 10% y se procesaron como se describe en *MATERIALES Y METODOS*.

**EFFECTO DE INHIBIDORES DE LAS GLUCOSIDASAS I Y II.**

Se sabe que las glucosidasas I y II procesadoras de oligosacáridos reconocen en sus sustratos los residuos de manosa, por lo que  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}$  son mucho mejores sustratos que  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_{4-5}\text{GlcNAc}$  [61-64]. Estas glucosidasas están también presentes en los microsomas de hígado de rata utilizados como fuente de actividad glucosilante de glicoproteínas. Se consideró la posibilidad de que los oligosacáridos de tipo polimánosa de la tiroglobulina desnaturalizada utilizada en la reacción estuvieran interactuando con las glucosidasas inhibiéndolas. De ocurrir esto, la estimulación observada en presencia de tiroglobulina desnaturalizada podría haberse debido a la inhibición de la acción de las glucosidasas sobre los productos de glucosilación endógena.

Para descartar esta posibilidad se estudió el efecto de inhibidores de las glucosidasas I y II sobre el ensayo descrito en el apartado anterior. El agregado de altas concentraciones de Tris o de desoxinorjirimicina (inhibidores de las glucosidasas I y II [65]), no aumentó la formación de material marcado insoluble en TCA 10% y tampoco impidió la estimulación por tiroglobulina desnaturalizada (Tabla I). Esto descarta que la tiroglobulina estimule la formación de  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}$ -Prot por estar inhibiendo la deglucosilación de los productos que se forman en ausencia de tiroglobulina desnaturalizada.

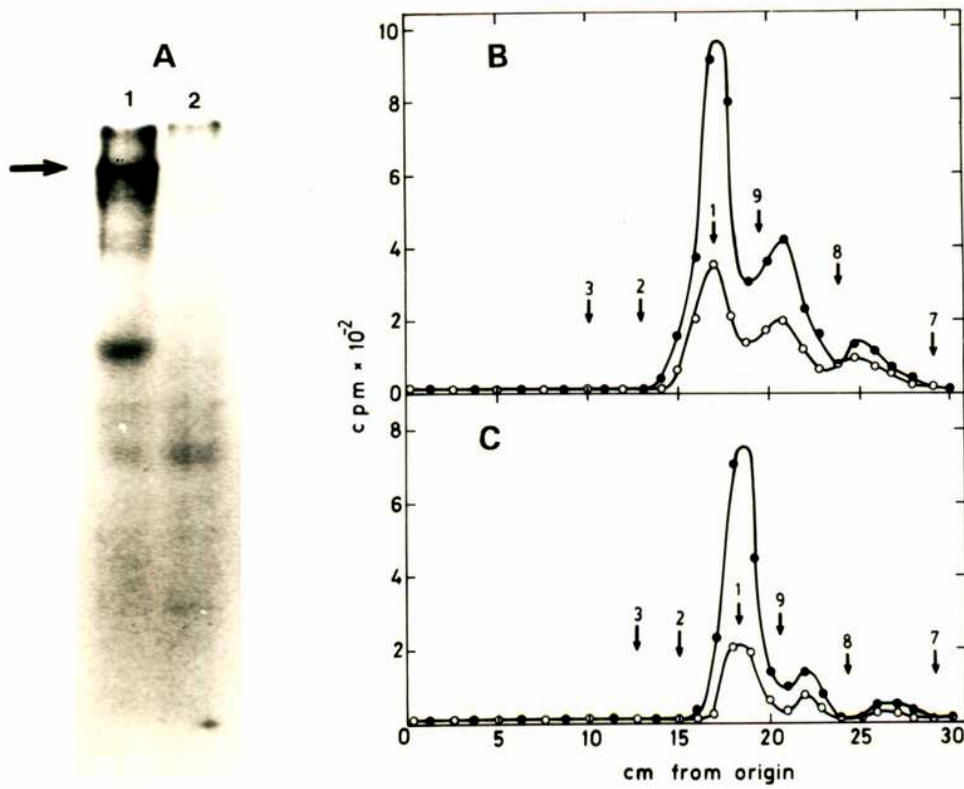
**TABLA I.** Efecto de inhibidores de las glucosidasas I y II

Condiciones de incubacion			
Tris-HCl pH 8.0 (mM)	Desoxinorjirimicina 300 $\mu\text{M}$	8MU-Tg	cpm TCA insoluble
10	-	-	1529
10		+	3602
135			370
135		+	832
135	+		392
135	+	+	842

**CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS GLUCOSILADOS**

Para caracterizar los productos de reacción formados en el ensayo propuesto se analizaron las mezclas de reacción similares a las descritas en la Fig. 8 por SDS-PAGE y autoradiografía. En la Fig. 9, A se ve que sólo cuando se agregó tiroglobulina desnaturalizada a las mezclas de incubación (carril 1) se detectó una banda radioactiva que corrió como el monómero de la tiroglobulina. Esto confirmó que el aumento de incorporación de radioactividad insoluble en 10% TCA observado en presencia de tiroglobulina desnaturalizada correspondió a la glucosilación de la tiroglobulina añadida.

Para analizar los oligosacáridos formados se degradó la mezcla de reacción con pronasa, se aislaron los glicopéptidos, se trataron con Endo H y los oligosacáridos liberados se cromatografiaron en papel. La adición de 8MU-Tg (Fig. 9, B ●-●) o SCAM-Tg (Fig. 9, C ●-●) aumentó la formación de  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7.9}\text{GlcNAc-Prot}$ . La radioactividad presente en los oligosacáridos correspondió al total de la radioactividad precipitada por TCA 10%. Es de destacar que en ningún caso se detectaron compuestos con 2 ni 3 restos de Glc aún cuando las incubaciones contenían 135 mM Tris-HCl (Fig. 9, A) o 135 mM Tris-HCl y 300  $\mu\text{M}$  desoxinorjirimicina, condiciones de total inhibición de las glucosidasas I y II [65] (Fig. 9, B). Esto confirma que  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7.9}\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$  no se formaron por sucesiva deglucosilación y demanosilación de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  formado y transferido a proteína durante la reacción.



**Figura 9. Caracterización de los productos de reacción**

(A) Autoradiografía de una SDS-PAGE de mezclas de reacción semejantes a las descritas en (B) y (C) en presencia (carril 1) y en ausencia (carril 2) de 8MU-Tg.

(B) y (C) Las mezclas de incubación contenían en un volumen final de 1 ml, 135 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6% Triton X-100, 6 μM [<sup>14</sup>C]UDP-Glc y 2.5 mg de proteína microsomal. En (B) la muestra graficada con ●-● contenía además 3.2 mg de 8MU-Tg. En (C) las muestras contenían 300 μM desoxinorjirimicina y la muestra graficada con ●-● contenía además 1.9 mg de SCAM-Tg. Luego de 3 min a 37 °C se detuvieron con 4 ml de metanol y los precipitados se digirieron con pronasa. Los glicopéptidos obtenidos se trataron con Endo H y los oligosacáridos liberados se corrieron en cromatografía descendente en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4). Standards: 1, Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc; 2, Glc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc; 3, Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc; 7, Man<sub>7</sub>GlcNAc; 8, Man<sub>8</sub>GlcNAc; 9, Man<sub>9</sub>GlcNAc.

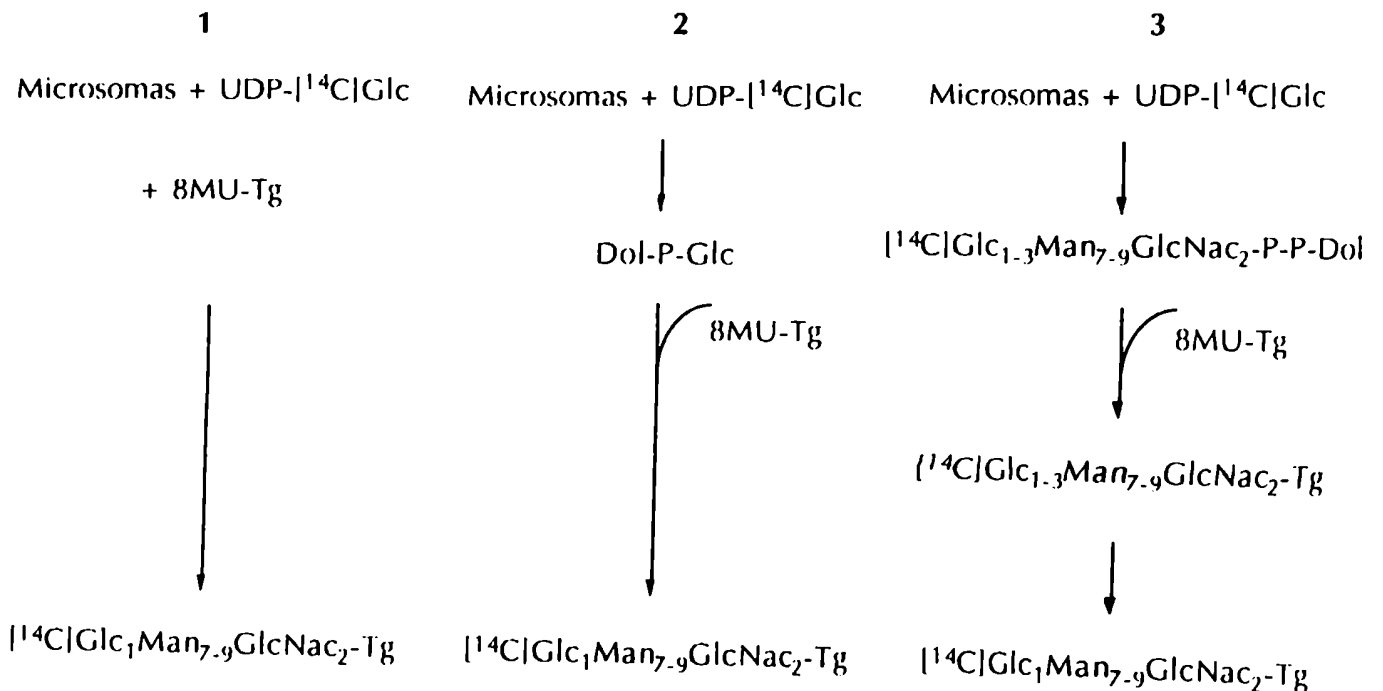
**EN LA GLUCOSILACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS NO PARTICIPAN DERIVADOS DE DOLICOL**

Los resultados hasta aquí presentados indican que en las condiciones de reacción empleadas se logra la transferencia de un resto de glucosa desde UDP-Glc a los oligosacáridos de tipo polimanoosa de la tiroglobulina desnaturalizada utilizada como sustrato aceptor. Esto correspondería a la reacción representada en 1.

Pero la formación de  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7.9}\text{GlcNAc-Tg}$ . podría ocurrir a través de un intermediario, con la formación de  $\text{Dol-P-}^{[14\text{C}]}\text{Glc}$ , el que a su vez sería el dador de  $^{[14\text{C}]}\text{Glc}$ , como se representa en 2. Esta alternativa resulta particularmente factible, ya que éste es el mecanismo de adición de los tres restos de Glc al  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  para formar  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ , por lo que sería factible que también la glucosilación de glicoproteínas ocurriera vía  $\text{Dol-P-Glc}$ . Incluso, en las condiciones empleadas se podría estar detectando una actividad espúrea de la  $\text{Dol-P-Glc:oligosacárido glucosiltransferasa}$ , la que utilizaría como aceptor al  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$  en lugar de su verdadero sustrato  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ .

Además podría estar ocurriendo una reacción más compleja aún, representada en 3, según la cual en las condiciones de reacción se formaría  $^{[14\text{C}]}\text{Glc}_{1.3}\text{Man}_{7.9}\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  y éste se transferiría a los restos de Asn libres en la tiroglobulina desnaturalizada empleada como aceptora [66, 67], seguido de un procesamiento que conduciría a la aparición de  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7.9}\text{GlcNAc}_2\text{-Tg}$ .

En los microsomas de hígado de rata utilizados contienen  $\text{Dol-P}$ ,  $\text{Dol-P-P-oligosacáridos}$  y todas las enzimas necesarias para formar los intermediarios postulados en 1, 2 y 3. Los resultados presentados a continuación indican que las reacciones 2 y 3 no ocurren en las condiciones de reacción descritas y sí ocurre el camino 1.



Se extrajeron microsomas de hígado de rata con 0.6% Triton X-100 y se tomo el sobrenadante de ultracentrifugación 60 min a 100,000 x g en el que se ensayaron tres glicosiltransferasas (Fig. 10, A).

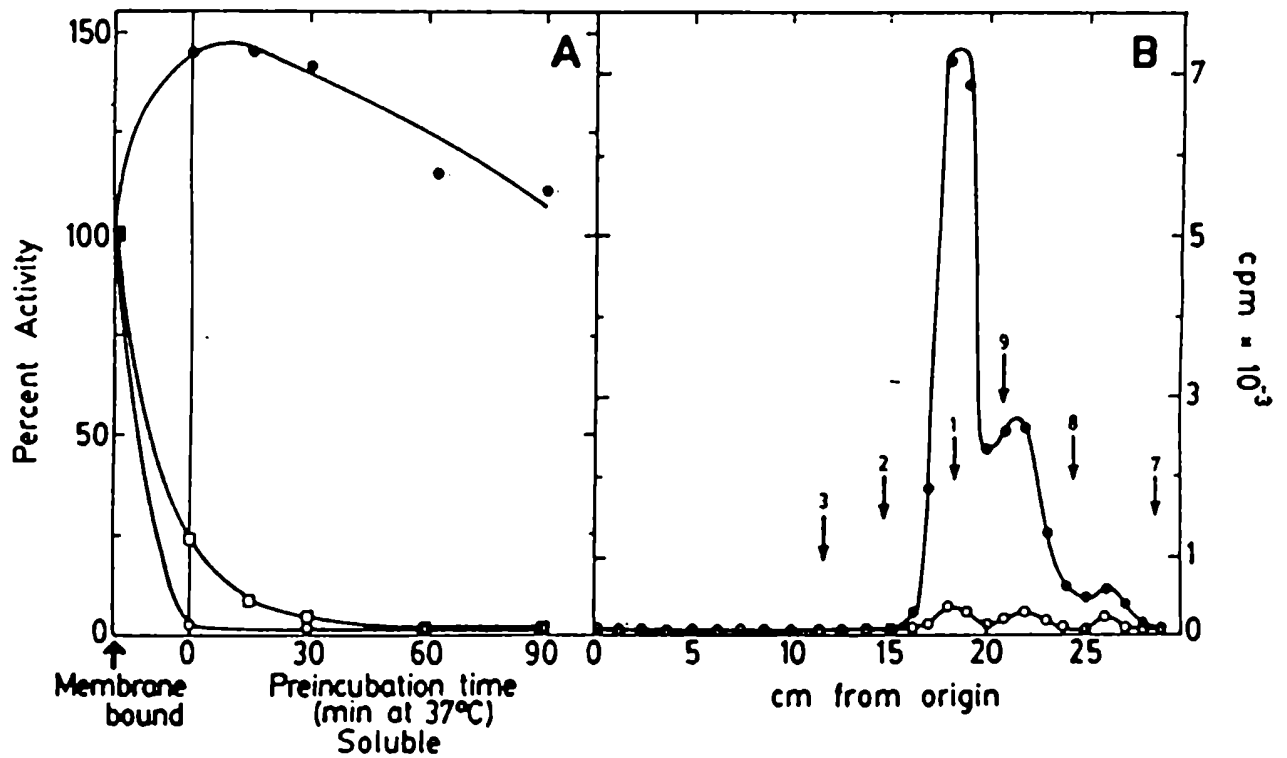
La dolicol difosfato oligosacárido:polipéptido oligosacariltransferasa (medida con [*glucosa*-<sup>14</sup>C]Glc<sub>1.3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol y Tyr-Asn-Leu-Thr-Ser-Val como sustratos) se detectó en el extracto sin centrifugar pero no en el sobrenadante (Fig. 10, A, □-□).

Por otro lado, menos del 10% de la UDP-Glc:Dol-P glicosiltransferasa (medida con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y Dol-P como sustratos) se recuperó en el sobrenadante pero se inactivó totalmente al poco tiempo de incubar ese sobrenadante a 37 °C (Fig. 10, A, ○-○).

A diferencia de estas dos actividades toda la UDP-Glc:glucoproteína glicosiltransferasa se extrajo soluble y se mantuvo activa luego de incubarla a 37 °C (Fig. 10, A, ●-●), lo que sirvió como descartar la participación de dolicol mono y difosfato derivados en la glucosilación de tiroglobulina desnaturalizada.

El experimento presentado en la Fig. 10, B demuestra que la actividad medida luego de incubar el extracto soluble con detergente 90 min a 37 °C sigue siendo la UDP-Glc:glucoproteína glicosiltransferasa.

En concordancia con estos datos la inhibición total de la síntesis de Dol-P-Glc por agregado de amfomicina (800 µg/cc) [65] no modificó la glucosilación de tiroglobulina.



**Figura 10. En la glucosilación de glicoproteínas no participan derivados de dolicol**  
 (A) La actividad glucosilante de tiroglobulina (●-●), la Dol-P-Glc sintasa (□-□) y la oligosacaryltransferasa (○-○) se midieron utilizando como fuente de enzima las membranas microsomales tratadas con Triton X-100 o el sobrenadante de su ultracentrifugación preincubado durante los tiempos indicados a 37 °C. Las condiciones del ensayo y otros detalles experimentales se describen en *MATERIALES Y METODOS*.  
 (B) El ensayo de la actividad glucosilante de tiroglobulina en el sobrenadante preincubado 90 min a 37 °C en (A) se repitió en una escala 10 veces mayor en presencia (●-●) o ausencia (○-○) de 8MU-Tg. Las reacciones se detuvieron con 3 ml de metanol y se procesaron como se describe en *MATERIALES Y METODOS*. Las glicoproteínas se trataron con pronasa, los glicopéptidos se trataron con Endo H y los oligosacáridos liberados se corrieron en cromatografía en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4). Standards: 1, Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc; 2, Glc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc; 3, Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc; 7, Man<sub>7</sub>GlcNAc; 8, Man<sub>8</sub>GlcNAc; 9, Man<sub>9</sub>GlcNAc



**INFLUENCIA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE TIPO POLIMANOSA Y LOS RESIDUOS DE ASN DE LA TIROGLOBULINA SOBRE SU CAPACIDAD DE ACTUAR COMO SUSTRATO ACEPTOR**

Más evidencias de que los oligosacáridos de tipo polimanosa presentes en la tiroglobulina son los aceptores del resto de glucosa transferido se obtuvo al ver que el pretratamiento de la tiroglobulina desnaturalizada con  $\alpha$ -manosidasa o Endo H abolió totalmente su capacidad aceptora. (Tabla II).

El pretratamiento de la tiroglobulina con ácido nitroso no alteró su capacidad aceptora (Tabla II). Aparte de otras modificaciones no identificadas (la proteína adquiere un fuerte color amarillo) en las condiciones empleadas el ácido nitroso convierte los restos de Asn en Asp y Gln en Glu sin modificar los oligosacáridos. Esto indica una vez más que la glucosilación de la tiroglobulina no ocurre por transferencia de un oligosacárido marcado con [ $^{14}\text{C}$ ]-Glc que pudiera formarse durante la incubación, desde un derivado de Dol-P-P a residuos de Asn libres en la tiroglobulina desnaturalizada. Los bajos valores de incorporación observados en la Tabla II se deben a la elevada concentración (130 mM) de Tris utilizada, que además de inhibir las glucosidasas I y II (para lo que se utilizó) resultó inhibir la actividad glucosilante de tiroglobulina.

**Tabla II.** Efecto de las modificaciones a la tiroglobulina sobre la glucosilación de proteínas.

Experimento	Adiciones a las mezclas de incubación	cpm TCA insoluble
1	—	390
	8MU-Tg tratada con Endo H (210 $\mu\text{g}$ )	410
	8MU-Tg (170 $\mu\text{g}$ )	1080
2	—	200
	8MU-Tg tratada con $\alpha$ -manosidasa (128 $\mu\text{g}$ )	210
	8MU-Tg (118 $\mu\text{g}$ )	400
3	—	220
	8MU-Tg tratada con ácido nitroso (196 $\mu\text{g}$ )	610
	8MU-Tg (190 $\mu\text{g}$ )	600

Las modificaciones de la tiroglobulina se describen en *MATERIALES Y MÉTODOS*. La glucosiltransferasa se ensayó en 100  $\mu\text{l}$  de volumen final conteniendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 3  $\mu\text{M}$  UDP- $^{14}\text{C}$ -Glc, 0.6% Triton X-100, 135 mM Tris-HCl pH 8.0, microsomas de hígado de rata como fuente de enzima (250  $\mu\text{g}$  de proteína) y las adiciones indicadas en la Tabla. Las reacciones se incubaron 3 min a 37  $^\circ\text{C}$  y se procesaron como en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA", en *MATERIALES Y MÉTODOS*.

**CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN GLUCOSA-MANOSA FORMADA**

El oligosacárido glucosilado formado en el ensayo desarrollado para la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa tiene la composición  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Este genera  $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$  por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa, el cual a su vez no es degradado por acetólisis. Esto indica que el resto de glucosa está unido a la misma manosa que en el  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  (Fig. 4, XI) intermediario en la síntesis del  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  transferido a proteínas, pero no queda establecido el tipo de unión. Para analizar el tipo de unión glucosa-manosa se estudió su hidrólisis por la glucosidasa II procesadora de oligosacáridos, específica de uniones  $\alpha(1,3)$  y el efecto inhibitorio de distintos disacáridos [46]. Para ello se preparó  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$  proveniente de tiroglobulina glucosilada en condiciones de inhibición total de las glucosidasas I y II y en las que la incorporación a glicoproteínas endógenas fue más de 10 veces menor. Se lo hidrolizó con glucosidasa II de hígado de rata parcialmente purificada, en presencia de todos los disacáridos posibles glucosil-glucosa en concentración 1 mM.

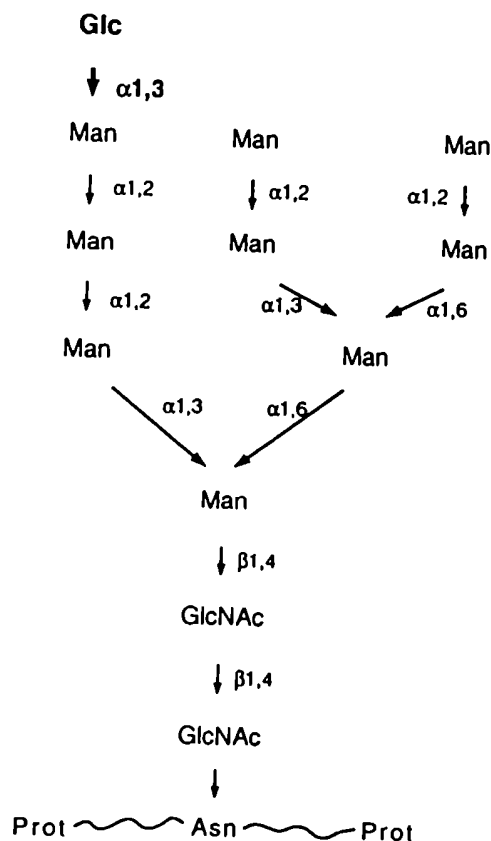
**Tabla II.** Caracterización de la unión Glc-Man en  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -tiroglobulina (producto mayoritario formado durante el ensayo de la glucosiltransferasa)

Sustrato	% inhibición (1 mM del glucosil-glucósido indicado)							
	$\alpha(1,2)$	$\alpha(1,3)$	$\alpha(1,4)$	$\alpha(1,6)$	$\beta(1,2)$	$\beta(1,3)$	$\beta(1,4)$	$\beta(1,6)$
$\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Tg}$	16	84	64	6	2	1	2	2
$\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	10	79	54	8				
$\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ de $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$	16	84	61	6				

Como puede verse en la Tabla III, la máxima inhibición se obtuvo con el disacárido en unión  $\alpha(1,3)$  (nigerosa), seguido del  $\alpha(1,4)$ ,  $\alpha(1,2)$  y  $\alpha(1,6)$  (maltosa, kojibiosa, e isomaltosa respectivamente). Ninguno de los isómeros  $\beta$  resultó inhibitorio. El mismo tipo de inhibición se obtuvo cuando se hidrolizaron con glucosidasa II

Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc y Glc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc provenientes de derivados de dolicol en los que las uniones son glucosil  $\alpha$ -(1,3). En todos los casos el producto de reacción se identificó como glucosa por cromatografía en papel y la hidrólisis fue completamente inhibida por 50  $\mu$ M desoxinorjirimicina, confirmando la especificidad de la preparación de glucosidasa II utilizada. En base a estos resultados se considera que el resto de glucosa transferido a los oligosacáridos de la tiroglobulina está unido a la misma manosa y en la misma unión  $\alpha$ -(1,3) que en el oligosacárido transferido a partir de Dol-P-P.

Este resultado indicaría que la glucosidasa II que *in vivo* deglucosila los oligosacáridos transferidos desde Dol-P-P sería la misma que hidroliza el resto de Glc transferido a los oligosacáridos unidos a las glicoproteínas.



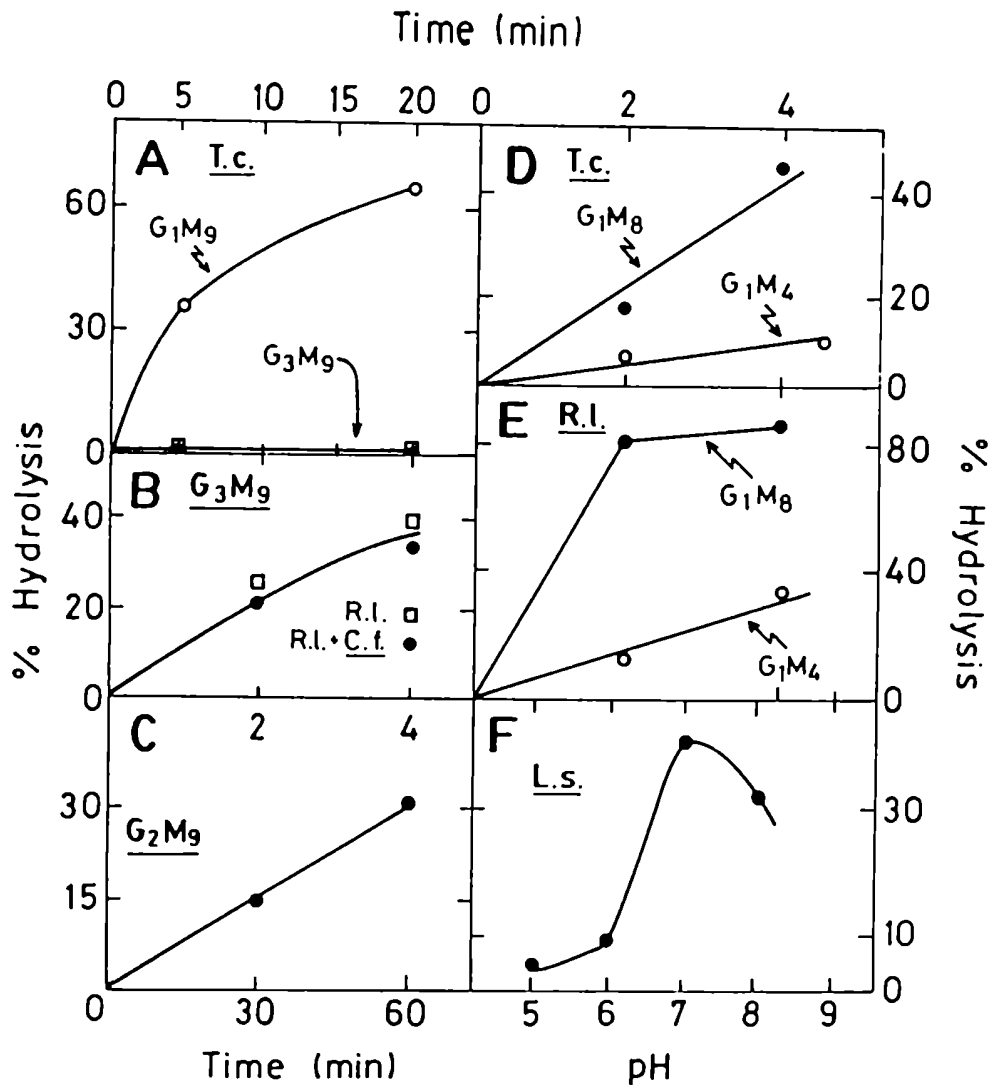
**Figura 11. Estructura propuesta para el producto formado por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa**

**LOS TRIPANOSOMÁTIDOS TIENEN GLUCOSIDASA II PERO NO GLUCOSIDASA I**

Como se describiera en la Introducción, los tripanosomátidos no sintetizan Dol-P-Glc por lo que sintetizan Dol-P-P-oligosacáridos no glucosilados y los transfieren a proteínas. No obstante, fue en estos microorganismos donde se detectó por primera vez la glucosilación de oligosacáridos unidos a proteínas. Los restos de Glc no forman parte de las glicoproteínas maduras y los resultados presentados en el apartado anterior sugieren que la glucosidasa II es la enzima que los hidroliza *in vivo*. En los experimentos presentados a continuación se estudió la presencia de las glucosidasas I y II en tripanosomátidos.

Incubando [*glucosa*-<sup>14</sup>C]-Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc con membranas microsomales de *T. cruzi*, *C. fasciculata*, y *L. samueli* se detectó la hidrólisis del resto de glucosa (Figura 12, A-C). Sólo se encontró Glc como producto de reacción, no encontrándose manosa, di ni trisacáridos, lo que descartaría la presencia de una endoglicosidasa [68].

Utilizando [<sup>14</sup>C]Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc uniformemente marcado (Fig. 13, C) se detectó sólo la liberación de Glc lo que indicaría que Man<sub>9</sub>GlcNAc es el otro producto de la reacción. También se detectó en los tres protozoos una actividad de glucosidasa capaz de degradar [*glucosa*-<sup>14</sup>C]-Glc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc (Fig. 12, C) y que generó únicamente Glc como producto (Fig. 13, D).



**Figura 12. Actividad de glucosidasa II en tripanosomátidos**

(A) Se incubaron microsomas de *T. cruzi* con [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_1$ Man $_9$ GlcNac ( $G_1M_9$ ) o [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_3$ Man $_9$ GlcNac ( $G_3M_9$ ). (B)  $G_3M_9$  se incubó con microsomas de hígado de rata (R.I.) o con lo mismo más microsomas de *Crithidia fasciculata* (C.f.). (C) Se incubaron microsomas de *T. cruzi* con [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_2$ Man $_9$ GlcNac ( $G_2M_9$ ). (D y E) [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_1$ Man $_8$ GlcNac ( $G_1M_8$ ) y [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_1$ Man $_4$ GlcNac ( $G_1M_4$ ) de igual radioactividad específica se incubaron con microsomas de *T. c.* o de hígado de rata (R.I.). (F)  $G_1M_9$  se incubó con microsomas de *L. samueli* (L.s.); los pH 5 y 6 se regularon con buffer citrato de sodio y los pH 6 a 8 se regularon con buffer fosfato. En todos los casos se utilizaron 600-1,000 cpm de los diferentes sustratos.

Resuspendiendo las membranas microsomales de los tres protozoos en 10 volúmenes de buffer fosfato 10 mM pH 7.2 se recuperó un 20% de la actividad de glucosidasa en el sobrenadante luego de ultracentrifugarlas 60 min a 100.000 x g y el resto de la actividad se mantuvo en el precipitado, ensayada tanto con [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_2$ Man $_9$ GlcNac como con [glucosa- $^{14}C$ ]Glc $_1$ Man $_9$ GlcNac. Agregando 0.3% Triton X-100 a la extracción, toda la actividad se obtuvo en forma soluble.

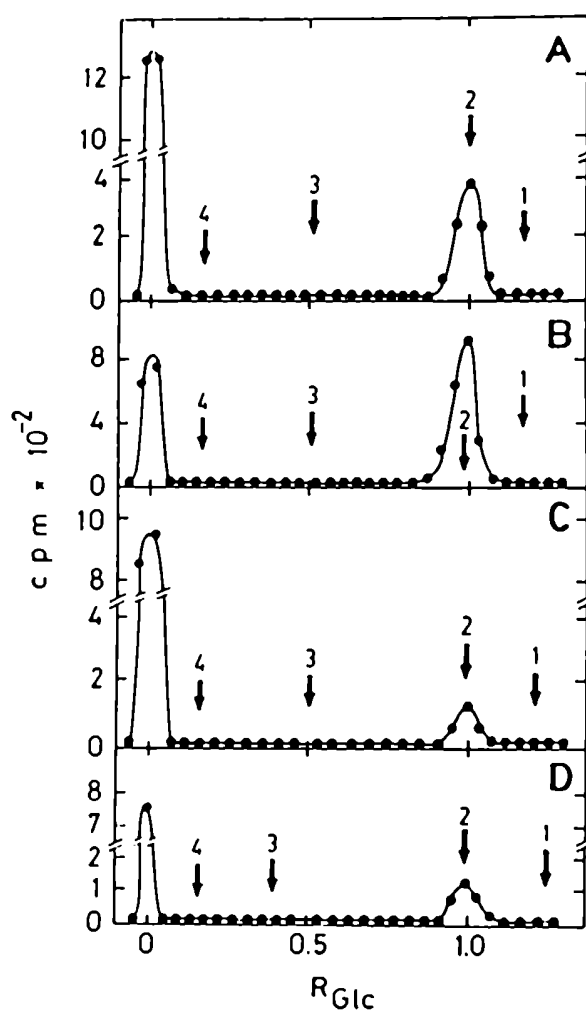
La actividad de glucosidasa ensayada con p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, [ $^{14}C$ ]Glc $_1$ Man $_9$ GlcNac y [ $^{14}C$ ]Glc $_2$ Man $_9$ GlcNac mostró un pH óptimo neutro, la remoción de residuos de manosa disminuyó la afinidad por los sustratos (Fig. 12, D) y se inhibió totalmente en presencia de 50  $\mu$ M desoxinorjirimicina.

Por sus propiedades de solubilidad, pH óptimo y especificidad de sustrato [61-63] esta actividad de glucosidasa detectada en tripanosomátidos se comportó como la glucosidasa II de otros eucariontes.

En los microsomas de los tres tripanosomátidos estudiados no se detectó actividad de glucosidasa I utilizando [*glucosa*-<sup>14</sup>C]-Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc como sustrato y tampoco en sus sobrenadantes de 100.000 x g (Fig. 12, A). Incubando [*glucosa*-<sup>14</sup>C]-Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc con microsomas de hígado de rata en presencia o ausencia de microsomas de los tripanosomátidos mencionados se logró medir actividad de glucosidasa I por liberación de Glc con lo que se verificó que ni el sustrato ni los microsomas de los tripanosomátidos poseían inhibidores de la glucosidasa I no detectada. (Fig. 12, B). Todos los experimentos mostrados en Fig. 12 se realizaron con microsomas de *T. cruzi*, *C. fasciculata*, y *L. samueli* obteniéndose resultados similares en los tres casos.

Estos resultados indicarían que los tripanosomátidos estudiados no poseen una actividad equivalente a la glucosidasa I lo que estaría de acuerdo con que no poseen oligosacáridos con tres restos de Glc que son los sustratos de esta enzima.

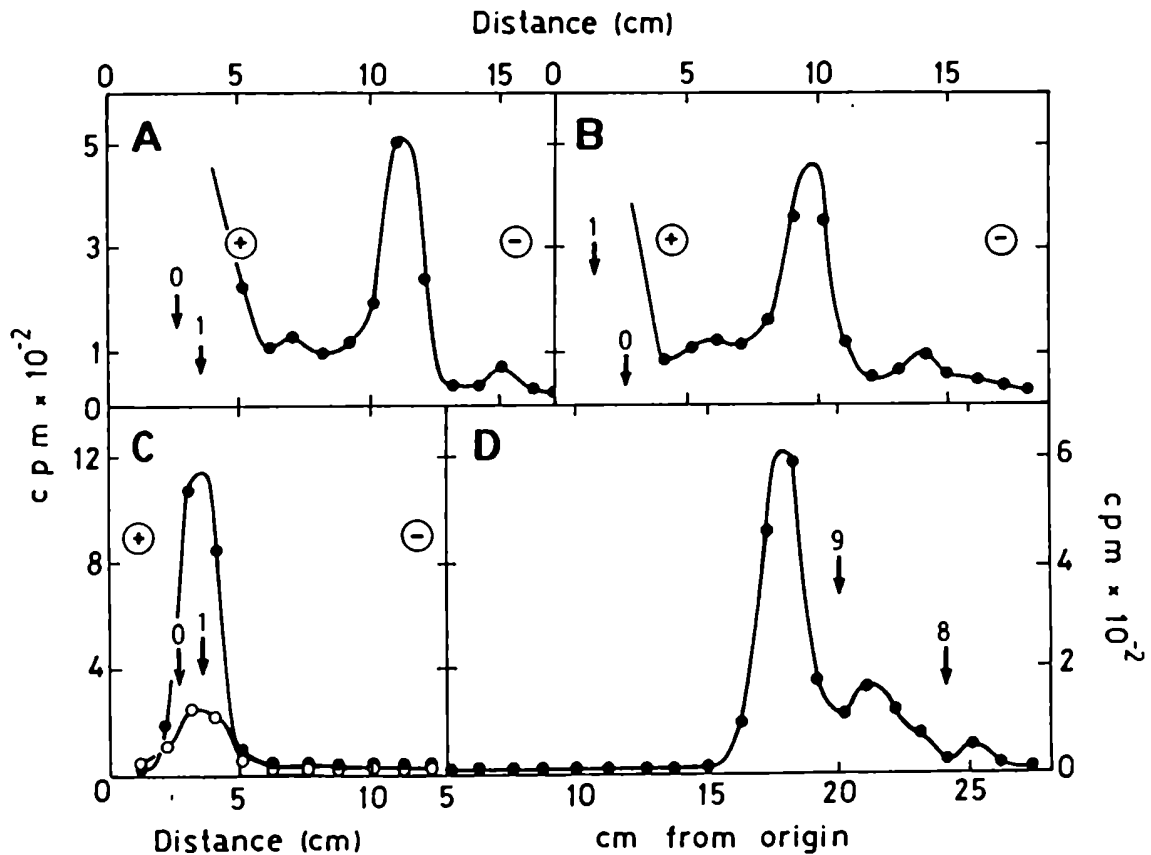
Pero si bien las evidencias presentadas no son suficientes para probarlo, probablemente la glucosidasa detectada en tripanosomátidos corresponda a la glucosidasa II que es capaz de hidrolizar oligosacáridos mono y diglucosilados. Estos microorganismos no poseen compuestos diglucosilados, uno de los dos sustratos de la glucosidasa II. Pero sí tienen oligosacáridos monoglucosilados formados por glucosilación de oligosacáridos unidos a las glicoproteínas, lo que refuerza el concepto de que la glucosidasa II es la enzima que hidroliza *in vivo* los restos de Glc transferidos por este mecanismo.



**Figura 13. Producto liberado por la glucosidasa de tripanosomátidos**  
 $[glucosa-^{14}C]Glc_1Man_9GlcNAc$  (A y B),  $[^{14}C]Glc_1Man_9GlcNAc$  (C) y  $[glucosa-^{14}C]Glc_2Man_9GlcNAc$  (D) se incubaron con microsomas de *T. cruzi* durante 3 min (A y C), 15 min (B) o 40 min (D). Luego de detener las reacciones con metanol los sobrenadantes se corrieron en electroforesis en papel en buffer acetato de piridina 0.1 M, pH 6.5 durante 30 min a 30 V/cm. Los compuestos marcados se eluyeron y se corrieron en cromatografía descendente en papel en butanol/piridina/agua (6:4:3). Standards: 1, Man; 2, Glc; 3, Man<sub>2</sub>; 4, Man<sub>3</sub>.

**GLUCOSILACIÓN DE GLICOPÉPTIDOS**

Se obtuvieron glicopéptidos de tipo polimanosa por proteólisis exhaustiva de la tiroglobulina y posterior cromatografía de afinidad en Concanavalina A-Sepharose. Cuando se los incubó con membranas de hígado de rata, UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc y 1-desoxinorjirimicina, se formaron compuestos marcados que corrieron como cationes en electroforesis en papel en medio ácido (Fig. 14, A). Estos compuestos no se formaron cuando no se agregaron glicopéptidos a la mezcla de reacción.

**Figura 14. Glucosilación de glicopéptidos**

(A y B). Las mezclas de incubación contenían en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ , 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.3% Triton X-100, 7.5  $\mu\text{M}$  UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, 250  $\mu\text{g}$  proteína microsomal, 300  $\mu\text{M}$  desoxinorjirimicina y una cantidad de glicopéptidos equivalente a 18  $\mu\text{g}$  de manosa. En (B) la mezcla contenía también 40  $\mu\text{g}$  de amphotomicina. Luego de 30 min a 37  $^\circ\text{C}$  las reacciones se detuvieron con 0.4 ml de metanol. Se conservaron los sobrenadantes y los precipitados se lavaron con 0.5 ml de metanol/agua (1:1). Se combinaron los sobrenadantes y se corrieron en electroforesis en papel en ácido fórmico 10%. (C) Los compuestos marcados cargados positivamente se eluyeron, se trataron con Endo H y se corrieron nuevamente en electroforesis en papel en ácido fórmico 10%. (D) El pico neutro en (C) se eluyó y se corrió en cromatografía en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4). Standards: 9, Man<sub>9</sub>GlcNAc; 8, Man<sub>8</sub>GlcNAc; 1, glucosa; 0, origen de siembra.



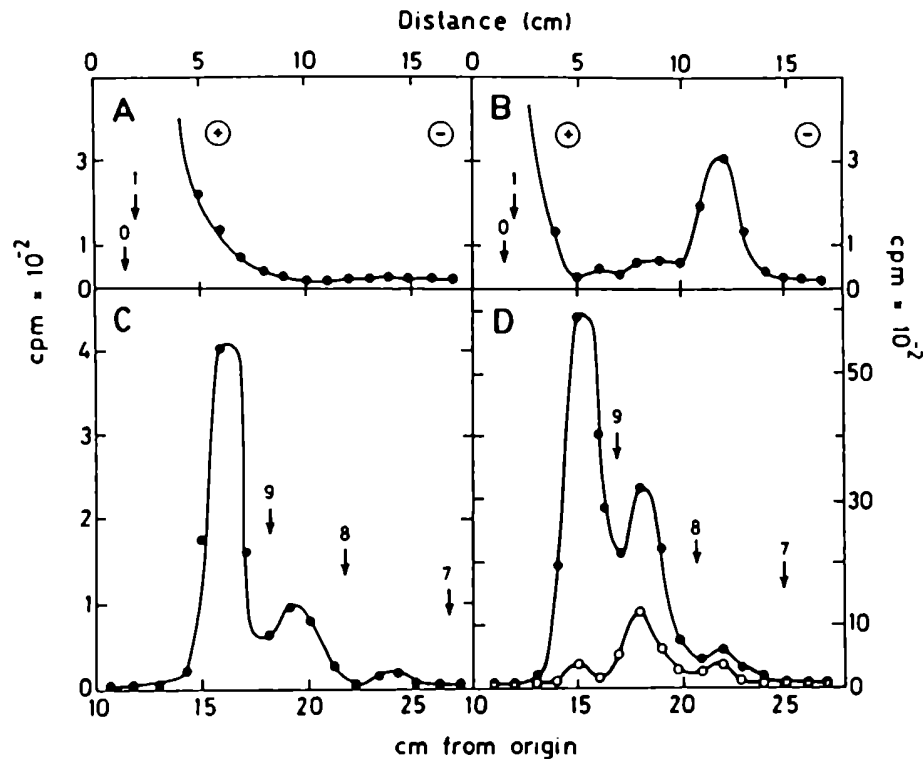
El mismo patrón que en la Fig. 14, A se obtuvo cuando la reacción se hizo en presencia de amphomicina (Fig. 14, B) indicando una vez más que la marcación de los compuestos cargados positivamente es independiente de la formación de Dol-P-Glc (los picos neutros en la Fig. 14 A y B provienen de la descomposición del sustrato). Por tratamiento con Endo H de los compuestos cargados se liberan compuestos neutros marcados (C), que corren en cromatografía en papel como  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}$  (D). Comparando la glucosilación de la misma cantidad de oligosacáridos presentes como glicopéptidos (1-6  $\mu\text{g}$  de manosa) o en tiroglobulina desnaturalizada, la glucosilación de glicopéptidos fue unas cien veces menor que la glucosilación de la glicoproteína.

Considerando que al emplear glicopéptidos aislados se eliminan por completo los problemas de accesibilidad al oligosacárido, estos resultados sugieren que la glucosiltransferasa necesitaría reconocer algún factor en la estructura proteica además del oligosacárido. Esto coincide con la necesidad de desnaturalizar las glicoproteínas para que puedan actuar como sustratos aún cuando éstas tengan los oligosacáridos expuestos en condiciones nativas. La gran variedad de glicoproteínas reconocidas como sustrato por la glucosiltransferasa hace poco probable que la enzima estuviera reconociendo una secuencia de amino ácidos específica.

### GLUCOSILACIÓN DE TIROGLOBULINA POR MICROSOMAS DE POROTO Y DE MUCOR ROUXII

Incubando microsomas de poroto con UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc y 1-desoxinorjirimicina no se encontraron glicopéptidos marcados (Fig. 15, A). Pero sí se detectaron glicopéptidos marcados cuando se en la reacción se incluyó 8MU-Tg (Fig. 15, B). El pico neutro en las Fig. 15 A y B no se caracterizó pero probablemente corresponda a glucanos. Todo el material marcado cargado positivamente se comportó como neutro por tratamiento con Endo H y corrió en cromatografía en papel como  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{-}_9\text{GlcNAc}$  (Fig. 15, C).

Incubando microsomas de *Mucor rouxii* con UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc y 1-desoxinorjirimicina se formaron  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{-}_9\text{GlcNAc}$ . La adición de 8MU-Tg a las mezclas de reacción aumentó notablemente la formación de estos compuestos (Fig. 15, D). En ausencia de tiroglobulina predominó  $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}$  mientras que en presencia de tiroglobulina predominó  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ , lo que indica que la estimulación se debió a la glucosilación de los oligosacáridos de la tiroglobulina agregada como sustrato aceptor.

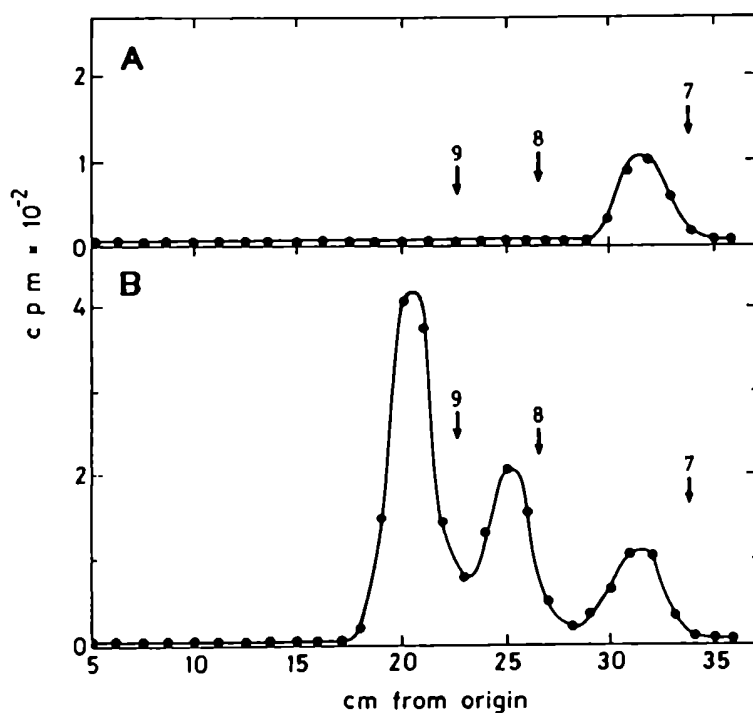


**Figura 15. Glucosilación de tiroglobulina por microsomas de poroto y de *Mucor rouxii*** (A y B) Las mezclas de incubación contenían en 1 ml, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.6% Triton X-100, 10  $\mu\text{M}$  UDP[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, 300  $\mu\text{M}$  desoxinorjirimicina, 0.8 mg de proteína microsomal de porotos y en (B) 3 mg de 8MU-Tg. Luego de 5 min a 30 °C con 4 ml de metanol, se aislaron los oligosacáridos como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA". (C) Perfil de oligosacáridos aislados en (B) cromatografiados en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4). (D) Perfil de oligosacáridos obtenidos y procesados como en (A-C) pero utilizando microsomas de *Mucor rouxii* en presencia (●-●) o ausencia (○-○) de 8MU-Tg. Standards: 9,  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ ; 8,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ ; 7,  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ; 1, glucosa; 0 origen de siembra.

**GLUCOSILACIÓN DE TIROGLOBULINA POR MICROSOMAS DE CRITHIDIA FASCICULATA Y TRYPANOSOMA CRUZI.**

Incubando membranas de *Crithidia fasciculata* con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc se formó Glc<sub>1</sub>Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> unido a proteína (Fig. 16, A), compuesto que ya había sido detectado en células de este parásito incubadas con [<sup>14</sup>C]glucosa [5]. Cuando en la mezcla de incubación se agregó tiroglobulina desnaturalizada se formaron también Glc<sub>1</sub>Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> y Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> unidos a proteína (Fig. 16, B).

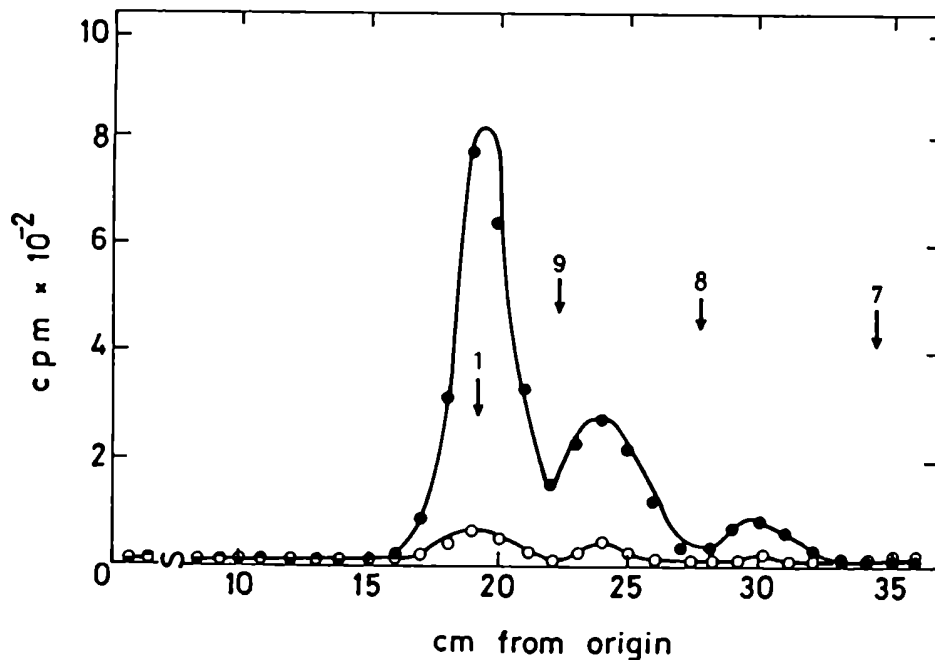
*C. fasciculata* no sintetiza Dol-P-Glc [5, 24]. Además no es capaz de añadir el octavo y noveno residuo de manosa en el oligosacárido unido a Dol-P-P, transfiriendo a proteína Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> [5, 24, 69]. De modo que la formación de Glc<sub>1</sub>Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> y Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> unidos a proteína en este ensayo utilizando microsomas de *C. fasciculata* demuestra nuevamente la glucosilación de oligosacáridos de tipo polimansosa de tiroglobulina sin intervención de Dol-P-Glc.



**Figura 16. Glucosilación de tiroglobulina por microsomas de *Crithidia fasciculata***

(A y B) Las mezclas de incubación contenían en un volumen final de 2 ml, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6% Triton X-100, 3 μM UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, 100 μM desoxinorjirimicina, 11 mg de proteína microsomal de *C. fasciculata*. En (B) la mezcla también contenía 6 mg de tiroglobulina desnaturalizada. Las reacciones se detuvieron luego de 20 min a 30 °C con 6 ml de metanol y se procesaron como en MATERIALES Y METODOS. Los oligosacáridos obtenidos se cromatografiaron en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4). Standards: 9, Man<sub>9</sub>GlcNAc; 8, Man<sub>8</sub>GlcNAc; 7, Man<sub>7</sub>GlcNAc.

Cuando se incubaron microsomas de *Trypanosoma cruzi* con UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc se formaron  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAC}_2$  unidos a proteína (Fig. 17, ○-○). Cabe recordar que *T. cruzi* transfiere  $\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2$  a proteínas. El agregado de tiroglobulina desnaturada a las mezclas de reacción aumentó la formación de dichos compuestos (Fig. 17, ●-●). *T. cruzi* tampoco sintetiza Dol-P-glucosa [70] con lo que queda demostrada una vez más la transferencia de un resto de glucosa a oligosacáridos de tipo polimanoso en la tiroglobulina sin intervención de derivados de dolicol.



**Figura 17. Glucosilación de tiroglobulina por microsomas de *Trypanosoma cruzi***

Las mezclas de incubación contenían en un volumen final de 2 ml, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.6% Triton X-100, 4  $\mu\text{M}$  UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, 200  $\mu\text{M}$  desoxinorjirimicina, 8 mg de proteína microsomal de *T. cruzi*. En los datos representados con ●-● la mezcla también contenía 8 mg de tiroglobulina desnaturada. Las reacciones se detuvieron luego de 15 min a 30 °C con 6 ml de metanol y se procesaron como en MATERIALES Y METODOS. Los oligosacáridos obtenidos se corrieron en cromatografía en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4). Standards: 1,  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAC}$ ; 9,  $\text{Man}_9\text{GlcNAC}$ ; 8,  $\text{Man}_8\text{GlcNAC}$ ; 7,  $\text{Man}_7\text{GlcNAC}$ .

**TOPOGRAFIA**

A continuación se presentan estudios mediante métodos bioquímicos sobre la localización subcelular de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa.

Todos los experimentos descritos en esta sección se realizaron con vesículas microsomales intactas. "Intactas" significa que se trata de vesículas microsomales cerradas y en la orientación correcta, es decir, con la cara citoplasmática hacia afuera y conservando el contenido del retículo endoplásmico en su interior (preparados y controlados como se describe en *MATERIALES Y METODOS*). Estas vesículas se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas y no se almacenaron. En todos los casos se hará referencia a vesículas microsomales de hígado de rata.

**DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR**

Por fraccionamiento subcelular con gradientes de sacarosa la actividad de UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa se localizó en el retículo endoplásmico

**Tabla IV.** Distribución subcelular de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata

Membranas	8MU-Tg	cpm
RE rugoso	-	1150
	+	13950
RE liso	-	1650
	+	18500
Golgi	-	50
	+	2050

La glucosiltransferasa se ensayó en 100  $\mu$ l de volumen final conteniendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 13  $\mu$ M UDP- $^{14}\text{C}$ Glc (285 Ci/mol), 0.6% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100-120  $\mu$ g de proteína de las distintas fracciones subcelulares como fuente de enzima y donde se indica, 700  $\mu$ g de 8MU-Tg. Las reacciones se incubaron 5 min a 37  $^\circ\text{C}$  y se procesaron como en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA", en *MATERIALES Y MÉTODOS*.

**GLUCOSILACIÓN DE UN ACEPTOR EXÓGENO**

Se incubaron vesículas microsomales intactas con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, CaCl<sub>2</sub>, detergente y tiroglobulina desnaturalizada según se indica en la Tabla V. La glucosilación de la tiroglobulina se determinó en forma específica utilizando un anticuerpo de conejo anti tiroglobulina para inmunoprecipitar la tiroglobulina al final de la reacción. Las reacciones se detuvieron llevandolas a 0.5% Triton X-100, 200 mM Tris-HCl pH 8.0 (para inhibir la glucosidasa II) y 25 mM EDTA (para detener la actividad de glucosiltransferasa) y en estas condiciones se procedió a inmunoprecipitar la tiroglobulina de la mezcla de reacción como se describe en *MATERIALES Y METODOS*. La especificidad de la inmunoprecipitación se muestra en la Tabla VI. Como puede verse en la Tabla V sólo hubo glucosilación de tiroglobulina cuando se emplearon vesículas microsomales permeabilizadas, ya sea con detergente en el medio de reacción o por previa sonicación de las mismas. Teniendo en cuenta que la tiroglobulina es una macromolécula (660 kDa) incapaz de penetrar en las vesículas cerradas empleadas, la necesidad de permeabilizarlas para que pueda glucosilarse el aceptor exógeno indica que la actividad de glucosiltransferasa se encuentra en el interior de las vesículas utilizadas.

**Tabla V.** Glucosilación de un aceptor exógeno (8MU-Tg)

Sonicado <sup>a</sup>	Condiciones de incubación		cpm inmunopdo
	Detergente	8MU-Tg	
-	-	-	150
-	-	+	711
	+	-	95
	+	+	4981
+		-	153
+		+	3796
+	+	-	109
+	+	+	4343

<sup>a</sup>: los microsomas se sonicaron antes de hacer las reacciones.  
Otras condiciones experimentales se describen en *MATERIALES Y MÉTODOS*.

**Tabla VI.** Especificidad de la inmunoprecipitación de la Tiroglobulina

Condiciones de reacción	Condiciones de Inmunoprecipitación					
	8MU-Tg	Suero Anti-Tg	Suero Preimmune	8MU-Tg	BSA	cpm inmunopdo
-	+	-	-	-	-	71
+	+	-	-	-	-	1318
+	-	+	-	-	-	75
+	+	-	+	-	-	320
+	+	-	-	+	-	1132

Un resultado equivalente se obtiene contando el material TCA insoluble formado. Puede verse en la Tabla VII que la diferencia entre la cantidad de producto glucosilado formado en presencia de tiroglobulina desnaturalizada menos la cantidad de producto glucosilado endógeno (sin tiroglobulina) coincide con la glucosilación de la tiroglobulina determinada por inmunoprecipitación (Tabla V). Esto demuestra claramente que tal como se demostrara más arriba, la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]Glc observada corresponde a la glucosilación de la tiroglobulina desnaturalizada agregada como aceptor.

**Tabla VII.** Glucosilación de un aceptor exógeno (8MU-Tg)

Sonicado <sup>a</sup>	Condiciones de incubación			cpm TCA insoluble
	Detergente	8MU-Tg		
-	-	-	-	2871
-	-	+	-	3359
	+	-	-	859
	+	+	-	5136
+	-	-	-	1120
+	-	+	-	4392
+	+	-	-	990
+	+	+	-	4424

<sup>a</sup>: los microsomas se sonicaron antes de hacer las reacciones

**PROTEOLISIS DE LAS VESÍCULAS**

Se trataron vesículas microsomales intactas con tripsina en presencia o ausencia de detergentes y luego se ensayaron dos actividades enzimáticas: la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa y UDP-Glc:Dol-P glucosiltransferasa. Como se muestra en la Tabla VIII, la glucosilación de glicoproteínas sólo se inactivó por proteólisis de vesículas permeabilizadas. La Dol-P-Glc sintasa se inactivó tanto por proteólisis de vesículas permeabilizadas como de vesículas intactas, resultado que concuerda con trabajos previos [71-73]. Esto demuestra que ambas actividades tienen una orientación distinta en la vesículas empleadas: la glucosilación de proteínas estaría en el lumen y por lo tanto protegida de la proteólisis en las vesículas cerradas pero no en las vesículas permeabilizadas. La Dol-P-Glc sintasa estaría expuesta en la cara externa, y por lo tanto sensible a proteólisis tanto en vesículas intactas como permeabilizadas.

Esta distinta orientación de las dos glucosiltransferasas demuestra nuevamente que la formación de Dol-P-Glc no es necesaria para la glucosilación de oligosacáridos unidos a glicoproteínas, ya que en vesículas intactas proteolizadas en las que casi no hay actividad de Dol-P-Glc sintasa aún permanece intacta la actividad glucosilante de glicoproteínas.

**TABLA VIII.** Tratamiento con tripsina

Preincubación con tripsina		Glucosilación de glicoproteínas		Glucosilación de dolicol-P
Detergente	Tripsina	8MU-Tg	cpm TCA insoluble	cpm CCl <sub>3</sub> H:CH <sub>3</sub> OH
-	+	-	340	
-	+	+	1648	1709
+	+	-	53	
+	+	+	281	351
+	-	-	205	
+	-	+	1848	14629

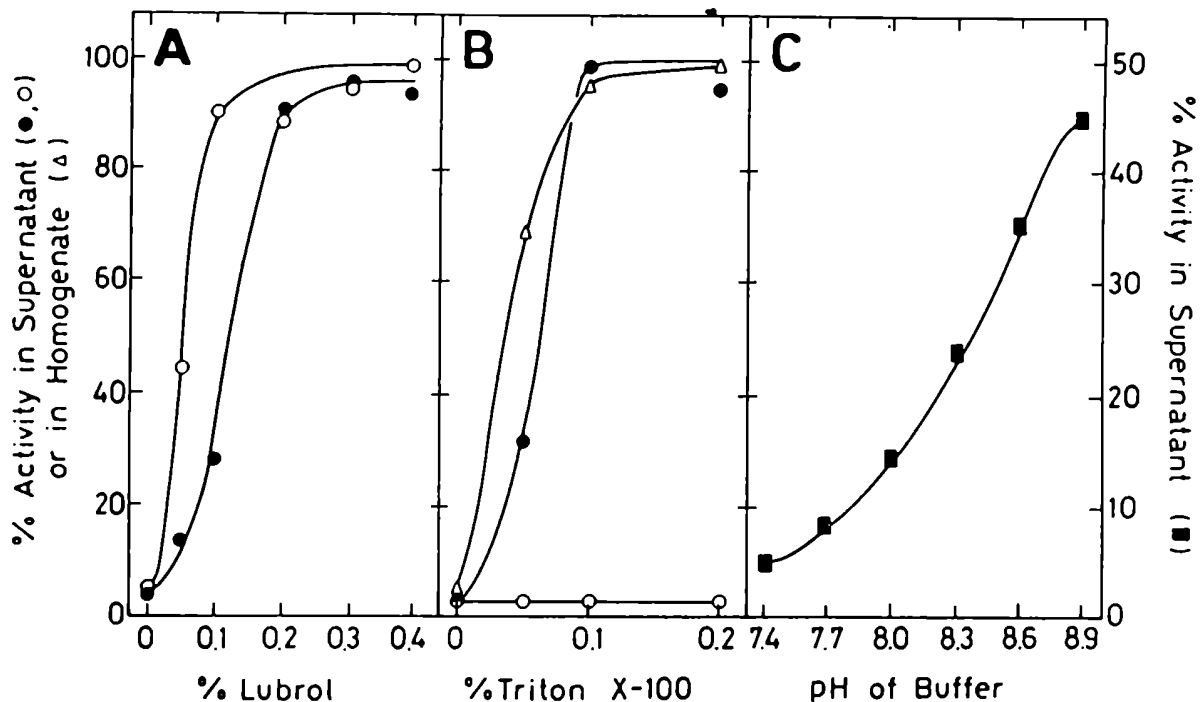
Las condiciones experimentales se describen en *MATERIALES Y MÉTODOS*.



**SOLUBILIZACIÓN DE LA UDP-GLC:GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASA**

Teniendo en cuenta la latencia a un aceptor exógeno y la resistencia a proteólisis en vesículas microsomales intactas encontrada en los 2 apartados anteriores, la glucosiltransferasa estaría orientada hacia el lumen del RE. Con los siguientes experimentos se intentó determinar si se trata de una proteína soluble residente en el interior del RE o de una proteína de membrana.

La actividad se obtuvo soluble extrayendo vesículas microsomales intactas con bajas concentraciones detergentes en medio isotónico. En la Fig. 18, A se muestra la extracción de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa con Lubrol. Resultados similares se obtuvieron con Triton X-100 (Fig. 18, B).



**Figura 18. Solubilización de la actividad glucosilante de glicoproteínas**

(A) Las distintas muestras conteniendo vesículas microsomales intactas (10 mg/cc), sacarosa 0.25 M, 5 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, pH 7.2, se llevaron a las concentraciones de Lubrol indicadas y luego de 5 minutos a 0 °C se centrifugaron 60 minutos a 100,000 x g. En ○-○ contenían además 20 mM TrisHCl pH 8.9. La actividad se ensayó en 10 μl de los sobrenadantes de la ultracentrifugación como en la tabla VIII. El 100% corresponde a 10 μl de las mezclas sin ultracentrifugar (7073 cpm).

(B) Como en (A) pero a una concentración de proteínas de 2 mg/ml y utilizando Triton X-100 en lugar de Lubrol. La glucosiltransferasa (●-●) y la glucosa-6-fosfatasa (○-○) se ensayaron en el sobrenadante de las ultracentrifugaciones. La glucosa-6-fosfatasa también se ensayó en las mezclas sin centrifugar (Δ-Δ). En ambos casos se utilizó manosa-6-P como sustrato.

(C) Se diluyeron vesículas microsomales intactas con buffer Tris-HCl de diferente pH dando soluciones finales conteniendo 2.5 mg/ml de proteína microsomal, 30 mM sacarosa, 20 mM Tris-HCl a los pH indicado. Luego de 10 minutos a 0 °C se ultracentrifugaron 60 minutos a 100.000 x g y la glucosiltransferasa se ensayó en 10 μl del sobrenadante como en ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA pero conteniendo 0.1M HEPES pH 7.4 en las mezclas de reacción. El 100% corresponde a 10 μl de la muestra diluida con Tris-HCl de pH 7.4 sin ultracentrifugar.

Haciendo la extracción a pH 7.2 y a una concentración de proteína de 10 mg/cc, la glucosiltransferasa se recuperó totalmente en el sobrenadante de 100,000 x g con una concentración de detergente de 0.2% y disminuyendo la concentración de proteína a 2 mg/ml bastó una concentración de detergente de 0.1% (Fig. 18, B ●-●). En estas condiciones se sabe que se libera el contenido soluble del retículo endoplásmico sin desensamblar las membranas [74].

La preservación de la integridad de las membranas durante la extracción fue confirmada al encontrar que la glucosa-6-fosfatasa, enzima integral de membrana [43, 44], no se extrajo soluble en las condiciones empleadas (Fig. 18, B ○-○). Ensayando la actividad de glucosa-6-fosfatasa en las vesículas sin ultracentrifugar utilizando el sustrato impermeable manosa 6-P se encontró la actividad máxima con una concentración de detergente de 0.1% (Fig. 18, B △-△). Esta concentración indica la cantidad de detergente necesaria para permitir el libre acceso de la Man-6-P al interior del RE. La misma concentración resultó suficiente para solubilizar a la glucosiltransferasa, la que en todos estos estudios se comportó como una proteína soluble del interior del retículo endoplásmico y no como una proteína de membrana [75].

**Tabla IX.** Solubilización de la glucosiltransferasa de hígado de rata

Tratamiento de las vesículas	Fuente de Enzima		cpm TCA insoluble
	Homogenato	Sobrenadante	
<i>Experimento 1</i>			
	+	-	1260
----	-	+	76
Sonicado		+	1213
French press		+	1441
<i>Experimento 2</i>			
Triton X-114	+	-	1219
	-	+	1036

Las condiciones experimentales se describen en *MATERIALES Y MÉTODOS*.

La concentración de detergente óptima para solubilizar la glucosiltransferasa dependió del pH. A pH 8.9 (Fig. 18, A ○-○) se requirió menos detergente que a pH 7.2 (Fig. 18, A ●-●). Se sabe que en medios ligeramente alcalinos se favorece la solubilización de proteínas solubles o periféricas, de modo que el pH alcalino podría actuar sinérgicamente con los detergentes en la extracción de la glucosiltransferasa. Esto

se confirmó al lograr extraer 50% de la glucosiltransferasa en ausencia de detergentes a pH 8.9 en medio hipotónico (Fig. 18, C).

Suspendiendo las vesículas intactas a una concentración de proteína de 0.8 mg/ml en una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M pH 11 se extrajo toda la glucosiltransferasa. También en este aspecto la glucosiltransferasa se comportó como una proteína soluble del interior del RE [76]. El mismo grado de extracción se logra cuando las vesículas se expusieron al pH alcalino (Tris-HCl o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sólo unos minutos a 0 °C que cuando se las dejó al mismo pH durante 30 minutos a 37 °C. Esto probablemente indique que la extracción no se debió a algún mecanismo de liberación o de proteólisis de la glucosiltransferasa o de algún componente de la membrana como ocurre con otras proteínas [77-82].

La glucosiltransferasa también se extrajo soluble de vesículas intactas en ausencia de detergentes, a pH neutro y en medio isotónico, empleando métodos mecánicos para liberar el contenido del RE como puede verse en la Tabla IX, con lo que se confirma que no se trata de una proteína de membrana sino de una proteína soluble.

También en la Tabla IX se muestra que por partición en Triton X-114 [83] la glucosiltransferasa se comportó como una proteína soluble y no como una proteína hidrofóbica de membrana [84].

**SE GLUCOSILAN GLICOPROTEÍNAS SOLUBLES Y DE MEMBRANA**

Para determinar si la glucosilación estaba restringida a glicoproteínas solubles o de membrana se incubaron vesículas microsomales intactas con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y CaCl<sub>2</sub> durante 5 minutos a 37 °C. Luego se liberó el contenido soluble del RE con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o por sonicación [76]. Se cuantificaron las glicoproteínas extraídas solubles y las insolubles luego de ultracentrifugación a 100,000 x g 60 min. Como se muestra en la Tabla X, se encontraron glicoproteínas marcadas tanto en el material soluble como en el precipitado. La misma proporción de marca en el soluble y en el precipitado se encontró si luego de los 5 minutos de reacción a 37 °C se agregó un exceso de 100,000 veces de UDP-Glc no radioactivo y desoxinorjirimicina (para detener la incorporación de marca y una eventual deglucosilación respectivamente) y se incubó otros 15 minutos a 37 °C. Esto indicaría que el material soluble marcado no provino de una eventual proteólisis de material insoluble. De este modo puede concluirse que tanto glicoproteínas solubles como de membrana se glucosilan en las condiciones utilizadas.

**Tabla X.** Caracterización de los productos de glucosilación endógena

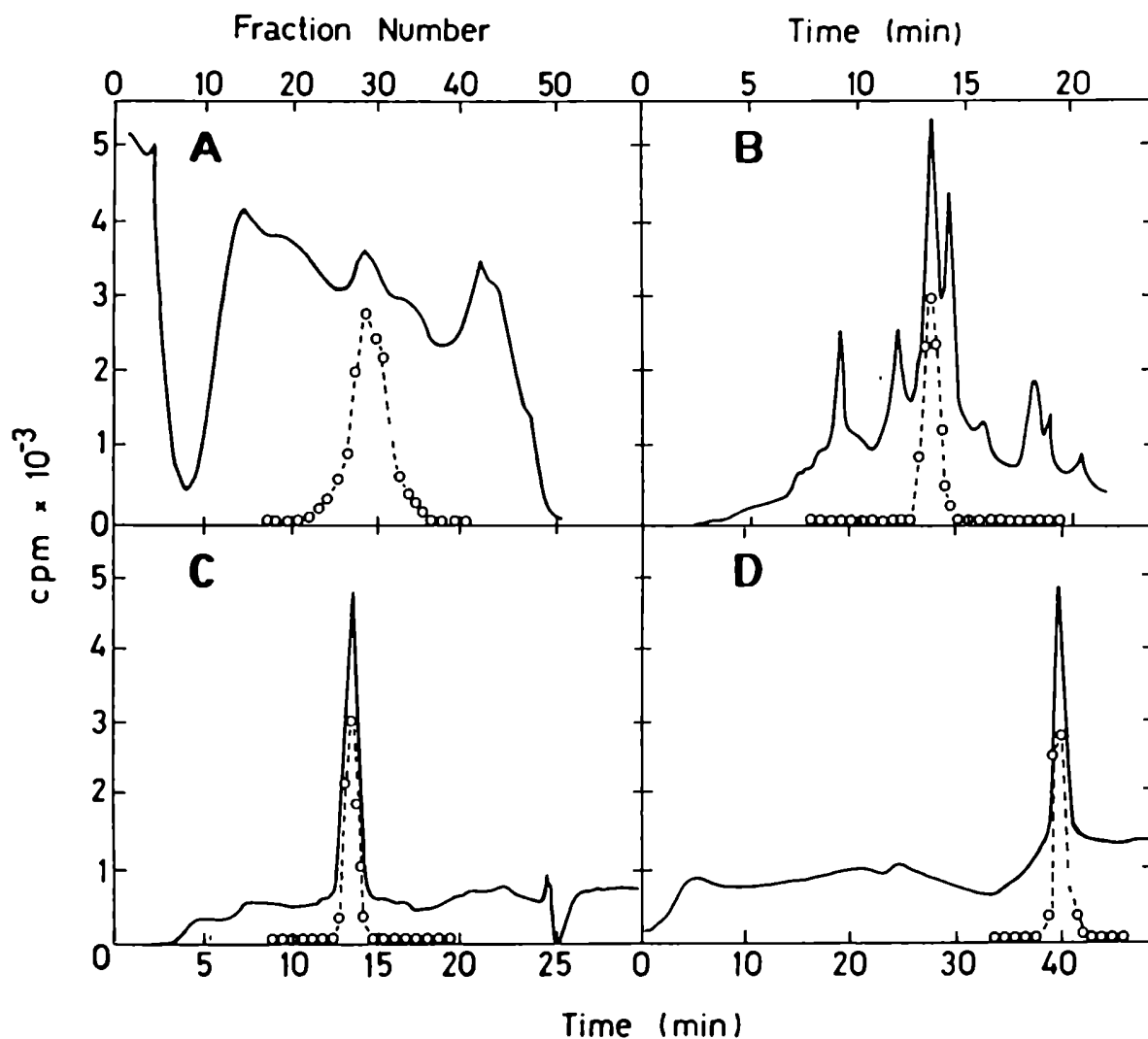
Tratamiento	cpm TCA insoluble	
	Sobrenadante	Precipitado
—	2	1254
0.1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	341	822
Sonicado	261	817

**PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD DE LA UDP-GLC:GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASA DE HÍGADO DE RATA**

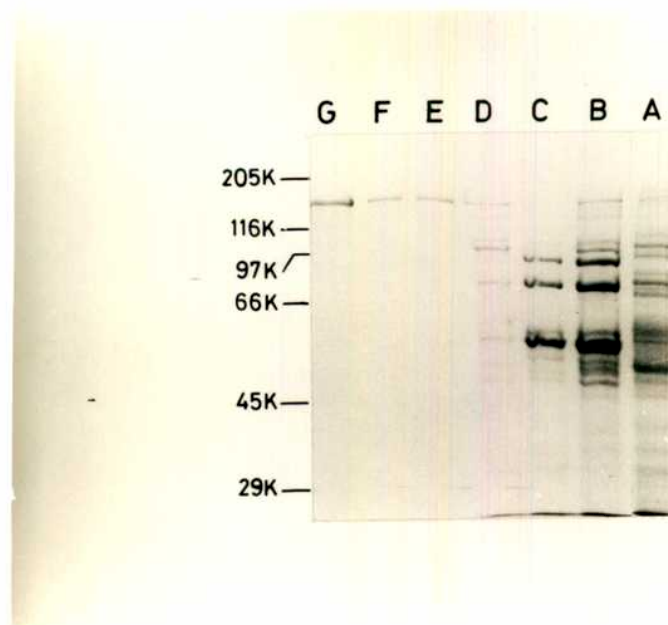
Los pasos de purificación utilizados se describen en *MATERIALES Y METODOS*. Los patrones obtenidos en DEAE, Mono Q y Phenyl-Superose se muestran en la Fig. 19, A-D. El rendimiento y otros datos se presentan en la Tabla XI. Puede verse que en los dos últimos pasos (Mono Q y Phenyl-Superose) que utilizan mecanismos de separación diferentes la actividad específica se mantiene constante y se detecta un solo pico de proteína (absorbancia a 280 nm) y de actividad que coinciden en ambos casos. En ambos casos se detecta una sola banda mayoritaria en SDS-PAGE de unos 160 kDa cuya intensidad de tinción por Coomasie Blue R-250 se correlaciona perfectamente con la actividad en las distintas fracciones. Esta banda también sigue el patrón de actividad en el eluido de la primera Mono Q y en cromatografía sobre hidroxapatita. En la preparación pura, la actividad y la banda percolan en cromatografía en Cibacrom-Blue agarosa y se retienen en una columna de Wheat Germ aglutinin-Sepharose. Por cromatografía en fase reversa de la preparación pura y de la misma S-alquilada con 4-vinilpiridina se obtuvo un único pico mayoritario de unos 160 kDa en SDS-PAGE (Fig. 21). Se consideró a estos datos como evidencia a favor de que la actividad reside en el polipéptido de 160 kDa mostrado en la Fig. 20. Se logró una purificación de unas 350 veces con respecto al contenido soluble del retículo endoplásmico; el contenido soluble del Aparato de Golgi (el otro componente de los microsomas utilizados) es casi nulo. Si bien este grado de purificación puede parecer bajo, otras proteínas solubles del retículo endoplásmico se encuentran en mayor concentración [85].

**Tabla XI.** Tabla de purificación

Paso	Proteína mg/ml	Actividad		Purificación	Rendimiento %
		cpm/5 $\mu$ l	cpm/mg		
Micorosomas	76	7416	97		100
Soluble	56	7077	126	1.3	95
Am. Sulf.	30	6906	230	2.3	66
DEAE	5	6190	1238	12.7	53
Con A	0.5	6336	12676	130.6	32
Mono Q	0.5	17439	34878	359.0	15
Mono Q	0.4	17055	42637	439.5	10
Phenyl-Sup	0.2	8627	43135	444.7	7

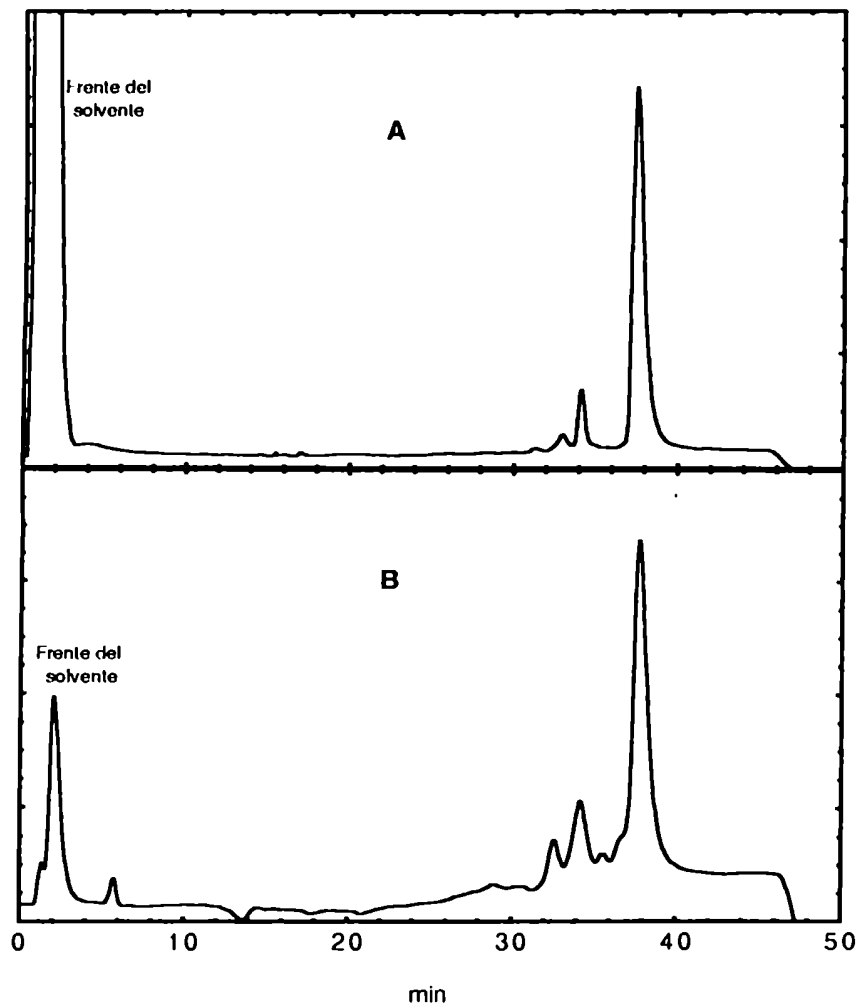


**Figura 19. Purificación de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa**  
 A-D corresponden al patrón obtenido en cromatografía en DEAE, primera y segunda Mono Q y Phenyl-Superose respectivamente. Con  $\circ-\circ$  se representa la actividad enzimática y en líneas llenas la absorbancia a 280 nm. Los distintos pasos se describen en *MATERIALES Y MÉTODOS*.



**Figura 20. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la glucosiltransferasa**

a: extracto soluble de las vesículas microsomales intactas (25  $\mu$ g), b: eluido de DEAE (40  $\mu$ g), c: percolado en ConA (15  $\mu$ g), d: eluido de Con A con  $\alpha$ -metilmanósido (2.5  $\mu$ g), f: eluido de la segunda Mono Q (0.3  $\mu$ g), g,h: eluido de la Phenyl-Superosa (0.3 y 3  $\mu$ g respectivamente).



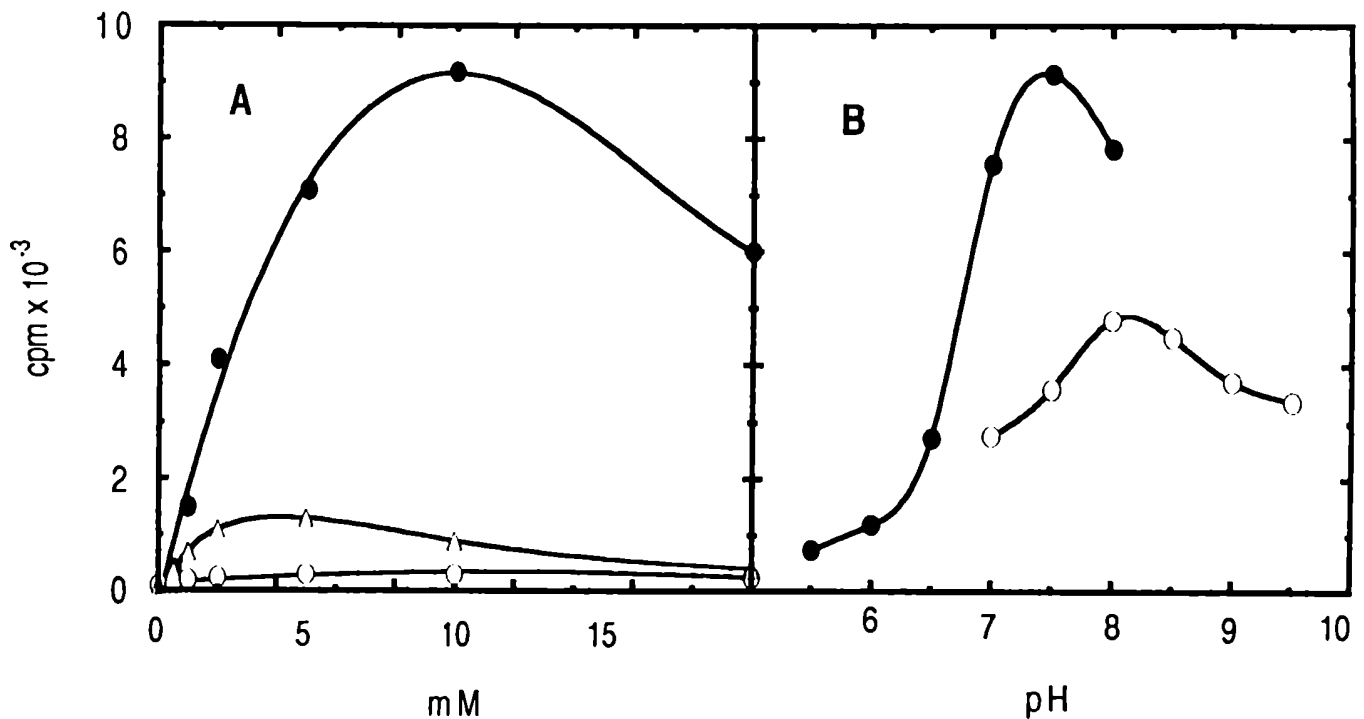
**Figura 21. Cromatografía en HPLC de la glucosiltransferasa purificada**  
Se utilizó una columna Brownlee™ RP-butyl 300 eluída con isopropanol. En (A) se muestra el perfil de elución de la glucosiltransferasa purificada a homogeneidad hasta el paso de Phenyl-Superosa. En (B) se corrió la misma muestra pero previamente reducida y alquilada con 4-vinilpiridina. En ambos casos los eluidos se analizaron por SDS-PAGE.



**REQUERIMIENTO DE CATIONES Y PH**

La actividad requirió  $\text{CaCl}_2$  y éste no pudo reemplazarse por  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  o combinaciones de ambos (Fig. 22, A) los que tampoco resultaron inhibidores en presencia de  $\text{CaCl}_2$ . La disminución de actividad a altas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  pudo deberse a la insolubilización de la tiroglobulina desnaturalizada (apreciable visualmente). El requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  por la enzima pura coincide con lo observado en ensayos preliminares utilizando aceptores endógenos y extractos crudos [4] y explica el requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en todos los ensayos descritos.

Se detectó un pH óptimo neutro amplio entre 7 y 9 (Fig. 22, B), compatible con la localización subcelular propuesta.



**Figura 22. Requerimiento de cationes y curva de pH de la UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata**

(A) La actividad se ensayó como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" cambiando los cationes y sus concentraciones según el caso. ●-●,  $\text{CaCl}_2$ ; ○-○,  $\text{MgCl}_2$ ; △-△,  $\text{MnCl}_2$ .

(B) La actividad se ensayó como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" cambiando los buffers y los pH según el caso. ●-●, buffer Imidazol-HCl 0.1 M; ○-○, buffer Tris HCl 0.1 M.

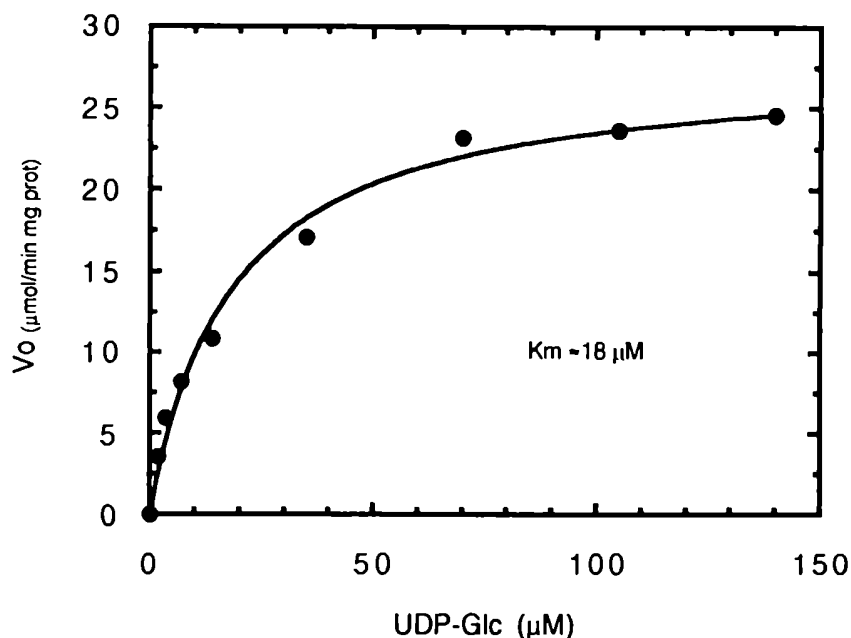
**REQUERIMIENTO DE NUCLEÓTIDO AZÚCARES DE LA ENZIMA PURA**

El único dador de azúcar efectivo de los ensayos resultó ser UDP-Glc (Tabla XII). TDP-Glc, ADP-Glc y UDP-Gal no pudieron actuar como dadores de sus monosacáridos. La enzima mostró un comportamiento aproximadamente michaelliano con respecto al UDP-Glc, con  $K_m$  aparente  $\approx 18 \mu M$  (Fig. 23). Si bien puede resultar un tanto elevado comparado con el  $K_m$  de otras glicosiltransferasas nucleótido-azúcar dependientes hay que tener en cuenta que existe un transportador específico de UDP-Glc desde el citoplasma hacia el interior del RE [86] que tal vez permita alcanzar allí concentraciones de UDP-Glc mayores que en otros lugares de la célula.

**Tabla XII.** Especificidad de nucleótido azúcares dadores.

Dador	cpm
UDP-Glc	5745
ADP-Glc	143
TDP-Glc	267
UDP-Gal	122

Los distintos nucleótido azúcares estaban marcados en Glc o Gal. Se ensayaron en concentración 2.5  $\mu M$  como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" utilizando glicosiltransferasa pura.

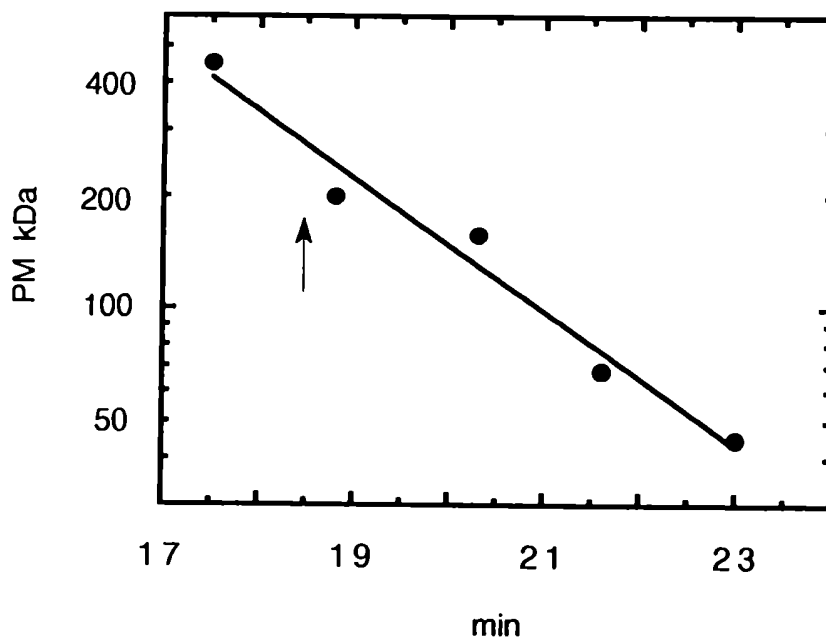


**Figura 23. Requerimiento de UDP-Glc**

En las reacciones se utilizó glicosiltransferasa pura como fuente de enzima, aglutinina de soja desnaturalizada con urea 8 M como glicoproteína aceptora en concentraciones saturantes y  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Las demás condiciones de ensayo fueron las descritas en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA". Un resultado semejante se obtuvo utilizando tiroglobulina desnaturalizada con urea 8M como glicoproteína aceptora en concentraciones saturantes.

**PESO MOLECULAR DE LA ENZIMA PURA**

En filtración molecular en Superose 12 la enzima nativa eluyó con un peso molecular aparente de unos 270 kDa (Fig. 24) lo que sugiere que se trataría de un dímero. En Ulrtogel AcA 44 (rango de fraccionamiento lineal 10-130 kDa) la glucosiltransferasa se excluyó, mientras que proteínas como catalasa (240 kDa,  $V_e/V_o \approx 1.10$ ),  $\beta$ -amilasa de batata (200 kDa,  $V_e/V_o \approx 1.15$ ) y fructosa 1-6-bisfosfatasa de cloroplastos de espinaca (180 kDa,  $V_e/V_o \approx 1.2$ , [87]) se incluyeron. En ultrogel AcA 34 (rango de fraccionamiento 20-350 kDa) la actividad de glucosiltransferasa se incluyó eluyendo entre catalasa (240 kDa) y apoferritina (450 kDa). Teniendo en cuenta que en SDS-PAGE la glucosiltransferasa corre como de unos 160 Kda, estos datos en su conjunto sugieren que se trataría de un homodímero en condiciones nativas.

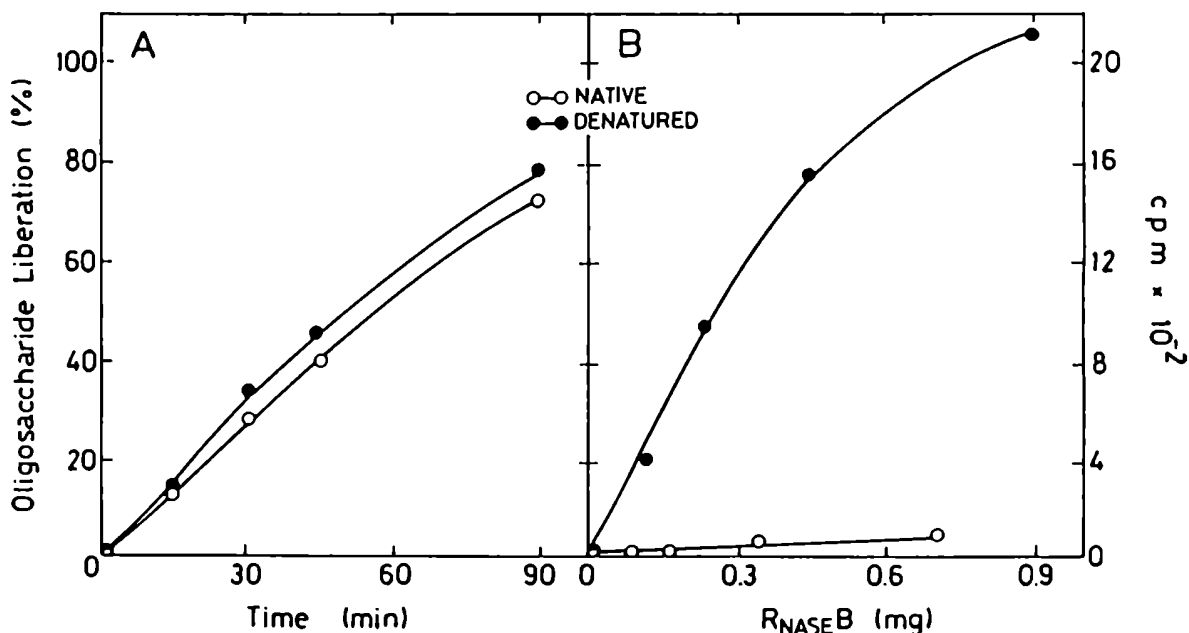


**Figura 24. Peso molecular de la glucosiltransferasa pura**

La flecha muestra la elución de la glucosiltransferasa en una columna de Superose-12, corrida en buffer Imidazol 10 mM pH 7.0, 5 mM 2-mercaptoetanol, 5% sacarosa, a un flujo de 0.5 ml/min. Los standards de peso molecular se corrieron en buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y fueron : 1, apoferritina (450 kDa); 2, catalasa (240 kDa); 3, aldolasa (158 kDa); 4, seroalbúmina bovina (68 kDa) y 5, ovoalbúmina (45 kDa).

**GLUCOSILACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS NATIVAS Y DESNATURALIZADAS POR LA GLUCOSILTRANSFERASA PURA**

Un aspecto importante de la especificidad de la glucosiltransferasa, destacado ya más arriba al desarrollar la base de su ensayo *in vitro*, es que sólo reconoce como sustrato aceptor a glicoproteínas desnaturalizadas pero no a las mismas glicoproteínas nativas [88, 89]. Para determinar si lo mismo ocurría con la enzima pura se eligió la ribonucleasa B de pancreas bovino. Esta proteína posee un solo oligosacárido de tipo polimanososa en su Asn 34. Se sabe por estudios de difracción de rayos X que la Asn 34 en la RNAasa A, el resto que está glicosilado en la RNAasa B, está íntegramente expuesto al solvente [90]. De modo que si se logra aumentar la capacidad aceptor de la RNAasa B al desnaturalizarla, el efecto se debería a la exposición de algún factor estructural en la proteína que interactúa con, o es reconocido por la glucosiltransferasa pura y no a una mayor accesibilidad al oligosacárido.



**Figura 25. Accesibilidad a Endo H (A) y capacidad aceptor (B) de la RNAasa B**

A, se incubaron 7.5 mg de RNAasa B nativa o desnaturalizada con urea 8 M en 2 ml de buffer trietilamina acetato 50 mM pH 5.5 a 37 °C con 0.01 U de Endo H. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 50 µl a las que se les agregaron 1 ml de TCA 10% y se dejaron a 4 °C 16 horas. Luego se centrifugaron y se midió el azúcar liberado en el sobrenadante [39, 91]. B, las mezclas de incubación contenían en un volumen final de 100 µl, 4 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.6 µM UDP-<sup>14</sup>C]Glc, 200 µM castanospermina como inhibidor de la glucosidasa II [65], 2 µg glucosiltransferasa pura y las cantidades indicadas de RNAasa B desnaturalizada o nativa. Luego de 5 min a 37 °C se detuvieron las reacciones con 1 ml de TCA 10% y se procesaron como se describe en MATERIALES Y METODOS.

## RESULTADOS

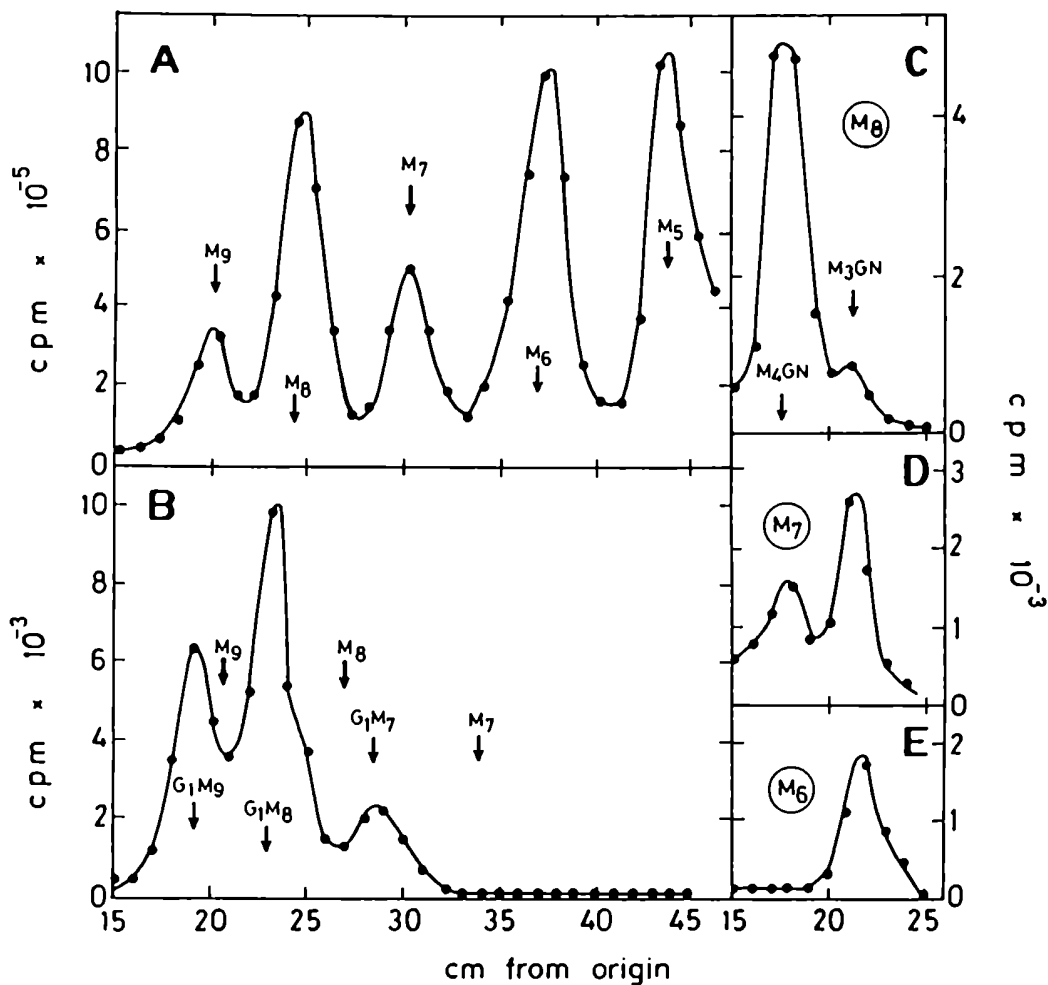
En la Fig. 25, A, puede verse que el oligosacárido está igualmente accesible a una macromolécula (Endo H) que para actuar necesita acceder al extremo reductor del oligosacárido tanto en la RNAasa B nativa como en la desnaturalizada con urea 8 M. Esto confirma que en las condiciones empleadas los oligosacáridos estaban bien expuestos tanto en la proteína nativa como en la desnaturalizada. No obstante, en la Fig. 25, B, se muestra que la forma desnaturalizada es mucho mejor sustrato de la glucosiltransferasa pura; la forma nativa prácticamente no actúa como sustrato, e incluso la pequeña incorporación detectada en la forma nativa puede deberse a pequeñas cantidades de RNAasa B desnaturalizada presente en el producto comercial.

## RESULTADOS

### **CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN FORMADOS POR LA GLUCOSILTRANSFERASA PURA**

Se degradó RNAasa B con pronasa y los glicopéptidos obtenidos se trataron con Endo H. Los oligosacáridos se redujeron con borohidruro de sodio tritiado y se corrieron en cromatografía en papel. Migraron como standards de  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}$  (Fig. 26, A). Por otro lado, los productos de glucosilación de la RNAasa B desnaturalizada por la glucosiltransferasa pura corrieron como  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}$  (Fig. 26, B).  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  no se glucosilaron porque carecen del resto de manosa al que se une la glucosa transferida. Por acetólisis de  $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAcol}$  (eluidos de la Fig. 26, A) produjeron  $\text{Man}_4\text{GlcNAcol}$ , mientras que  $\text{Man}_{5,6}\text{GlcNAcol}$  sólo produjeron  $\text{Man}_3\text{GlcNAcol}$ . Los productos de la acetólisis de  $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$ ,  $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$  y  $\text{Man}_6\text{GlcNAcol}$  se muestran en la Fig. 26, C-E.

En cuanto al producto formado, la glucosiltransferasa pura mostró la misma especificidad encontrada en extractos crudos y en preparaciones parcialmente purificadas.



**Figura 26. Caracterización de los productos de reacción de la glucosiltransferasa pura**

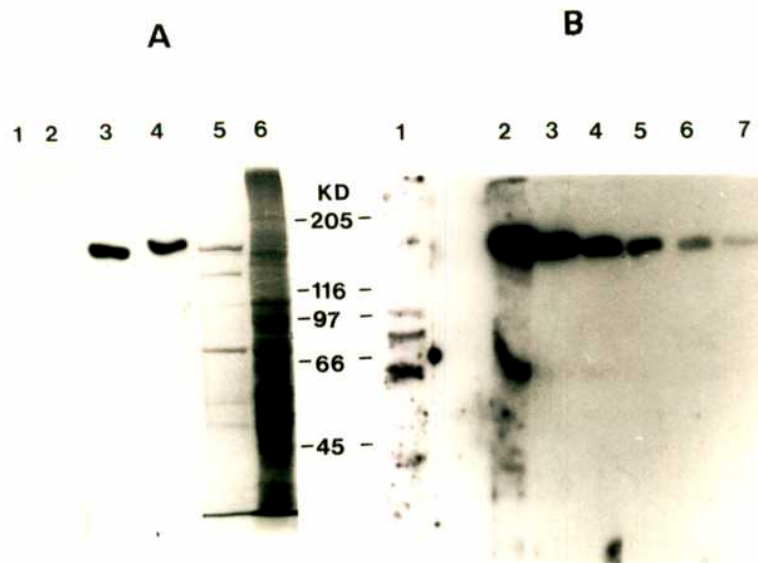
(A) Perfil de oligosacáridos de RNAasa B obtenidos por tratamiento con pronasa seguido de Endo H y posterior reducción con borohidruro de sodio tritiado. Los oligosacáridos se cromatografiaron en papel en 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4).

(B) Se incubaron 1.3 mg de RNAasa B durante 90 minutos en 100  $\mu$ l conteniendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2.6 mM castanospermina, 14  $\mu$ M UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc y 4  $\mu$ g de glucosiltransferasa pura. Los oligosacáridos se aislaron como ya se describió más arriba y se cromatografiaron en papel en propanol/nitrometano/agua (5:2:4).

(C-E) Los compuestos que corrieron como  $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$  (C),  $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$  (D) y  $\text{Man}_6\text{GlcNAcol}$  (E) en A se sometieron a acetólisis y se cromatografiaron en papel en 1-butanol/piridina/agua (4:3:4). Standards:  $\text{M}_5$ ,  $\text{Man}_5\text{GlcNAcol}$ ;  $\text{M}_6$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAcol}$ ;  $\text{M}_7$ ,  $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$ ;  $\text{M}_8$ ,  $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$ ;  $\text{M}_9$ ,  $\text{Man}_9\text{GlcNAcol}$ ;  $\text{G}_1\text{M}_7$ ,  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ;  $\text{G}_1\text{M}_8$ ,  $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ ;  $\text{G}_1\text{M}_9$ ,  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ ;  $\text{M}_3\text{GN}$ ,  $\text{Man}_3\text{GlcNAcol}$  y  $\text{M}_4\text{GN}$ ,  $\text{Man}_4\text{GlcNAcol}$ .

**ANTICUERPOS CONTRA LA UDP-GLC:GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASA DE HÍGADO DE RATA**

Siguiendo el esquema de inmunización descrito en *MATERIALES Y METODOS* se obtuvo un suero de conejo específico contra la glucosiltransferasa capaz de reconocer la proteína nativa y desnaturalizada. En la Fig. 27 y en la Tabla XIII puede verse la especificidad del mismo.



**Figura 27. Caracterización por Western blot del suero antiglucosiltransferasa**

(A) Los carriles 1, 3 y 5 contenían 4  $\mu$ g de una preparación de glucosiltransferasa parcialmente purificada (MonoQ). Los carriles 2, 4 y 6 contenían 25  $\mu$ g de un extracto con Lubrol de microsomas de hígado de rata. En los carriles 5 y 6 se muestra la tinción por Coomassie Blue. Los carriles 1 y 2 se procesaron con suero preinmune y los carriles 3 y 4 se procesaron con el suero antiglucosiltransferasa.

(B) Los carriles 1-7 contenían 25  $\mu$ g del mismo extracto con detergente utilizado en los carriles 2, 4 y 6 en (A) cuya tinción por Coomassie Blue se muestra en el carril 6 de (A). El carril 1 se procesó con suero preinmune diluido 1/50 y los carriles 2-6 con suero antiglucosiltransferasa en diluciones 1/50, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1200 y 1/2000.



## RESULTADOS

Se inmunoprecipitó la glucosiltransferasa y se midió actividad en los inmunoprecipitados como se describe en *MATERIALES Y METODOS*. En la Tabla XII puede verse que el suero anti-glucosiltransferasa precipitó específicamente la actividad de glucosiltransferasa.

**Tabla XIII.** Inmunoprecipitación de la glucosiltransferasa

Actividad de glucosiltransferasa (cpm) en los inmunoprecipitados			
Suero anti-glucosiltransferasa	Suero preinmune	0.5% BSA	a
7229	317	311	302

a: Para la inmunoprecipitación se utilizaron 10  $\mu$ l de TBS en lugar del extracto de detergente. Se agregaron 10  $\mu$ l de suero anti-glucosiltransferasa y se procesaron como las otras tres reacciones.

## RESULTADOS

### **SECUENCIA PARCIAL DE AMINO ACIDOS DE LA UDP-GLC:GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASA DE HÍGADO DE RATA**

Se secuenció el extremo N-terminal de la proteína purificada a homogeneidad, reducida y alquilada con 4-vinilpiridina y purificada por fase reversa en HPLC. También se secuenció el extremo N-terminal de la banda asignada a la glucosiltransferasa aislada por SDS-PAGE a partir de una preparación parcialmente purificada y transferida a membranas de PVDF.

La glucosiltransferasa purificada a homogeneidad y alquilada con 4-vinilpiridina se digirió con Endo-Lys-C. Los péptidos generados se aislaron por HPLC en fase reversa y se secuenciaron algunos de ellos. Las secuencias obtenidas no tienen homología con ninguna secuencia registrada hasta el momento en GENE BANK ni en PIR y son:

NRKAITTSLTTKDFSAP	(N-terminal, enzima pura)
NSKAITTSLTTKWFS	(N-terminal, SDS-PAGE)
VDSLLSAQPK	
GSFQK	
TAAIANSMNYLTK	
YxASHLAGR	
FIPYMA	
LVxSTNxM	

## DISCUSION

La glucosa no es un componente de las N-glicoproteínas maduras, interviniendo sólo transitoriamente en su biosíntesis. En primer término la presencia de los tres restos de Glc en el intermediario  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  parece servir como señal par su transferencia a la proteína. Inmediatamente después de la transferencia son removidos por las glucosidasas I y II [1, 20].

A continuación operaría el mecanismo de reglucosilación transitoria de los oligosacáridos deglucosilados unidos a proteína. La formación de  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2\text{-Prot.}$  a partir de los correspondientes compuestos deglucosilados es transitoria *in vivo* y excepto en unos pocos casos [92-94], no se han detectado glicoproteínas maduras con oligosacáridos de estructura  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ .

La glucosidasa II es capaz de hidrolizar *in vitro* el resto de Glc del  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  formado por glucosilación del  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  unido a proteína. Probablemente también sea la responsable de removerlo *in vivo* ya que la estructura del oligosacárido unido a proteína resultó ser la misma que la del  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  unido a Dol-P-P. En un trabajo reciente se encontró también que la glucosidasa II purificada hidrolizó *in vitro* el  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  formado *in vivo* por glucosilación de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular cepa ts045 [95].

En los tripanosomátidos estudiados no se encontró una actividad equivalente a la glucosidasa I de otros eucariontes, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que estos organismos no poseen oligosacáridos con tres restos de Glc, sustratos naturales de dicha enzima. Sin embargo sí se encontró una actividad equivalente a la glucosidasa II, aun cuando estos organismos no poseen uno de los dos sustratos de esta glucosidasa; al no formar Dol-P-Glc y por tanto transferir a glicoproteínas oligosacáridos no glucosilados no tienen compuestos con dos ni tres restos de Glc ( $\text{Glc}_{3,2}\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ ). Sólo tienen compuestos con un resto de Glc formados por glucosilación directa desde UDP-Glc de los oligosacáridos unidos a proteína ( $\text{Glc}_1\text{Man}_{6-9}\text{GlcNAc}_2$ ). Estos compuestos aislados de tripanosomátidos son sustratos de la glucosidasa II de otros eucariontes. También la glucosidasa II de los tripanosomátidos utiliza como sustratos los  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}$  de otros eucariontes, tanto los provenientes de Dol-P-P como los obtenidos *in vitro* en el ensayo descrito en esta Tesis.

Estos resultados están de acuerdo con que la glucosidasa II además de procesar el oligosacárido transferido desde Dol-P-P (excepto en tripanosomátidos donde estos no están glucosilados) es la responsable de remover el resto de Glc añadido por glucosilación directa de las glicoproteínas. Esta es por el momento la única función encontrada para la glucosidasa II de tripanosomátidos. El hecho de que aun los tripanosomátidos, que tienen tantas excepciones en su mecanismo de N-glicosilación comparado con otros eucariontes, hayan conservado intacto el mecanismo de glucosilación transitoria probablemente indique que esta serie de reacciones cumple un

rol importante para la célula.

Se ha descrito una actividad de endomanosidasa que hidroliza el residuo de Man al que se unen los restos de Glc [68, 96, 97]. Esta enzima es capaz de hidrolizar oligosacáridos con uno, dos o tres restos de Glc y está localizada en el Aparato de Golgi. No se ha establecido hasta el momento la participación de esta endomanosidasa en el procesamiento de las glicoproteínas glucosiladas por el mecanismo descrito en esta Tesis, pero esta endomanosidasa no se ha podido detectar en ensayos libres de células en tripanosomátidos (RESULTADOS y [98]).

De acuerdo con los resultados presentados en esta Tesis la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa es una proteína soluble del interior del retículo endoplásmico. Tendría entonces la misma localización subcelular que la otra enzima del ciclo de glucosilación-deglucosilación, la glucosidasa II [99]. Probablemente ambas enzimas sean retenidas en el RE por el mecanismo de retención a través de la secuencia C-terminal KDEL [100, 101]. Resulta interesante que todas las glucosiltransferasas y glucosidasas estudiadas hasta el momento involucradas en la síntesis y procesamiento de N-glicoproteínas son proteínas de membrana [81], excepto las involucradas en la glucosilación transitoria; la UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa y la glucosidasa II. Ambas enzimas pueden compartir la misma ubicación dentro del RE, lo que tal vez contribuya a la rápida desaparición de los compuestos glucosilados, o tal vez se sitúen en distintos compartimientos del RE [102-106]. La disponibilidad de anticuerpos contra la glucosiltransferasa permitirá resolver esto por colocalización al microscopio electrónico.

No está claro por ahora qué es lo que determina que un oligosacárido sea reglucosilado o no, y cuando deja de participar de este ciclo de glucosilación-deglucosilación. Utilizando células de *T. cruzi* y *C. fasciculata* se determinó que más de la mitad de las glicoproteínas totales son glucosiladas transitoriamente [98, 107]. El uso de estos microorganismos tiene como ventaja, a diferencia de otros eucariontes, que la glucosilación de glicoproteínas es la única vía para la formación de compuestos glucosilados ya que no sintetizan Dol-P-Glc. Este resultado hace pensar que no se trata de una ruta minoritaria o limitada a una subclase de glicoproteínas sino que más bien se trata de un mecanismo general de procesamiento.

La glucosiltransferasa pura o en extractos crudos parece reconocer algún elemento estructural en las glicoproteínasceptoras ya que no reconoce como sustrato a glicopéptidos aislados y todas las glicoproteínas de tipo polimanosa ensayadas sólo actúan como sustrato en estado desnaturalizado pero no en estado nativo. Esto último no se debe a una mayor exposición de los oligosacáridos en las glicoproteínas desnaturalizadas ya que en las glicoproteínas nativas ensayadas están igualmente accesibles que en las mismas desnaturalizadas. Estudios más detallados indican que la glucosiltransferasa reconocería tanto al oligosacárido como a la parte proteica de las glicoproteínasceptoras [89].

La selectividad por glicoproteínas desnaturalizadas encontrada en sistemas

libres de células concuerda con lo descrito recientemente *in vivo* para la proteína G de mutantes del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y para una quimera entre la hormona de crecimiento de rata con un fragmento de la hemaglutinina del virus influenza.

La proteína G normal tiene dos sitios de glicosilación ocupados con oligosacáridos complejos y adopta su estructura terciaria nativa y se ensambla en trímeros antes de ser transportada fuera del RE [108]. La proteína G de la mutante termosensible ts045 [109] lleva una mutación puntual Ser 204 → Phe que hace que a 41 °C (temperatura no permisiva) no sea capaz de adoptar su estructura terciaria nativa y no se trimerice, formando agregados que son retenidos en el RE. Al volver a 32 °C (temperatura permisiva) la proteína G recupera la capacidad de adoptar su estructura terciaria nativa, se trimeriza y es transportada fuera del RE recuperando el fenotipo normal [110, 111]. Se encontró que la proteína G de la mutante ts045 conserva oligosacáridos monoglucosilados  $\text{Glc}_1\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2$  a la temperatura no permisiva [95]. La TM12, una variante que tiene una delección de 8 amino ácidos (472-479) en el sector transmembrana de la proteína G [112] tiene el mismo fenotipo termosensible que ts045 y sus oligosacáridos también permanecieron monoglucosilados a 41 °C [95]. En los dos casos la adición de los residuos de Glc fue post-traduccional. A la temperatura no permisiva hubo un pasaje entre las formas no glucosiladas y monoglucosiladas, indicando que los restos de Glc fueron transferidos por la acción de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa.

Es muy poco probable que a la temperatura no permisiva las dos proteínas G mutantes adopten conformaciones no nativas que permitan en los dos casos la acción de la glucosidasa I y II sobre los dos restos de Glc más externos pero no sobre el más interno. Tampoco resulta muy factible que las proteínas G mutantes sean retenidas a la temperatura no permisiva en un compartimiento del RE desprovisto de glucosidasa II y que luego a la temperatura permisiva retomen el proceso de ensamblado y secreción desde el RE ya que la proteína G de ts045 se inmunolocalizó al microscopio electrónico distribuída uniformemente en el RE a 32 y 41 °C [110, 113] al igual que la glucosidasa II [99]. Un modelo posible para interpretar la persistencia de oligosacáridos monoglucosilados es que las proteínas G mutantes son completamente deglucosiladas a ambas temperaturas por las glucosidasas I y II pero a la temperatura no permisiva son incapaces de adoptar la estructura nativa formando agregados que quedan retenidos en el RE. Estos son reconocidos como sustratos por la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa comenzando un ciclo de glucosilación-deglucosilación. Al volver a 32 °C son capaces de adoptar su estructura nativa y dejan de ser reconocidas como sustrato por la glucosiltransferasa continuando con el procesamiento normal.

Un caso similar se ha descrito para una quimera entre un fragmento de la hemaglutinina del virus influenza (HA) y la zona C-terminal de la hormona de crecimiento de rata [106]. Esta construcción tiene un sitio de N-glicosilación ocupado en

la secuencia correspondiente a la HA en la que normalmente es procesado al estadio de complejo cuando pasa por el Aparato de Golgi. Cuando esta quimera se expresa por transfección en células COS forma agregados que quedan retenidos en el RE sin llegar al Aparato de Golgi [104] y conserva sus oligosacáridos monoglucosilados [106].

La caracterización de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa como una proteína soluble del lumen del RE, coincide con la localización de sus sustratos *in vivo*; las glicoproteínas, el UDP-Glc y el  $\text{Ca}^{++}$ .

Las glicoproteínas aceptoras en su faz inicial de glicosilación, procesamiento y ensamblado residen en el interior del RE donde adoptan su estructura nativa antes de seguir el camino de secreción o alcanzar su localización subcelular definitiva [114-117]. De acuerdo a la especificidad encontrada *in vitro* e *in vivo* la glucosiltransferasa reconocería como sustratos a las glicoproteínas que aún no adoptaron su estructura definitiva y hace que conserven sus oligosacáridos monoglucosilados.

En cuanto al sustrato dador de Glc, se ha descrito un transporte específico de UDP-Glc desde el citoplasma donde se sintetiza, hacia el interior del RE [86]. Este transporte no se ha podido detectar en el Aparato de Golgi.

Dol-P-Man, Dol-P-P-GlcNAc y Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub> al igual que el Dol-P-Glc se sintetizan en la cara citoplasmática del RE. Luego son translocados a su interior donde son utilizados en los pasos de biosíntesis del Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol. En el caso del Dol-P-Man esto parecería necesario dado que no hay transporte de GDP-Man hacia el interior del RE [18, 71, 86]. Pero este no es el caso de los derivados de dolicol de GlcNAc y Glc ya que sus respectivos nucleótido azúcares se transportan hacia el lumen del RE. El UDP-GlcNAc transportado sería utilizado por las N-acetilglucosaminiltransferasas involucradas en la síntesis de O-glicoproteínas y del ancla de glicosilfosfatidilinositol [118] aunque no hay evidencias directas en ninguno de estos dos casos. La glicosilación de glicoproteínas parece ser hasta el momento la única reacción que hace uso del UDP-Glc transportado al lumen del RE. Una posible explicación para esta aparentemente innecesaria translocación de Dol-P-Glc sería que las glucosiltransferasas que utilizan Dol-P-Glc y UDP-Glc residan en compartimientos diferentes del RE, en uno de los cuales, donde estaría la Dol-P-Glc:oligosacárido glucosiltransferasa, no habría transportador de UDP-Glc.

Otra alternativa podría ser que las enzimas que convierten Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol en Gl<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol estén organizadas en la membrana del RE formando un complejo o algún arreglo de forma tal que necesiten a los monosacáridos presentados como derivados de dolicol y no como sus correspondientes nucleótido azúcares. En este sentido, recientemente se ha propuesto que la oligosacariltransferasa está asociada formando parte de un complejo con las riboforinas I y II [21].

La UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa tiene un requerimiento absoluto de iones  $\text{Ca}^{++}$  para su actividad. Si bien el requerimiento hallado en sistemas libres de células puede parecer un tanto elevado, concilia con la localización de esta enzima en el lumen del RE. Este es el principal reservorio celular de  $\text{Ca}^{++}$  pudiendo alcanzar

## DISCUSION

concentraciones de 3 mM, tres ordenes de magnitud mayor que en el citoplasma [119]. Algunas proteínas con gran capacidad de unir calcio como GRP94, GRP78 (BiP), RP60, CRP55 están involucradas en mantener tan altas concentraciones locales. Al menos una de ellas, GRP78, colabora como chaperon molecular asistiendo en el ensamblado de proteínas en el RE y asociandose a proteínas que no adoptan su estructura nativa [120]. El mantenimiento de las altas concentraciones de  $Ca^{++}$  en el RE está de alguna manera relacionado con el transporte de proteínas desde el RE [119]. La disminución de la concentración de  $Ca^{++}$  provoca la salida indiscriminada de proteínas de secreción y también de las residentes en el RE.

La retención de restos de Glc en los oligosacáridos [95, 106, 121], la alta concentración de  $Ca^{++}$  [119] y el no adoptar una estructura nativa [116] son todos hechos asociados con la retención de proteínas en el RE. A la vez son las condiciones en que actúa la glucosiltransferasa. Por todo ello resulta tentador especular que la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa pudiera estar de alguna manera involucrada en los procesos por los cuales las células regulan la maduración de glicoproteínas en el RE.

Estudios detallados sobre la especificidad de esta enzima y el disponer del gen codificante para realizar estudios por disrupción del mismo permitirá profundizar sobre el rol de la glucosilación transitoria.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kornfeld, R. & Kornfeld, S., *Annu. Rev. Biochem.* (1985) 54, 631-664.
2. Parodi, A.J. & Cazzulo, J.J., *J. Biol. Chem.* (1982) 257, 7641-7645.
3. Parodi, A.J., Martin-Barrientos, J. & Engel, J.C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) 118, 1-7.
4. Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z. & Mendelzon, D.H., *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 5589-5595.
5. Mendelzon, D.H. & Parodi, A.J., *J. Biol. Chem.* (1986) 261, 2129-2133.
6. Mendelzon, D.H., Previato, J.O. & Parodi, A.J., *Mol. Biochem. Parasitol.* (1986) 18, 354-367.
7. Engel, J.C. & Parodi, A.J., *J. Biol. Chem.* (1985) 260, 10105-10110.
8. Doyle, P. *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* (1986) 21, 93-101.
9. Parodi, A.J., Mendelzon, D.H. & Lederkremer, G.H., *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 8260-8265.
10. Parodi, A.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1984) 259, 6351-6357.
11. Kornfeld, R. & Kornfeld, S., *Ann. Rev. Biochem.* (1976) 45, 217-237.
12. Montreuil, J., *Adv. Carb. Chem. Biochem.* (1980) 37, 157-223.
13. Behrens, N.H. & Leloir, L.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1970) 66, 153-159.
14. Parodi, A.J. & Leloir, L.F., *Biochim. Biophys. Acta* (1979) 559, 1-37.
15. Hubbard, S.C. & Ivatt, R.I., *Ann. Rev. Biochem.* (1981) 50, 555-583.
16. Keller, K., *TIBS* (1987) 12, 443-445.
17. Chojnacki, T. & Dallner, G., *Biochem. J.* (1988) 251, 1-9.
18. Hirschberg, C.B. & Snider, M.D., *Annu. Rev. Biochem.* (1987) 56, 63-87.
19. Abeijon, C. & Hirschberg, C.B., *TIBS* (1992) 17, 32-36.
20. Kaplan, H.A., Welply, J.K. & Lennarz, W.J., *Biochim. Biophys. Acta.* (1987) 906, 161-173.
21. Kelleher, D.J., Kreibich, G. & Gilmore, R., *Cell* (1992) 69, 55-65.
22. Rademacher, T.W., Parekh, B.B. & Dwek, R.A., *Annu. Rev. Biochem.* (1988) 57, 785-838.
23. Bosch, M., Trombetta, S.E. & Parodi, A.J., *Biochem. Soc. Trans.* (1988) 16, 268-271.
24. de la Canal, L. & Parodi, A.J., *J. Biol. Chem.* (1987) 262, 11128-11133.
25. Bosch, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 17360-17365.
26. Gross, V. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1983) 259, 12203-12209.
27. Datema, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1982) 79, 6787-6791.
28. Ogier-Denis, O. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 6031-6037.
29. Stannard, B.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 8309-8317.
30. Hubbard, C.S. & Robbins, P.W., *J. Biol. Chem.* (1979) 254, 4568-4576.
31. Turco, S.J. & Robbins, P.W., *J. Biol. Chem.* (1979) 254, 4560-4567.
32. Rosner, M.R., Grinna, L.S. & Robbins, P.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1980) 77, 67-71.
33. Godelaine, D., Spiro, M.J. & Spiro, R.G., *J. Biol. Chem.* (1981) 256, 10161-



- 10168.
34. Foddy, L. & Hughes, R.C., *Eur. J. Biochem.* (1988) 175, 291-299.
  35. Wright, A. & Robbins, P.W., *Biochim. Biophys. Acta* (1965) 104, 594-595.
  36. Allen, H.J. & Jhonson, E.A., *Carbohydrate Research* (1976) 50, 121-131.
  37. Lowry, O.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1951) 193, 265-275.
  38. Gornall, A.C., Bardawill, C.J. & David, M.M., *J. Biol. Chem.* (1949) 177, 751-766.
  39. Du Bois, M. *et al.*, *Anal. Chem.* (1956) 28, 350-356.
  40. Arima, T., Spiro, M.J. & Spiro, R.G., *J. Biol. Chem.* (1972) 247, 1825-1835.
  41. *Meth. Enzymol.* vol. 5, 22, 30, 31.
  42. Tangen, O., Jonsson, J. & Orrenius, S., *Anal. Biochem.* (1973) 54, 597-603.
  43. Arion, W.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1976) 251, 4901-4907.
  44. Arion, W.J., *Meth. Enzymol.* (1989) 174, 58-67.
  45. Chen, P.S., Toribara, T.I. & Warner, H., *Anal. Chem.* (1956) 28, 1756-1758.
  46. Ugalde, R.A., Staneloni, R.J. & Leloir, L.F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1979) 91, 1174-1181.
  47. Ugalde, R.A., Staneloni, R.J. & Leloir, L.F., *Eur. J. Biochem.* (1980) 113, 97-103.
  48. Tsuji, T. *et al.*, *Biochem. J.* (1981) 195, 691-699.
  49. Liang, C., Yamashita, K. & Kobata, A., *J. Biochem.* (1980) 88, 51-58.
  50. Dorland, L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1981) 256, 7708-7711.
  51. Tarentino, A.L. & Mley, F., *J. Biol. Chem.* (1974) 249, 811-817.
  52. Fullmer, C.S., *Anal. Biochem.* (1984) 142, 336-342.
  53. Laemmli, U.K., *Nature* (1970) 227, 680-682.
  54. Arima, T. & Spiro, R.G., *J. Biol. Chem.* (1972) 247, 1836-1848.
  55. Hieh, P., Rich Rosner, M. & Robbins, P.W., *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 2555-2561.
  56. Trimble, R.B., Maley, F. & Chu, F.K., *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 2562-2567.
  57. Metzger, H. & Edelhoich, H., *J. Am. Chem. Soc.* (1961) 83, 1423.
  58. Ui, N., Lippoldt, R.D. & Edelhoich, H., *Arch. Biochem. Biophys.* (1974) 164, 202-206.
  59. Edelhoich, H. & Metzger, H., *J. Am. Chem. Soc.* (1961) 83, 1428.
  60. Edelhoich, H. & Lippoldt, R.E., *Biochim. Biophys. Acta* (1964) 79, 64.
  61. Grinna, L.S. & Robbins, P.W., *J. Biol. Chem.* (1979) 254, 8814-8818.
  62. Grinna, L.S. & Robbins, P.W., *J. Biol. Chem.* (1980) 255, 2255-2258.
  63. Michael, J.M. & Kornfeld, S., *Arch. Biochem. Biophys.* (1980) 199, 249-258.
  64. Spiro, R.G., Spiro, M.J. & Bhoyroo, V.D., *J. Biol. Chem.* (1979) 254, 7659-7667.
  65. Elbein, A.D., *Annu. Rev. Biochem.* (1987) 56, 497-534.
  66. Lennarz, W.J., "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans". (1981), Plenum, New York.
  67. Pless, D.D. & Lennarz, W.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1977) 74, 134-138.
  68. Lubas, W.A. & Spiro, R.G., *J. Biol. Chem.* (1987) 262, 3775-3781.
  69. Parodi, A.J., Quesada-Allué, L.A. & Cazzulo, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1981) 78, 6201-6205.

70. Parodi, A.J. & Quesada-Allué, L.A., *J. Biol. Chem.* (1982) 257, 7637-7640.
71. Hanover, J.A. & Lennarz, W.J., *J. Biol. Chem.* (1982) 257, 2787-2794.
72. Snider, M., Sultzman, L.A. & Robbins, P.W., *Cell* (1980) 21, 385-392.
73. Spiro, M.J. & Spiro, R.G., *J. Biol. Chem.* (1985) 260, 5808-5815.
74. Kreibich, G. & Sabatini, D.D., *Meth. Enzymol.* (1974) 31, 215-225.
75. Jennings, M.L., *Annu. Rev. Biochem.* (1989) 58, 999-1027.
76. Fujiki, Y. *et al.*, *J. Cell Biol.* (1982) 93, 97-102.
77. Helers, M.R.W. & Riordan, J.F., *Biochemistry* (1991) 30, 10065-10074.
78. Sadler, J.E. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1979) 254, 4434-4443.
79. Beyer, T.A. *et al.*, *Adv. Enzymol.* (1981) 52, 23-175.
80. Elhamer, A. & Kornfeld, S., *J. Biol. Chem.* (1986) 261, 5249-5255.
81. Paulson, J.C. & Colley, K.J., *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 17615-17618.
82. Bischoff, J. & Kornfeld, R., *J. Biol. Chem.* (1986) 261, 4758-4765.
83. Bordier, C., *J. Biol. Chem.* (1981) 256, 1604-1607.
84. Pryde, J.G., *Trends Biochem. Sci.* (1986) 11, 160-163.
85. Hawkins, H.C., Blackburn, E.C. & Freedman, R.B., *Biochem. J.* (1991) 275, 349-353.
86. Pérez, M. & Hirschberg, C.B., *J. Biol. Chem.* (1986) 261, 6822-6830.
87. Ballicora, M.A. & Wolosiuk, R.A., *Plant Sci.* (1990) 79, 35-41.
88. Trombetta, S.E., Bosch, M. & Parodi, A.J., *Biochemistry* (1989) 28, 8108-8116.
89. Sousa, M., Ferrero García, M.A. & Parodi, A.J., *Biochemistry* (1992) 31, 97-105.
90. Richards, F.M. & Wickoff, W.W., p. 647-806 "The Enzymes" Ed. P.D. Boyer. Vol. IV. (1971), Academic Press: New York.
91. Trimble, R.B. & Maley, F., *Anal. Biochem.* (1984) 141, 515-522.
92. Strous, G.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1987) 262, 3620-3625.
93. Kaushal, G.P. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1990) 265, 16271-16279.
94. Ohta, M. *et al.*, *Glycoconjugate J.* (1992) 8, 400-413.
95. Suh, K., Bergmann, J.E. & Gabel, C.A., *J. Cell Biol.* (1989) 108, 811-819.
96. Rabouille, C. & Spiro, R.G., *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 11573-11578.
97. Moore, S.E.H. & Spiro, R.G., *J. Biol. Chem.* (1990) 265, 13104-13112.
98. Gañan, S., Cazzulo, J.J. & Parodi, A.J., *Biochemistry* (1991) 30, 3098-104.
99. Lucocq, J.M., Brada, D. & Roth, J., *J. Cell Biol.* (1986) 102, 2137-2146.
100. Pelham, H.R.B., *Trends Biochem. Sci.* (1990) 15, 483-486.
101. Pelham, H.R., *Annu. Rev. Cell Biol.* (1989) 5, 1-23.
102. Kabcenell, A.K. & Atkinson, P.H., *J. Cell Biol.* (1985) 101, 1270-1280.
103. Pathak, R.K. *et al.*, *J. Cell Biol.* (1988) 106, 1831-1841.
104. Rizzolo, L.J. *et al.*, *J. Cell Biol.* (1985) 101, 1351-1362.
105. Pryme, I.F., *Mol. Cell. Biochem.* (1989) 87, 93-103.
106. Rizzolo, L.J. & Kornfeld, R., *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 9520-9525.
107. Gotz, G., Ganán, S. & Parodi, A.J., *Mol. Biochem. Parasitol.* (1991) 45, 265-73.
108. Doms, R.W. *et al.*, *J. Cell Biol.* (1987) 105, 1957-1969.
109. Gallione, C.J. & Rose, J.K., *J. Virol.* (1985) 54, 374-382.
110. Bergman, J.E., Tokusayu, K.T. & Singer, S.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

- (1981) 78, 1746-1750.
111. Knipe, D.M., Baltimore, D. & Lodish, H.F., *J. Virol.* (1977) 21, 1149-1158.
  112. Adams, G.A. & Rose, J.K., *Cell* (1985) 41, 1007-1015.
  113. Bergman, J.E. & Singer, S.J., *J. Cell Biol.* (1983) 97, 1777-1787.
  114. Pfeffer, S.R. & Rothman, J.E., *Annu. Rev. Biochem.* (1987) 56, 829-852.
  115. Rose, J.K. & Doms, R.W., *Ann. Rev. Cell Biol.* (1988) 4, 258-289.
  116. Hurtley, S.M. & Helenius, A., *Ann. Rev. Cell Biol.* (1989) 5, 277-308.
  117. Lodish, H.F., *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 2107-2110.
  118. Doering, T.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1990) 265, 611-614.
  119. Sambrook, J.F., *Cell* (1990) 61, 197-199.
  120. Flynn, G.C. *et al.*, *Nature* (1991) 353, 726-730.
  121. Lodish, H.F. & Kong, N., *J. Cell Biol.* (1984) 98, 1720-1729.