

Tesis de Posgrado

Enzimas lisosomales, biosíntesis y translocación hacia los lisosomas : purificación glicosiltransferasas involucradas en la dirección de enzimas lisosomales a los lisosomas

Guillén, Eduardo Rodolfo

1993

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

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

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

Cita tipo APA:

Guillén, Eduardo Rodolfo. (1993). Enzimas lisosomales, biosíntesis y translocación hacia los lisosomas : purificación glicosiltransferasas involucradas en la dirección de enzimas lisosomales a los lisosomas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2569_Guillen.pdf

Cita tipo Chicago:

Guillén, Eduardo Rodolfo. "Enzimas lisosomales, biosíntesis y translocación hacia los lisosomas : purificación glicosiltransferasas involucradas en la dirección de enzimas lisosomales a los lisosomas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2569_Guillen.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Enzimas Lisosomales. Biosíntesis y Translocación Hacia los Lisosomas

*Purificación de glicosiltransferasas involucradas en la
dirección de enzimas lisosomales a los lisosomas*

Autor: Eduardo R. Guillén

Director: Dr. Roberto O. Couso

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias
Químicas

1993

18 373
5.164
2

A mis padres

Reconocimiento

Este trabajo fué realizado con el Dr. Roberto O. Couso, Beto, a la memoria de quién lo dedico. Su constante estímulo y generoso aporte de experiencia, su calidad humana y compañerismo, hicieron inolvidables los años que pasamos juntos en el laboratorio.

A los Dres. Angel Fusco, Joaquín Espada, Nora C. Brandan y Marcelo Dankert, por mi anterior formación y por acogerme en sus laboratorios en mis primeros intentos de investigación.

A Eduardo Caferatta, que colaboró conmigo en algunos experimentos de la primera parte de esta tesis, y a Vivian Alvarez. Con ellos compartí muchas horas en el laboratorio y fuera de él.

A todos mis amigos y compañeros del Instituto, en especial a Silvia Altabe, Fernando Ardila, Graciela Bocaccio, Juan C. Bossio, Tony Coira, Alfredo Cura, Patricia Marini, José Miret, Horacio Natri, Alejandro Rabossi, Matín Radrizzani, Andrea Rostchild, Diana Tolmasky, Toni Utaro, y Pablo Wappner, por los cafés, charlas y asados compartidos durante estos años.

Al Dr. Armando J. Parodi, por sus consejos durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Luis Ielpi, Consejero de Estudios, por su generoso apoyo.

A los Dres. Luis Quesada, Ricardo Wolosiuk, Juana Tandecarz e Israel Algranati, por sus consejos y ayuda en muchas ocasiones.

A Marta Bravo, Ami Curto, Susana Raffo, y Alejandra Raimondi, por brindarme todo tipo de asistencia técnica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnicas, por las becas de Iniciación y Doctoral, que me permitieron realizar la presente Tesis.

Quiero también expresar mi más sincero agradecimiento al personal del Instituto, especialmente a Margarita Mazzardi y Francisco Irusta, por su eficiente colaboración técnica a lo largo de todos estos años.

A Norberto Iusem, por un E-mail.

Abreviaturas

Fosfodiester <i>N</i> – Acetilglucosaminidasa:	α – <i>N</i> – acetilglucosamina – 1 – fosfodiester <i>N</i> – acetilglucosaminidasa.
FPLC:	Fast Protein Liquid Chromatography
GlcNAc – fosfotransferasa:	UDP – <i>N</i> – acetilglucosamina : glicoproteína <i>N</i> – acetilglucosamina – 1 – fosfotransferasa.
K_m ap:	K_m aparente
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
V_0 :	Volumen de exclusión
V_e :	Volumen de elución.

Indice

	<i>Página</i>
Resumen	1
Introducción	
Purificación de la GlcNAc-fosfotransferasa de <i>A. castellanii</i>	5
Identificación de actividad GlcNAc-fosfotransferasa en <i>C. capitata</i>	9
Procedimientos Experimentales	
Materiales	12
Preparación de GlcNAc-fosfotransferasa	12
Producción de anticuerpos contra la GlcNAc-fosfotransferasa	14
Inmunoprecipitación de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa	14
Electrotransferencia y reacción con el anticuerpo	15
Preparación de [$\beta^{32}\text{P}$]UDP-GlcNAc	16
Medición de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa	16
Fosforilación de aceptores endógenos de <i>C. capitata</i>	17
Tratamiento con fosfatasa alcalina	17
Hidrólisis ácida	17
Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	17
Cromatografías y electroforesis en papel	18
Determinación de proteínas	18
Marcación de proteínas con [^{125}I]	18
Cría de <i>C. capitata</i>	18
Preparación de membranas microsomales de <i>C. capitata</i>	19

Purificación de la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii*

Resultados

Purificación de GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii* 20

Pureza de la GlcNAc-fosfotransferasa y determinación del peso molecular 27

Producción de anticuerpos policlonales contra la GlcNAc-fosfotransferasa 28

Algunas de las proteínas reconocidas por los anticuerpos están relacionadas con la actividad GlcNAc-fosfotransferasa 30

Discusión 38

Identificación de actividad GlcNAc-fosfotransferasa en *C. capitata*

Resultados

Detección de GlcNAc-fosfotransferasa en *C. capitata* 43

La GlcNAc-fosfotransferasa es una enzima asociada a membranas 50

La uteroferrina sirve como aceptor de UDP-*N*-acetilglucosamina-1-fosfato 50

Fosforilación *in vitro* de glicoproteínas de *C. capitata* 52

Discusión 55

Referencias 58

Resumen

Se conocen varios sistemas de dirección de proteínas desde su lugar de síntesis hacia donde cumplen su función. Entre los mejor estudiados está uno de los que permite que las enzimas lisosomales neosintetizadas se dirijan a los lisosomas de las células de mamíferos.

Tal como se lo conoce, este sistema de transporte se basa en cuatro componentes: a) un dominio específico común en todas las enzimas lisosomales que lo emplean, b) la enzima clave UDP -*N* - Acetilglucosamina : Enzima Lisosomal *N* - Acetilglucosamina - 1 - Fosfotransferasa (GlcNAc - fosfotransferasa), que reconoce específicamente este dominio común y transfiere GlcNAc-1-fosfato a determinadas manosas de los oligosacáridos de alta manosa de los aceptores, c) una α -*N*-Acetilglucosamina-1- Fosfodiester *N* - Acetilglucosaminidasa, que hidroliza la *N* - acetilglucosamina generando el marcador manosa 6-fosfato, y d) dos receptores de manosa 6-fosfato que median el transporte de las enzimas lisosomales hasta los lisosomas.

La enzima clave es la GlcNAc-fosfotransferasa porque reconoce las enzimas lisosomales de entre otras proteínas no lisosomales que contienen oligosacáridos similares de alta manosa. La enzima tiene un sitio catalítico que interacciona con la manosa a la que transferirá la *N*-acetilglucosamina-1-fosfato, y otro sitio que reconoce específicamente un dominio común a todas las enzimas lisosomales que emplean la vía de la manosa 6-fosfato para su transporte a los lisosomas.

La GlcNAc-fosfotransferasa de mamífero mejor caracterizada es la de hígado de rata, una enzima anclada a membrana localizada en el aparato de Golgi. Cataliza la transferencia de *N* - acetilglucosamina - 1 - fosfato desde UDP - *N* - acetilglucosamina a manosas alfa-sustituídas en el carbono anomérico.

Esta GlcNAc-fosfotransferasa muestra una gran afinidad por enzimas lisosomales, con K_m aparentes menores a 20 μ M y eficiencias como aceptores (V_{max}/K_m) mayores de 160 para estas proteínas, contra K_m del orden milimolar y eficiencias cercanas a 1 para glicoproteínas no lisosomales con oligosacáridos de alta manosa similares.

Hasta el momento la enzima se describió con algún detalle en mamíferos y en la ameba *Acanthamoeba castellanii*, aunque en esta última no se han detectado los demás componentes del sistema de transporte a lisosomas. También se describió una GlcNAc-fosfotransferasa en *Dictyostelium discoideum*, pero esta, a diferencia de las anteriores, no

tiene la capacidad de discriminar entre enzimas lisosomales de mamífero y otras glicoproteínas.

Purificación de la GlcNAc fosfotransferasa de A. castellanii

La GlcNAc-fosfotransferasa fue purificada parcialmente a partir de membranas de Golgi de hígado de rata unas 750 veces, y la de linfoblastos humanos fue purificada 3.800 veces. Hasta la fecha no ha sido posible lograr preparaciones de mayor pureza de la enzima de mamíferos, en parte debido a la dificultad en obtener cantidades suficientemente grandes de estos materiales de partida, y también por su relativamente baja actividad específica.

En la *A. castellanii* la GlcNAc-fosfotransferasa tiene una actividad específica unas cien veces mayor que en mamíferos y presenta características cinéticas y de especificidad de sustrato similares. Además es un microorganismo fácilmente cultivable en grandes cantidades, por lo que aparece *a priori* como la fuente ideal para encarar la purificación de esta enzima a homogeneidad.

En el presente trabajo se describe la purificación 65.000 veces de la GlcNAc-fosfotransferasa presente en membranas de la ameba *A. castellanii*. La enzima se solubilizó de las membranas con los detergentes Lubrol PX y desoxicolato de sodio, y se purificó mediante cromatografías con las lectinas Concanavalina A y de *Triticum vulgare*, el intercambiador iónico Q-Sepharosa, y cromatografía de exclusión molecular en Superosa 12.

Las proteínas eluidas de la columna de Superosa 12 se analizaron por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida y se observaron solo dos bandas con un perfil de intensidades coincidente con el de la actividad enzimática. Estas proteínas tienen pesos moleculares relativos de 71 kDa y 82 kDa. El peso molecular aparente de la GlcNAc-fosfotransferasa nativa estimado por filtración por gel está entre algo más de 1.000 kDa y 130 kDa según la preparación, apareciendo la mayoría de las veces como de 570 kDa. Parece probable que las proteínas de 71 y 82 kDa estén unidas en estado nativo, sea como subunidades de una forma activa mayor, o como agregados menos definidos.

Para confirmar la identificación de la GlcNAc-fosfotransferasa se obtuvieron anticuerpos contra esta enzima. Para ello se inmunizaron ratones con preparaciones de GlcNAc-fosfotransferasa purificada más de 10.000 veces, produciéndose anticuerpos policlonales específicos para proteínas de *A. castellanii* y con alta afinidad por la enzima.

Tanto preparaciones crudas como altamente purificadas de GlcNAc-fosfotransferasa se cromatografiaron por columnas de exclusión molecular, en las que la actividad presentó volúmenes de elución variables que dependieron de la preparación. Las proteínas de las fracciones eluidas se separaron por electroforesis y se efectuaron inmunoblots que se revelaron con el antisuero de ratón. Analizando las proteínas que reaccionaron con el anticuerpo y cuyo perfil de intensidades se correspondió con el de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa, se confirmó que las dos proteínas de 71 y 82 kDa son probablemente subunidades o fragmentos de subunidades de la GlcNAc-fosfotransferasa.

Identificación de una actividad GlcNAc-fosfotransferasa en pupas de la mosca mediterránea de la fruta Ceratitis capitata.

Está bien establecida la existencia de lisosomas en los insectos, pero hasta ahora no se había descrito nada sobre el transporte de hidrolasas ácidas hacia esas organelas, ni la presencia de enzimas de la vía metabólica de la manosa 6-fosfato. Cabe la posibilidad de que se utilice un sistema similar al que hasta ahora solo había sido encontrado en los mamíferos.

Como parte del trabajo para esta tesis, se caracterizó por primera vez una actividad GlcNAc-fosfotransferasa en el díptero *C. capitata*. Para este estudio se usó un sistema de enzayo *in vitro* en la búsqueda de indicios sobre el sistema de transporte de enzimas lisosomales a los lisosomas de insectos.

Se ha establecido la presencia de una actividad GlcNAc-fosfotransferasa asociada a membranas en pupas de seis días de la mosca mediterránea de la fruta *C. capitata*, capaz de transferir GlcNAc-1-fosfato desde UDP-*N*-acetilglucosamina a α -metilmanósido. Se demostró también que el producto es *N*-acetilglucosamina-(1,6)-fosfato-(α 1-metilmanósido), similar al descrito para otras GlcNAc-fosfotransferasas con este sustrato.

Se encontró además que las propiedades catalíticas de la GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata* con estos sustratos, son similares a las de aquella que se encuentra en células de mamíferos, a la de la ameba *A. castellanii* y a la de *D. discoideum*. La enzima presentó *in vitro* un pH óptimo de 7,0, una temperatura óptima de incubación de 30 °C, y requirió de Mn^{2+} o Mg^{2+} para su actividad.

La enzima transfiere también *N*-acetilglucosamina-1-fosfato a manosas presentes en oligosacáridos del tipo de alta manosa, tanto de glicoproteínas endógenas como de

uteroferrina, una enzima lisosomal de mamíferos. Por esta última presentó un K_m ap de 63 μM , similar al de la GlcNAc-fosfotransferasa de mamíferos. Al igual que esta última, se mostró capaz de discriminar entre enzimas lisosomales y las que no lo son, pero que poseen oligosacáridos similares de alta manosa.

Introducción

Introducción

Un gran número de proteínas de células eucariontes una vez sintetizadas son exportadas a compartimientos extracitoplasmáticos. Muchas, como la mayoría de las enzimas lisosomales, las proteínas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, varias proteínas de la membrana plasmática y las proteínas secretadas, se sintetizan en polisomas unidos a membranas del retículo endoplásmico y entonces se translocan hacia la luz de dicho compartimiento (1). Entre los varios sistemas de señales mediante los cuales estas proteínas alcanzan su ubicación definitiva, el del transporte de enzimas lisosomales hacia los lisosomas es uno de los más estudiados.

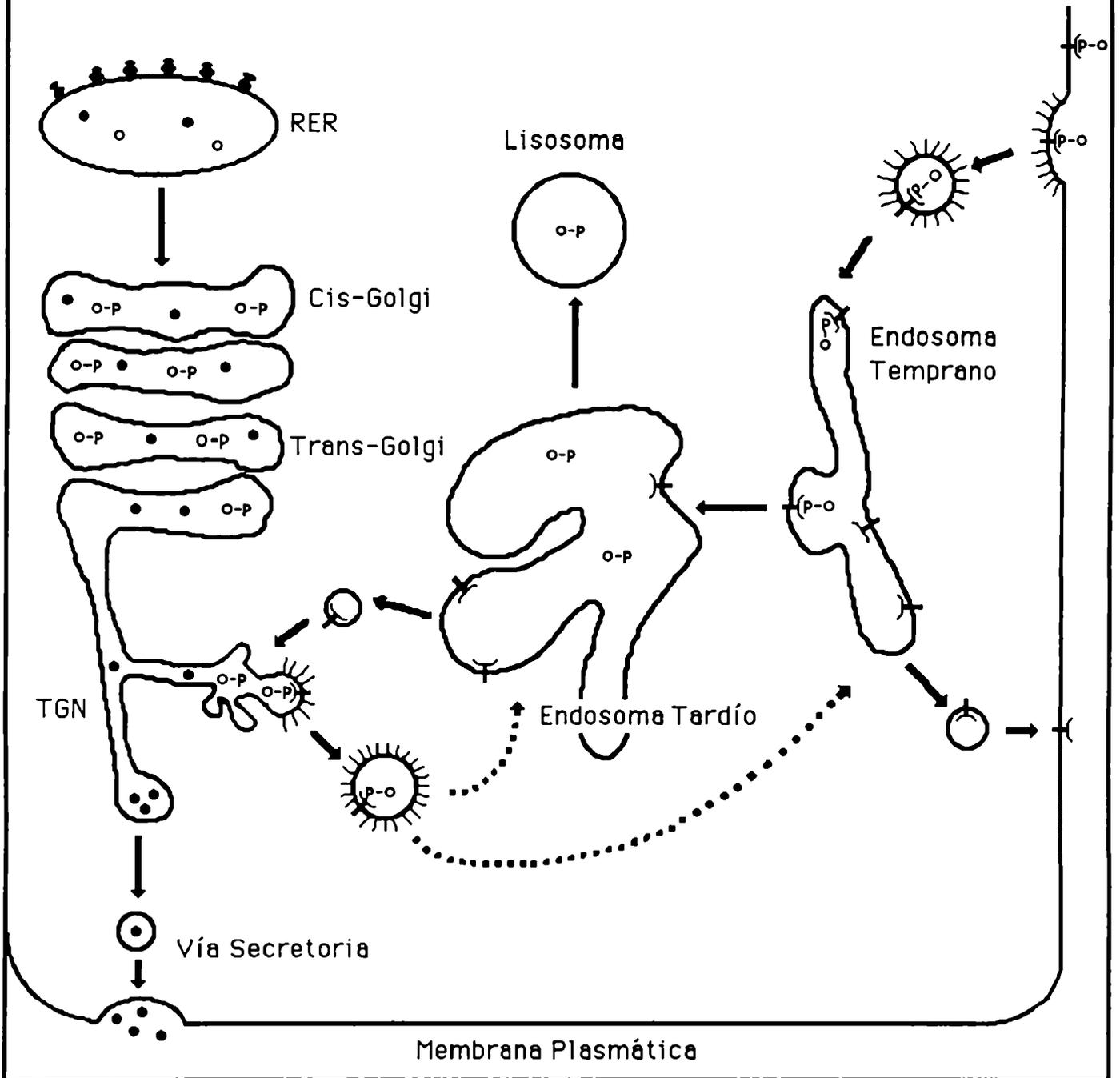
En células de mamíferos las enzimas lisosomales adquieren durante su tránsito por el aparato de Golgi un marcador de fosfomanosa, reconocido específicamente por los receptores encargados de transportarlas hacia los lisosomas (2, 3, 4). Aquí el sistema de transporte se basa en cuatro componentes: a) un dominio específico común en todas las enzimas lisosomales transportadas por este mecanismo (5), b) la enzima clave UDP – *N* – Acetilglucosamina : Enzima Lisosomal *N* – Acetilglucosamina – 1 – Fosfotransferasa (GlcNAc-fosfotransferasa, E. C. 2.7.8.17), que reconoce específicamente este dominio común y transfiere GlcNAc 1-fosfato a determinadas manosas de los oligosacáridos de alta manosa de los aceptores, c) una α -*N*-Acetilglucosamina-1-Fosfodiester *N*-Acetilglucosaminidasa (Fosfodiester *N*-acetilglucosaminidasa, E. C. 3.1.4.45), que hidroliza la *N*-acetilglucosamina generando el marcador manosa 6-fosfato, (6, 7) y d) dos receptores de manosa 6-fosfato que median el transporte de las enzimas lisosomales hasta los lisosomas (8) (Figura 1).

Figura 1 (En la página siguiente): Modelo para el tráfico de las enzimas lisosomales hacia los lisosomas. Las enzimas lisosomales (EL, ○) y las proteínas secretorias (●) se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y se transportan al retículo de Golgi, donde las EL adquieren el marcador fosfomanosa (P). La mayoría de las EL se unen a receptores de fosfomanosa (⤵) en la región trans Golgi (TGN) y se translocan a endosomas, donde se liberan debido a la acidificación de la organela. Las EL se dirigen a los lisosomas, y los receptores se reciclan hacia el Golgi o la membrana plasmática. (Adaptado de Ref. 2).

Transporte de Enzimas Lisosomales Hacia los Lisosomas

Vía Endocítica

Vía Biosintética



La GlcNAc-fosfotransferasa de hígado de rata es una enzima de membrana localizada en el aparato de Golgi (9). Cataliza la transferencia de *N*-acetilglucosamina-1-fosfato desde UDP-*N*-acetilglucosamina a manosas alfa-sustituídas en el carbono anomérico:



Esta GlcNAc-fosfotransferasa muestra una gran afinidad por enzimas lisosomales, con K_m aparentes menores a $20 \mu\text{M}$ y eficiencias como aceptores (V_{max}/K_m) mayores de 160 para estas proteínas, contra K_m del orden milimolar y eficiencias cercanas a 1 para glicoproteínas no lisosomales con oligosacáridos de alta manosa similares (10). También es capaz de utilizar como aceptores oligosacáridos de alta manosa o α -metilmanósido, aunque con K_m 10^3 a 10^4 veces mayores que para las enzimas lisosomales.

Para explicar esto se propuso (5) que la GlcNAc-fosfotransferasa tiene un sitio catalítico que interacciona con la manosa a la que transferirá la *N*-acetilglucosamina-1-fosfato, y otro sitio que reconoce específicamente el epítipo común a todas las enzimas lisosomales que emplean la vía de la manosa 6-fosfato para su transporte a los lisosomas (Figura 2).

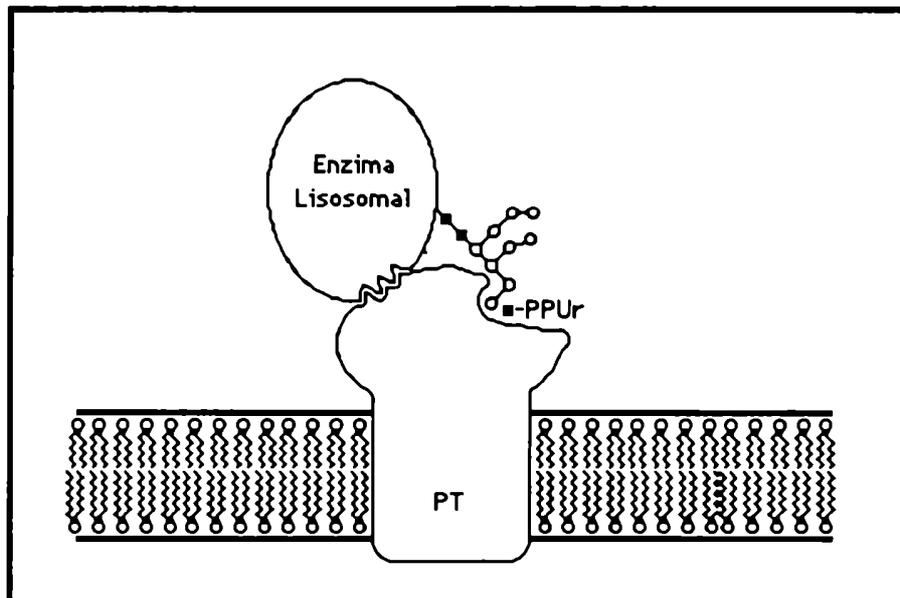


Figura 2: Modelo para el reconocimiento de las enzimas lisosomales por la GlcNAc-fosfotransferasa. La GlcNAc-fosfotransferasa reconoce un dominio proteico (~) en las enzimas lisosomales (EL) y otro catalítico, que reconoce las manosas (o) de las EL y el UDP-GlcNAc (■-PPUr). (Adaptado de Ref. 2).

Aminoácidos de diferentes regiones de la proteína se juntan en una estructura tridimensional para generar este dominio. No se ha identificado una secuencia común a las

enzimas lisosomales, pero determinadas lisinas tienen un papel esencial, si bien se necesitan otras regiones de la molécula para producir la interacción de alta afinidad (11).

El fosfodiéster resultante de la acción de la GlcNAc-fosfotransferasa es modificado por la acción de la fosfodiéster *N*-acetilglucosaminidasa, que hidroliza la *N*-acetilglucosamina (Figura 3).

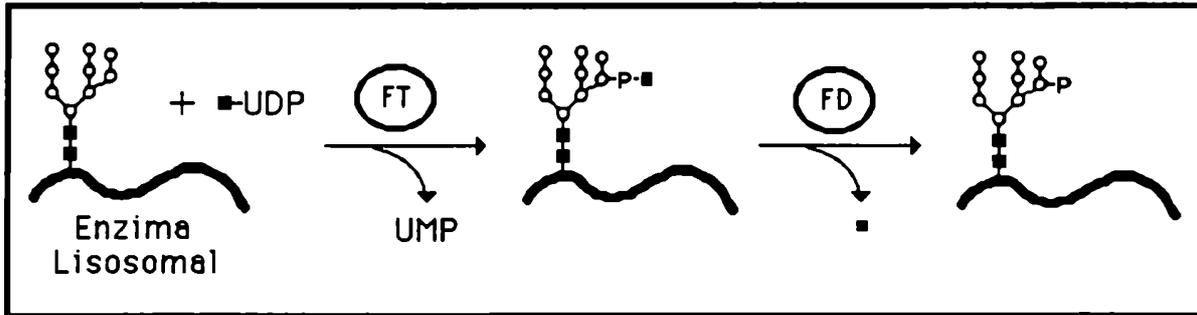


Figura 3: Mecanismo propuesto para la fosforilación de los oligosacáridos de alta manosa de las enzimas lisosomales. La GlcNAc-fosfotransferasa (FT) transfiere GlcNAc-fosfato (P-■) a determinadas manosas (○) de las enzimas lisosomales (—), y la fosfodiéster *N*-acetilglucosaminidasa (FD) hidroliza la *N*-acetilglucosamina (■), generándose el marcador manosa 6-fosfato.

En las membranas del retículo de Golgi hay receptores que reconocen la fosfomanosa. Se conocen dos tipos: uno de 215 kDa (12, 13) y otro de 46 kDa (14). Una vez unidos a las enzimas lisosomales los receptores se engloban en vesículas recubiertas de clatrina que los conducen hasta un compartimento ácido precursor de los lisosomas, donde se disocian de los ligandos (15, 16); los receptores se reciclan hacia el Golgi donde se unen a nuevas moléculas de enzimas lisosomales. En la mayoría de las células una pequeña proporción de las enzimas lisosomales escapa a los receptores del Golgi y es secretada. Parte de estas enzimas son recapturadas por receptores de manosa 6-fosfato presentes en la superficie celular y conducidas hacia los lisosomas (17).

La enzima GlcNAc-fosfotransferasa hasta el momento se describió con algún detalle en mamíferos (18, 19, 20) y en la ameba *Acanthamoeba castellanii* (21), aunque en esta última no se han detectado los demás componentes del sistema de transporte a lisosomas. También se describió una GlcNAc-fosfotransferasa en *Dictyostelium discoideum*, pero esta, a diferencia de las anteriores, no tiene la capacidad de discriminar entre glicoproteínas de mamífero que son enzimas lisosomales y las que no lo son, aunque posean oligosacáridos semejantes a las anteriores, como lo reflejan los K_m aproximadamente

iguales para ambas (21). No se ha detectado esta actividad enzimática en *Trypanosoma cruzi* (22).

En plantas y en levaduras las hidrolasas ácidas están en las vacuolas, que son las organelas subcelulares equivalentes morfológicos y funcionales a los lisosomas de mamíferos. Las evidencias indican que en estos casos la manosa 6-fosfato no es la señal utilizada para dirigir las hidrolasas ácidas hacia las vacuolas (23), sino que la misma estaría codificada en el extremo amino terminal de las proteínas allí destinadas (24, 25, 26).

Purificación de la GlcNAc fosfotransferasa de A. castellanii

La enzima clave en el tráfico hacia los lisosomas por la vía de la manosa 6-fosfato es la GlcNAc-fosfotransferasa, porque es capaz de discriminar entre las enzimas lisosomales y otras glicoproteínas no lisosomales, incluso las que contienen oligosacáridos similares de alta manosa, y marcar las primeras selectivamente para ser transportadas a los lisosomas.

La deficiencia de esta enzima en humanos ocasiona dos enfermedades severas caracterizadas por una actividad disminuida de varias enzimas lisosomales en el tejido conectivo y niveles muy elevados en los fluidos corporales: la enfermedad de células I o mucopolidosis II, en la que los fibroblastos de quienes la padecen son marcadamente deficientes en GlcNAc-fosfotransferasa (27), y la pseudo-polidostrofia Hurler o mucopolidosis III (28), en la que la enzima está presente pero tiene alterado el sitio de reconocimiento específico para las enzimas lisosomales.

Si se dispusiera de la enzima humana purificada se podría encarar el clonado del gen que la codifica. Esto posibilitaría el desarrollo de técnicas para la detección temprana de los casos de deficiencia en la GlcNAc-fosfotransferasa, antes de que se manifiesten los síntomas de esta enfermedad siempre mortal, y se podría estudiar su expresión y regulación.

También se haría posible la obtención de estructuras tridimensionales de la GlcNAc-fosfotransferasa, sola y unida a alguna enzima lisosomal, y comprender mejor los requisitos estructurales para el reconocimiento específico de la enzima con sus sustratos, y determinar las mutaciones en ambos que podrían afectarlo.

La GlcNAc-fosfotransferasa fué descrita por primera vez en 1981 por Reitman y Kornfeld (18) y fue purificada parcialmente a partir de membranas del Golgi de hígado de rata unas 750 veces por Reitman y col. (29). La GlcNAc-fosfotransferasa de linfoblastos humanos fue purificada 3.800 veces por Zhao y col. (20). Hasta la fecha no ha sido posible lograr preparaciones de mayor pureza de la enzima de mamíferos, en parte debido a la dificultad en obtener cantidades suficientemente grandes de estos materiales de partida, y también por la relativamente baja actividad específica, que es de $0,38 \text{ U mg}^{-1}$ en membranas solubilizadas de fibroblastos humanos (28) y de $0,52 \text{ U mg}^{-1}$ en microsomas de hígado de rata (27).

Debido a lo extremadamente difícil de la purificación de la enzima de mamíferos se eligió hacerlo con la de ameba del suelo *A. castellanii*, considerando la posibilidad de que una vez hecho esto sea posible clonarla, secuenciarla total o parcialmente, y obtener anticuerpos contra la enzima o algunos de sus polipéptidos, y que mediante esto se pueda llegar a lo mismo con la enzima humana.

En la *A. castellanii* la GlcNAc-fosfotransferasa tiene una actividad específica unas cien veces mayor que en los mamíferos y presenta características cinéticas y de especificidad de sustrato similares (21), aunque no se han encontrado los otros componentes del sistema de transporte a lisosomas presentes en mamíferos. Además es un microorganismo fácilmente cultivable en grandes cantidades, por lo que aparece *a priori* como la fuente ideal para encarar la purificación de esta enzima a homogeneidad.

Recientemente fué publicado un trabajo de Ketcham y Kronfeld (30), en el que se informa la purificación de la GlcNAc – fosfotransferasa de *A. castellanii* unas 55.000 veces, obteniendo una preparación que no es homogénea y donde la actividad de la enzima no parece corresponderse con ninguna de las proteínas mayoritarias.

Como parte del trabajo de tesis se procedió a desarrollar la técnica para obtener la GlcNAc – fosfotransferasa de *A. castellanii* en forma altamente purificada, y se identificaron dos polipéptidos como probablemente pertenecientes a esta enzima. También se describe la producción de anticuerpos contra la GlcNAc-fosfotransferasa de la ameba, y su utilización para confirmar la identidad de la enzima en estas preparaciones.

Identificación de una actividad GlcNAc – fosfotransferasa en pupas de la mosca mediterránea de la fruta Ceratitis capitata.

Nada se conoce acerca del mecanismo de transporte de enzimas lisosomales en los artrópodos. Se ha informado de la presencia fosfato hidrolizable por endo-*N*-acetilglucosaminidasa H en la vitelogenina de *Manduca sexta* marcada con [³²P] (31), y se ha encontrado manosa 6-fosfato en hidrolizados de vitelina de *Rhodnius prolixus* (32). Sin embargo, no se ha investigado la presencia de las enzimas de la vía de la manosa 6-fosfato.

Como parte del trabajo de tesis se estableció por primera vez que en un insecto, pupas de la mosca mediterránea de la fruta *C. capitata*, hay una actividad GlcNAc-fosfotransferasa que transfiere *N* – acetilglucosamina – 1 –fosfato desde UDP – *N* – acetilglucosamina a manosas en glicoproteínas con oligosacáridos de alta manosa, y se describieron algunas propiedades de la enzima.

Procedimientos Experimentales

Procedimientos Experimentales

Materiales

La Concanavalina A-Sepharosa, la Q-Sepharose Fast Flow, las columnas HR 16-10, Superosa 12, Superosa 6, el sistema de cromatografía FPLC y los estándares de peso molecular para filtración por gel son de Pharmacia (Uppsala, Suecia). El $^{125}\text{I}\text{Na}$ (17,4 Ci/mg), el UDP-[^3H]GlcNAc (5-25 Ci/mmol), UDP-[^{14}C]GlcNAc (> 200 mCi/mmol) y el [γ - ^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol) son de New England Nuclear (Boston, MA, EEUU). Los anticuerpos de conejo anti Ig G + Ig M de ratón (H+L), simple y acoplado a peroxidasa, son de Jackson (West Grove, PA, EEUU). La lectina de germen de trigo (*Triticum vulgare*) unida a Sepharosa 6MB, el QAE-Sephadex, los detergentes Lubrol PX y Triton X-114, las enzimas fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* (Tipo III-5) y proteasa de *Streptomyces griseus* (Tipo XIV), el Coomassie Blue R-250, el Pounceau S, el 4-cloro-1-naftol, la albúmina sérica bovina (Fracción V), los inhibidores de proteasas leupeptina, antipaina, pepstatina y E-64, el *Staphylococcus aureus*-proteína A, los adyudantes completo e incompleto de Freund y los estándares de peso molecular son de Sigma (St. Louis, MO, EEUU). El Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3 α -6 α -difencilglicouril) de Pierce (Rockford, IL, EEUU). Las membranas de diálisis (8 kDa de corte) son de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EEUU). Las membranas de nitrocelulosa (BA 85, 0,45 μm) son de Schleicher & Schüll (Dassel, Alemania). Todos los demás reactivos son de grado analítico.

Preparación de GlcNAc-fosfotransferasa

La *A. castellanii* se cultiva en medio líquido como lo describió Korn (33) en un medio que contiene 15 g/l glucosa, 15 g/l Proteosa Peptona (Difco), 200 μM L-metionina, 3 mM KH_2PO_4 , 100 μM MgSO_4 , 10 μM CaCl_2 , 1 μM FeCl_3 , 1 $\mu\text{g/ml}$ hidrocloreuro de tiamina, 200 ng/ml biotina y 20 ng/ml vitamina B₁₂. Los cultivos se efectúan en erlenmeyers de 2 litros de capacidad con un litro de medio y se incuban a 28 °C con agitación circular a 200 rpm. Se cosechan en fase exponencial a una densidad de 2 a 8 x 10⁶ células ml⁻¹ y se lavan con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,0. Los pellets se conservan congelados a - 70 °C hasta su utilización. Todas las operaciones se realizan a 0 - 4 °C salvo cuando se indica otra cosa.

Paso 1: Homogenización. Las amebas congeladas se descongelan y se resuspenden por sonicación (dos pulsos de 30 seg a 100 W con un Braun Sonic 1510) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,0 conteniendo 1 mM PMSF a 30 - 40 mg ml⁻¹ de proteínas.

Paso 2: Centrifugación a 12.000 xg. Los núcleos y fragmentos grandes de membrana se remueven por centrifugación a 12.000 xg durante 15 min. Se separa el sobrenadante y el pellet se resuspende, sonica y centrifuga dos veces más como antes, pero con la mitad del volumen previo de buffer. Finalmente se reúnen los tres sobrenadantes.

Paso 3: Solubilización de membranas. Las membranas se obtienen centrifugando el sobrenadante de 12.000 xg a 135.000 xg durante 40 min. Los pellets se resuspenden por sonicación a 6 - 8 mg ml⁻¹ de proteínas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con 2% Lubrol PX, 0,5% desoxicolato de sodio y 1 mM PMSF, y se centrifuga 95.000 xg durante 30 min para separar las proteínas insolubles. Los sobrenadantes se separan y los pellets se resuspenden, sonican y centrifugan como antes. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se reúnen. Cuando se indica se utiliza para la solubilización de las proteínas de membrana un buffer conteniendo Tris-HCl 50 mM con 2% Triton X-114, pH 7,5.

Paso 4: Cromatografía en Concanavalina A-Sepharosa. Se equilibra una columna con 25 ml de Concanavalina A-Sepharosa en buffer 50 mM Tris-HCl pH 7,5 con 150 mM NaCl, 0,5 % Lubrol PX, 0,2 % desoxicolato de sodio, 1 mM MgCl₂ y 1 mM CaCl₂, y se pasan las membranas sulubilizadas a 0,2 cm min⁻¹. Se lava la columna con el buffer anterior y se eluye con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 con 0,5 % Lubrol PX, 0,2 % desoxicolato de sodio y 0,5 M α-metilmanósido. Las fracciones con mayor actividad se reúnen y se dializan durante 14 horas contra 1 l de buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,8 con 0,2 % Lubrol PX, 0,05 % desoxicolato de sodio y 10 % glicerol utilizando una membrana de 8.000 daltons de corte.

Paso 5: Cromatografía de intercambio iónico. El material eluído de la Concanavalina A-Sepharosa se cromatografía a temperatura ambiente por una columna de 16 x 100 mm rellena con el intercambiador aniónico fuerte Q-Sepharosa fast flow, en un sistema FPLC. La columna se equilibra con buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,8 con 0,2 % Lubrol PX y 0,05 % desoxicolato de sodio. Se eluye con un gradiente lineal de 0 a 0,5 M NaCl en el mismo buffer. Se reúnen las fracciones de mayor actividad y se llevan a 2 mM PMSF y 20 µg ml⁻¹ de leupeptina, antipaina, pepstatina y E-64.

Paso 6: Cromatografía de afinidad. Se usa la lectina de germen de trigo (*T. vulgaris*) unida a Sepharosa 6MB. Una columna con 1,2 ml de lectina acopiada a Sepharosa se equilibra con buffer 25 mM Tris-HCl pH 7,8 con 0,2 % Lubrol PX, 0,05 % desoxicolato de sodio y 100 mM NaCl. Se pasa la muestra tres veces, se lava con el buffer anterior y se eluye con el mismo buffer más 100 mM GlcNAc. Las fracciones eluidas con actividad GlcNAc-fosfotransferasa se reúnen y le llevan a 2 mM PMSF y 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de leupeptina, antipaina, pepstatina y E-64.

Paso 7: Cromatografía de filtración por gel. Una alícuota de 0,5 ml proveniente del paso anterior se cromatografía a temperatura ambiente por una columna Superosa 12 (10 x 300 mm) equilibrada y eluida con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con 0,02% Lubrol PX, 0,01% desoxicolato de sodio y 100 mM NaCl. Cuando se cromatografían membranas solubilizadas la columna se equilibra y eluye con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con 0,5% Lubrol PX, 0,2% desoxicolato de sodio y 100 mM NaCl. Cuando se cromatografían membranas solubilizadas con Triton X-114, las muestras se diluyen 1:4 con el buffer de equilibrio anterior previamente a sembrarlas en la columna.

Produccion de Anticuerpos Contra la GlcNAc-fosfotransferasa

Los anticuerpos contra proteínas de una preparación purificada de GlcNAc-fosfotransferasa se preparan como sigue: 100 μl (1,5 μg de proteínas) provenientes del paso 6 de la purificación se emulsifican con un volumen igual de adyudante de Freund completo y se inyectan intraperitonealmente en ratones Balb/c machos de tres meses de edad. Se hacen dos inmunizaciones secundarias en forma similar, con adyudante incompleto, a los 15 y 30 días. Se toma sangre del plexo retroorbital para cuantificar el título de anticuerpos por dot-blot usando proteínas solubilizadas de membrana de *A. castellanii* como antígeno. Siete días después del último refuerzo los ratones se sangran a blanco por punción cardíaca y se separa el suero, que se conserva a -20 °C.

Inmunoprecipitacion de la Actividad GlcNAc-fosfotransferasa

Todas las incubaciones son a 4 °C con agitación periódica y las centrifugaciones a 12.000 xg durante 5 min a esa temperatura. La fuente de GlcNAc-fosfotransferasa fué el material eluido de la columna de Q-Sepharosa (Paso 5 de la purificación). Con el objeto de eliminar el efecto del anticuerpo secundario y del *S. aureus* - proteína A sobre la actividad GlcNAc-fosfotransferasa, el eluido de Q-Sepharosa fué preincubado con 2 μl cada 100 μl de antisuero de conejo anti-ratón –el anticuerpo secundario– durante 30 min, y luego 30 min más con 20 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ de *S. aureus* - proteína A previamente lavada con buffer Tris-HCl

50 mM pH 8,0 con NaCl 150 mM (TBS). La suspensión se centrifuga y el sobrenadante se usa como fuente de GlcNAc-fosfotransferasa en los ensayos subsiguientes.

Cinco μl del eluido de Q-Sepharose preadsorbido se incuban durante 1 hora con 10 μl de diluciones de suero inmune de ratón en albúmina sérica bovina a 100 mg ml^{-1} . Se agregan luego 5 μl de suero de conejo anti-ratón y se incuba por 1 hora más. Finalmente, se agregan 25 μl de *S. aureus* - proteína A lavada y se incuba 1 hora. Después de la centrifugación se mide la actividad GlcNAc-fosfotransferasa en el sobrenadante. Paralelamente se hacen controles con el suero preinmune en idénticas condiciones.

Electrotransferencia y Reaccion con el Anticuerpo

El procedimiento está adaptado del descrito por Timmons y Dunbar (34). Después de la electroforesis, el gel se lava dos veces con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) y se transfieren las proteínas en el mismo buffer a una membrana de nitrocelulosa en un aparato Transphor TE 50 (Hoefer Scientific) a 80 V durante 14 h. Las membranas se tiñen luego con Ponceau S (35) para ver los estándares de peso molecular.

La membrana se destiñe y se bloquean los sitios inespecíficos simultáneamente con TBS más 2% glicina y 3% leche en polvo descremada (TBS-GL) durante 1 h. Se trata luego con el suero inmune diluido 1:500 en TBS-GL durante 1 h y se lava sucesivamente dos veces durante 15 min con TBS, 15 min con TBS (500 mM NaCl) y 15 min con TBS.

Para detectar los anticuerpos unidos a la membrana se usan dos métodos:

a) Detección enzimática: La membrana se incuba 1 h con una dilución 1:500 de suero de conejo anti-ratón acoplado a peroxidasa como anticuerpo secundario; se lava entonces tres veces durante 10 min con TBS, 5 min con Tween 20 0,1% en TBS, y dos veces durante 10 min. en TBS. Los anticuerpos marcados con peroxidasa unidos a la membrana se detectan incubándola con 4-cloro-1-naftol 2,5 mg ml^{-1} en metanol frío mezclado en una relación 1:4 (v/v) con imidazol 12 mM, H_2O_2 1,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ en TBS (36).

b) Detección radioactiva: La incubación con el anticuerpo secundario y los lavados subsiguientes son similares a los descritos para el método anterior, pero los anticuerpos de conejo anti-ratón no están acoplados a peroxidasa. Las membranas se incuban luego con [^{125}I] proteína A (10⁵ cpm ml^{-1}) en TBS-GL y después se lavan como en a), se secan a temperatura ambiente y se exponen como los geles de poliacrilamida.

Preparación de [$\beta^{32}P$]UDP-GlcNAc

El [$\beta^{32}P$]UDP-GlcNAc (1,2 Ci/mmol) se prepara en el laboratorio según el método descrito por Lang y Kornfeld (37) y se purifica por cromatografía en papel Whatman 3 MM utilizando etanol:ácido acético:acetato de amonio 1 M (75:26:4) (v/v) (38) como eluyente.

Medición de la actividad GlcNAc- Fosfotransferasa

Se utiliza el método descrito por Reitman y col. (29). La mezcla de incubación contiene buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,0, α -metilmanósido 200 mM como aceptor, 5×10^5 cpm de [β^{32}] UDP-GlcNAc y UDP-GlcNAc no marcado hasta 100 μ M total, ATP 2 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 10 mM, DTT 250 mM, GlcNAc 50 mM y albúmina sérica bovina 2 mg ml⁻¹ en un volumen final de 50 μ l. Para medir la actividad en las preparaciones de GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii* que no tienen detergente (Pasos 1 y 2 del esquema de purificación) y en membranas microsomales de *C. capitata*, se agrega además 0,4% de Lubrol PX o Triton X-100 respectivamente, y 0,1% de desoxicolato de sodio en ambos casos.

Si no se especifican otras condiciones la incubación se efectúa a 37 °C durante 30 min para los experimentos con la enzima de *A. castellanii*, o a 30 °C durante 1 h para la *C. capitata*, y se detiene con 1 ml de EDTA-NaOH 5 mM pH 7,8. La mezcla de reacción se pasa por una columna que contiene 1 ml de QAE-Sepharosa 4B previamente equilibrada con Tris 2 mM pH 8,0. El producto de la reacción se eluye con Tris 2 mM NaCl 30 mM pH 8,0 y se mide con 12 ml de mezcla centelleadora de Bray (39) en un contador de centelleo Rackbeta 1214 (Pharmacia).

Cuando se emplea uteroferrina como sustrato, la mezcla de incubación es la misma excepto que el α -metilmanósido se reemplaza por uteroferrina 100 μ M, y la actividad específica del UDP-GlcNAc se incrementa a 140 μ M con 5×10^6 cpm de [$\beta^{32}P$]UDP-GlcNAc. Después de la incubación y digestión del aceptor con proteasa, los glicopéptidos con oligosacáridos de alta manosa se aíslan por cromatografía en columnas de 0,5 ml de Concanavalina A-Sepharosa como lo describieron Couso y col. (40).

Una unidad se define como la cantidad de enzima capaz de transferir 1 nmol de GlcNAc-1-fosfato a α -metilmanósido 200 μ M en 1 hora a 37 °C.

Fosforilación de aceptores endógenos de C. capitata

En la mezcla de incubación se resuspenden 2,4 mg de proteínas de membrana en buffer Tris-HCl pH 7,5, con 30×10^6 cpm de [$\beta^{32}\text{P}$]UDP-GlcNAc (90 μM), MgCl_2 10 mM, MnCl_2 10 mM, 0,25 mM ditiotreitól, ATP 10 mM, GlcNAc 50 mM, β -glicerofosfato 50 mM, Triton X-100 0,4%, desoxicolato de sodio 0,1%, y azida de sodio 0,1%, en un volumen final de 200 μl . Se muelen 30 pupas de seis días de *C. capitata* en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y el polvo resultante se agrega a la mezcla anterior. Después de incubar toda la noche a 30 °C, se precipita una alícuota de 100 μl con cloroformo:metanol (1:2), se resuspende en buffer de muestra y se hace una electroforesis seguida por autorradiografía del gel seco.

Tratamiento con fosfatasa alcalina

La muestra a tratar se lleva a seco a 37 °C en corriente de nitrógeno y se le agregan 2 μl de fosfatasa alcalina de *E. coli* en sulfato de amonio 2,5 M, 90 μl de agua, y 10 μl de buffer Tris-HCl 0,5 M pH 8,0. Se agita e incuba 3 h a 30 °C. La reacción se detiene con 2 vol. de etanol frío y luego de 30 min en hielo se separa el sobrenadante centrifugando 5 min a 13.000 xg. Se lleva a seco en corriente de nitrógeno y se redisuelve en agua.

Hidrólisis ácida

Las muestras se llevan a seco en corriente de nitrógeno a 37 °C y se redisuelven en:

- a) Hidrólisis ácida suave: 0,5 ml de HCl 0,1 N. La hidrólisis se efectúa a 100 °C durante 30 min.
- b) Hidrólisis ácida fuerte: 0,5 ml de HCl 1 N. La hidrólisis se efectúa a 100 °C durante 4 h.

En ambos casos el material se lleva a seco y redisuelve dos veces en agua para eliminar el HCl remanente.

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

La electroforesis se llevan a cabo como lo describe Laemmli (41), en geles de 8% de poliacrilamida. Las muestras se calientan en baño maría a 100 °C durante 3 min con buffer Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05% y 2-mercaptoetanol 140 mM. Los geles se tiñen con Coomassie Blue R-250 o con la tinción por

plata como la describen Oakley y col. (42). La autorradiografía de los geles secos se hace a -70 °C utilizando pantallas intensificadoras y placas Kodask X-Omat K.

Cromatografía y electroforesis en papel

Las cromatografías descendentes en papel se hacen utilizando papel Whatman 1 con los siguientes solventes: Solvente A (38): etanol:ácido acético:acetato de amonio 1 M (76:26:4). Solvente B (43): acetato de etilo:piridina:ácido acético:agua (5:5:1:3). Las electroforesis en papel se hacen en acetato de piridina 1,2 M pH 6,5 a 1.000 V (20 V/cm) (44).

Determinación de Proteínas

La concentración de proteínas se determina midiendo la absorbancia a 280 nm, o según el método de Lowry y col. (45) modificado por Peterson (46). Las proteínas totales de la fracción seleccionada del eluido de la Superosa 12 durante la purificación de la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii* se miden por absorbancia a 205 nm en un espectrofotómetro Gilford Response (46). En todos los casos se utilizó albúmina sérica bovina como estándar.

Marcación de proteínas con [¹²⁵I].

En un experimento típico se marcan alícuotas de 50 µl de las fracciones eluidas de la columna de Superosa 12 incubándolas en tubos de vidrio con Iodogen y 5 a 10 µCi de [¹²⁵I] NaI en un volumen total de 100 µl, durante 20 min a 0–4 °C. Cuando las muestras se analizan por electroforesis, la reacción se detiene por adición del buffer de muestra.

La marcación de la proteína A se hace en tubos de vidrio con 20 µg de Iodogen, 250 µg de proteína A, 500 a 1.000 µCi de [¹²⁵I] NaI en 50 µl de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,4. Se incuba 10 min a temperatura ambiente y se agregan 12,5 µl de NaI 1M. La muestra se desala en una columna de Sephadex G-25 de 5 ml equilibrada con TBS. La proteína A marcada aparece en el volumen de exclusión.

Cría de C. capitata

Se crían moscas de la especie *C. capitata* silvestres de la cepa ARG-17 bajo condiciones estándares a 23 °C y 70–80% de humedad relativa. Las pupas de seis días se seleccionan como fué descrito por Rabossi y col. (47) a partir de cultivos que fueron sincronizados aislando pre-pupas en el estadio de pupario blanco.

Preparación de membranas microsomales de C. capitata

Las membranas microsomales de pupas se preparan como se describió previamente, con pequeñas modificaciones (48). Todas las operaciones se realizan a 4 °C. Diez gramos de pupas de seis días de *C. capitata* se lavan sucesivamente con agua desionizada, con NaOCl 1% por 30 seg , con NaCl 0,68 M, con NaCl 1,37 M, y con NaCl 128 mM, KCl 5 mM, 2,5 mM CaCl₂ y EDTA 2 mM. Las pupas lavadas se muelen en un mortero bajo nitrógeno líquido y el polvo resultante se homogeiniza en un Potter-Elvehjem con buffer Tris-Maleato 100 mM pH 7,4 conteniendo MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 4 mM, 2-mercaptoetanol 8 mM, glicerol 8%, sacarosa 6%, PMSF 2 mM, y butilhidroxitolueno 2 mM. El extracto se centrifuga 10 min a 7.000 xg, el sobrenadante , nuevamente a 180.000 xg por 90 min, y el pellet enriquecido en microsomas se resuspende por sonicación en buffer Tris-HCl pH 7,5 con Triton X-100 2% y desoxicolato de sodio 0,5%. Esta es la fuente de enzima para los ensayos subsiguientes.

Purificación de GlcNAc-fosfotransferasa de A. castellanii

Resultados

Purificación de la GlcNAc-fosfotransferasa de A. castellanii

Los resultados de la purificación de la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii* se resumen en la tabla I. Los datos son los de una preparación típica cuyos detalles están descritos en la sección de Procedimientos Experimentales. A pesar del número elevado de pasos, con un poco de práctica la preparación se efectúa en tres días de trabajo.

Paso	Volumen	Proteínas	Actividad	Actividad Específica	Purif.	Rendim.
	ml	mg	U ^a	U mg ⁻¹	Veces	%
1. Homogenato	258	7.150	177.800	24,9	1	100
2. Sobrenadante 12.000 xg	367	4.436	146.900	33,1	1,3	83
3. Membr. Solubilizadas	208	1.261	79.600	63,1	2,5	45
4. Con A-Sepharosa	70	88	42.200	480	19	24
5. Q-Sepharosa	42	19	20.500	1079	43	12
6. <i>T. vulgaris</i> -Sepharosa	2.8	0,042	10.500	249.000	10.030	5,9
7. Superosa 12	10	0,0032	5.200	1.617.000	65.000	2,9

^a Una unidad se define como 1 nmol/hora de GlcNAcP transferido a α -metilmanósido en las condiciones del ensayo de actividad GlcNAc-fosfotransferasa que se describen en Procedimientos Experimentales.

Paso 1. Preparación del extracto: Por lo general se parte de 8 litros de cultivo, de los que se cosechan 110 g de amebas (peso húmedo) que se guardan congeladas hasta el momento de ser utilizadas. Cuando se utilizan amebas recién cosechadas se obtienen esencialmente los mismos resultados. Las amebas se descongelan y se homogenizan por sonicación en un volumen tal de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,0 que resulte una concentración final de proteínas de unos 30 mg ml⁻¹.

Paso 2. Centrifugación a 12.000 xg : Con esta operación se eliminan la mayoría de los trozos grandes de membranas, y núcleos. El homogenato resultante del paso anterior se centrifuga a 12.000 xg y el sobrenadante, que contiene las membranas microsomales, se

centrifuga a 12.000 xg y el sobrenadante, que contiene las membranas microsomales, se reserva para el paso posterior. El pellet se resuspende por sonicación dos veces más en el mismo buffer y se vuelve a centrifugar, reuniéndose todos los sobrenadantes. Con esto se mejora la recuperación de actividad GlcNAc-fosfotransferasa y se obtienen rendimientos bastante elevados, generalmente mayores del 80%. La concentración final de proteínas es de 10 a 15 mg ml⁻¹.

Paso 3. La GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii* es una enzima unida a membranas. Cuando se sedimentan las membranas en las condiciones indicadas, toda la actividad queda en el pellet. La enzima se extrae con una combinación de Lubrol PX y desoxicolato de sodio a pH 7,5. Se encontró que la inclusión de un detergente aniónico en el buffer de solubilización mejora la eficiencia de la extracción. La mezcla de los dos detergentes solubiliza generalmente el 55% de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa presente en el sobrenadante de 12.000 xg, contra un 40% cuando se emplea Lubrol PX solamente. Se recupera alrededor del 45% de la actividad inicial y el 20% de las proteínas, con lo que la purificación total es de unas 3 veces, y la del paso 2 veces.

Las membranas solubilizadas se guardan congeladas a -70 °C hasta el día siguiente, cuando se hace la cromatografía por Concanavalina A-Sepharosa. La congelación en cualquiera de las etapas entre los pasos de purificación mejora el rendimiento respecto de si se los guarda a 4 °C, aún en las fracciones más purificadas.

Paso 4. Cromatografía en Concanavalina A-Sepharosa: Las membranas solubilizadas se cromatografían por la columna de esta lectina que se une a oligosacáridos de alta manosa (Figura 4).

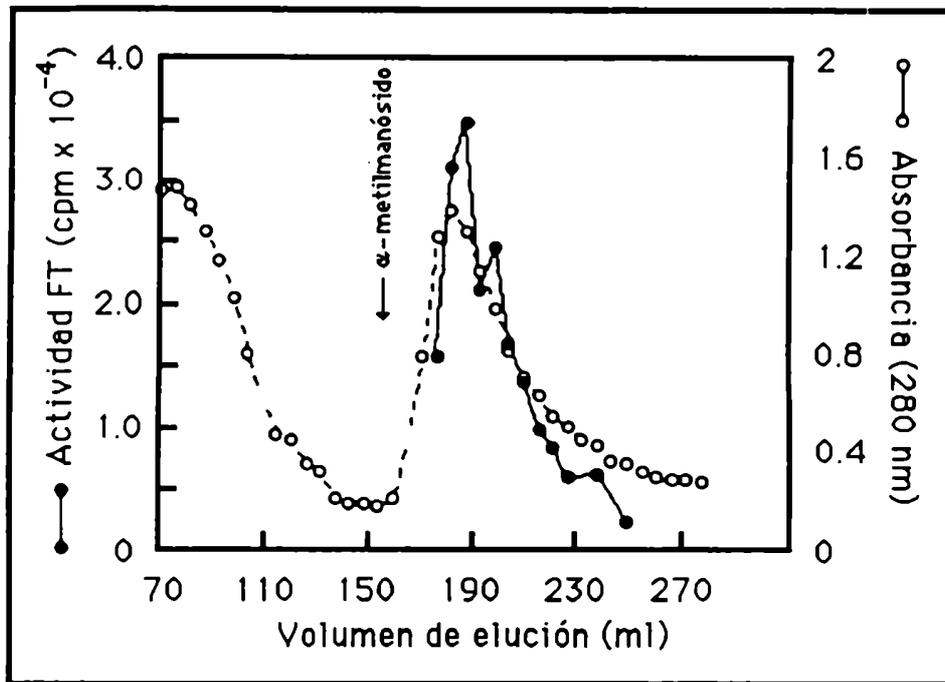


Figura 4: Cromatografía en Concanavalina A-Sepharosa. Las condiciones de la cromatografía se detallan en Procedimientos Experimentales. Se pasan una vez las membranas solubilizadas de *A. castellanii* por la columna de Concanavalina A-Sepharosa y se lava con el buffer de equilibrio a partir de los 70 ml de elución. Cuando se indica con la flecha se eluye con ese buffer sin Mn^{2+} ni Mg^{2+} y con 0,5 M α -metilmanósido. Se colectan fracciones de 1,4 ml y se determinan la actividad GlcNAc-fosfotransferasa (FT) y las proteínas totales como absorbancia a 280 nm.

Las fracciones de mayor actividad GlcNAc-fosfotransferasa se llevan a 10% de glicerol y 1 mM PMSF, y se dializa durante toda la noche en el buffer de equilibrio de la columna de Q-Sepharosa. El agregado de glicerol durante la diálisis mejora la recuperación de la enzima, pero no tiene el mismo efecto en las otras etapas, por lo que se utiliza solo en esta ocasión.

Este resultó ser el segundo paso en eficiencia de la purificación. Generalmente en el eluido con α -metilmanósido se recuperan el 50% de la actividad y el 6% de las proteínas presentes en las membranas solubilizadas, alcanzándose una purificación de 7 veces. Estos valores están medidos después de la diálisis, durante la que se pierde un 2 a 5% de la actividad.

Paso 5. Cromatografía de intercambio iónico: Se encontró que la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii* se une a intercambiadores catiónicos como la DEAE-celulosa y la Q-

Sepharosa Fast Flow. Para la purificación se eligió esta última matriz porque brinda resultados más consistentes entre diferentes preparaciones. Con los intercambiadores catiónicos débiles muchas veces una fracción considerable de la actividad total no se pegó a la columna.

En la Figura 5 se muestra el perfil de una cromatografía en Q-Sepharosa. La actividad eluye a una concentración de 0,1 a 0,2 M de NaCl, aunque en ocasiones se encuentran formas de la enzima que eluyen con fuerzas iónicas mayores, hasta 0,35 M NaCl. La proporción de estas especies varía de una preparación a otra y no se ve afectada por la presencia de PMSF o de desoxicolato de sodio en el buffer de solubilización. Se usó para las operaciones subsiguientes solo la fracción que eluye a menor fuerza iónica.

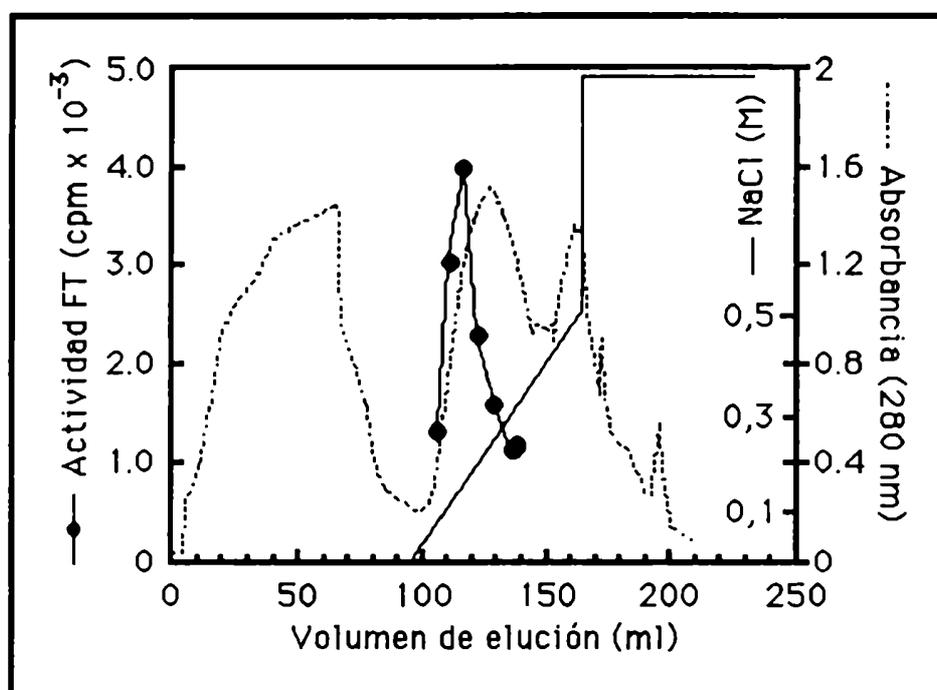


Figura 5: Cromatografía en Q-Sepharosa del eluido de la columna de Concanavalina A-Sepharosa. El eluido dializado de la columna de Concanavalina A-Sepharosa se pasa por la columna a 4 ml min⁻¹. Se colectan fracciones de 4 ml en las que se miden actividad GlcNAc - fosfotransferasa (FT) y proteínas totales como absorbancia a 280 nm. Se reúnen para el paso siguiente las de mayor actividad que eluyan con 100 - 200 mM NaCl.

Generalmente el material eluido de la columna de intercambio iónico con actividad tiene un volumen de 40 ml, obteniéndose una purificación de 2 veces y un rendimiento del 40%.

Paso 6. Cromatografía de afinidad en columna de lectina de *T. vulgaris*. La cromatografía en esta lectina que tiene afinidad por oligosacáridos con *N*-acetilglucosamina en el extremo no reductor (49) se muestra como el paso de mayor eficiencia, ya que se obtienen frecuentemente purificaciones de más de 200 veces con rendimientos del 55% (Figura 6). Solo el 0,25% de las proteínas del material de entrada coeluyen con la actividad, y cuando se tiñe con plata un gel desnaturalizante y reductor de la preparación en esta etapa solo se observan 7 bandas (Figura 9 A), algunas de las cuales pueden ser subunidades o productos de proteólisis (esto se discute más adelante).

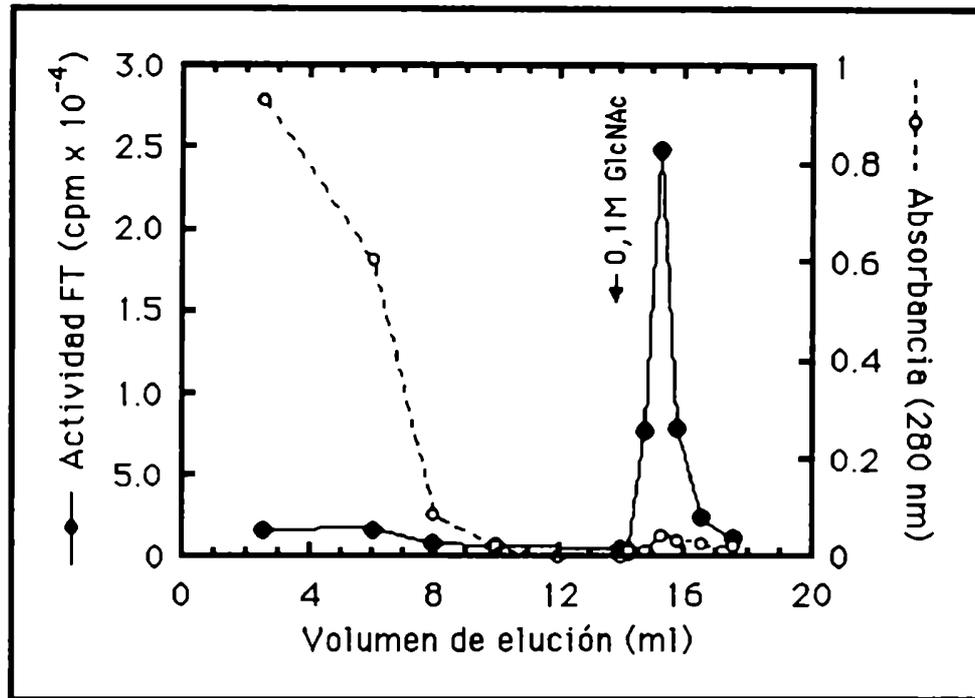


Figura 6: Cromatografía por columna de lectina de *T. vulgaris* -Agarosa del material eluido de la columna de Q-Sepharosa. Se pasa la muestra eluida de la columna de Q-Sepharosa como se detalla en Procedimientos Experimentales. Con la flecha se indica el comienzo de la elución con buffer conteniendo GlcNAc. Se colectan fracciones de 0,5 ml y se miden actividad GlcNAc-fosfotransferasa (FT) y proteínas totales como absorbancia a 280 nm.

Paso 7: Cromatografía de exclusión molecular. Como se mostrará enseguida, la GlcNAc-fosfotransferasa presenta una gran dispersión de tamaño, con formas mayores a 1.000 kDa. Se eligió efectuar el último paso en una columna de Superosa 12 (rango de inclusión de 1 a 300 kDa) en vista de que en esta columna las especies con actividad GlcNAc-fosfotransferasa se agrupan saliendo todas en el V_0 , y las proteínas contaminantes eluyen

a volúmenes mayores, por lo que se separa mejor la enzima de aquellas de menor tamaño en estado nativo.

Una alícuota de las fracciones de mayor actividad eluídas de la columna de *T. vulgaris* se se cromatografía en una columna de Superosa 12. Se optó por sembrar una alícuota antes que por la concentración de la muestra eluída del paso anterior debido a que con la concentración tanto por ultrafiltración como por deshidratación con Sephadex G-100 las pérdidas de actividad fueron excesivamente grandes. La actividad eluye generalmente cerca del V_0 de la columna (7,6 ml), aunque, como en la preparación que se muestra en la Figura 7 A, es frecuente encontrar cierta dispersión de tamaño, con especies bien incluidas en la columna. En ciertas preparaciones, como se discutirá al mostrar los resultados con el anticuerpo anti GlcNAc-fosfotransferasa, toda la actividad se incluye en la columna.

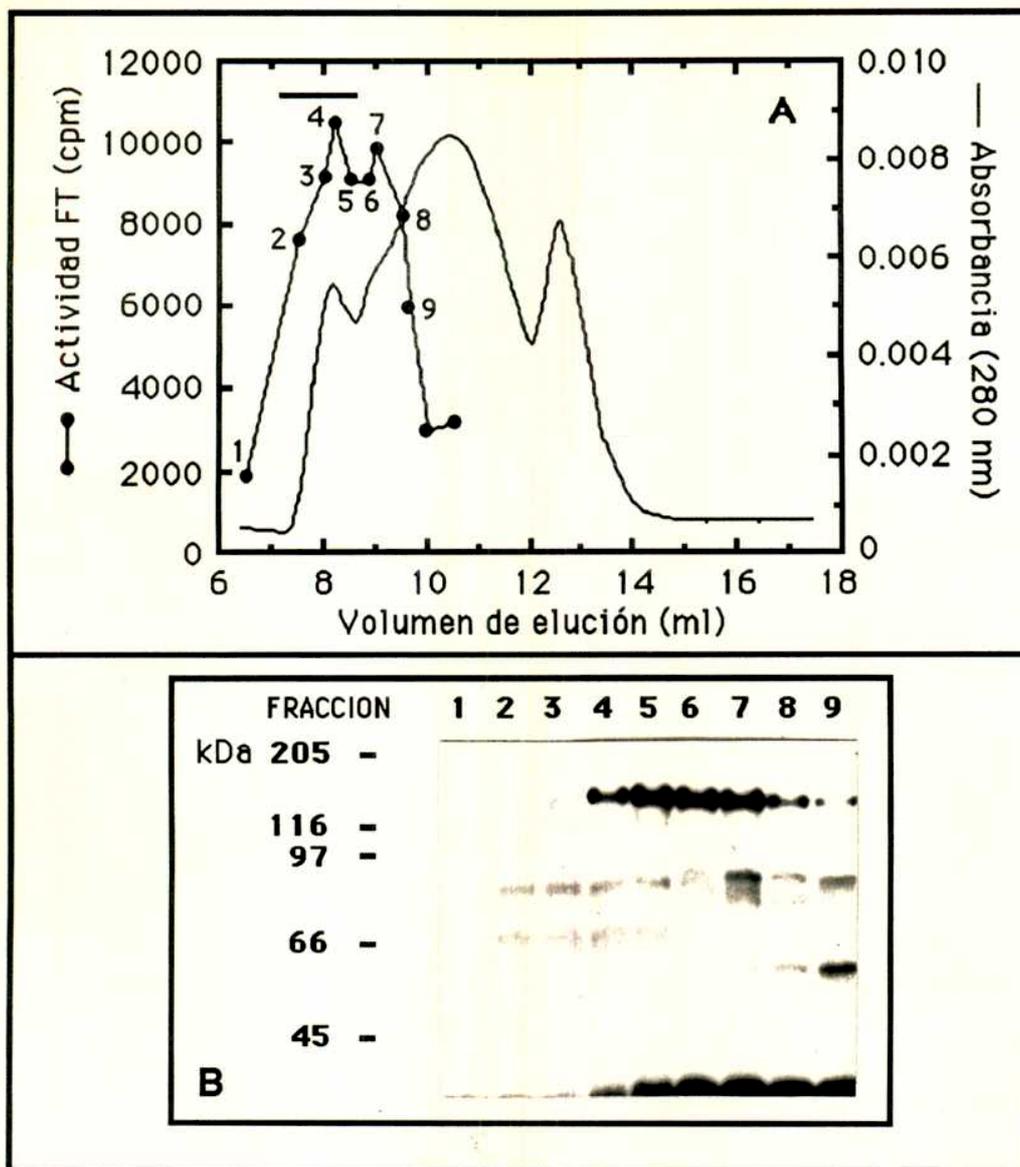


Figura 7: Panel A: Cromatografía de exclusión molecular en Superosa 12. Se siembran 450 μ l del material con actividad eluido de la columna de lectina de *T. vulgaris*. La muestra se eluye a 0,5 ml min^{-1} y se colectan fracciones de 0,4 ml. La barra horizontal indica la zona de la columna que se seleccionó para el análisis de las proteínas y actividad totales en este paso. FT: actividad GlcNAc-fosfotransferasa. Los números 1 al 9 indican las fracciones que se siembran en el gel de poliacrilamida. Panel B: Electroforesis del material eluido de la columna de Superosa 12 (Panel A). Alícuotas de las fracciones que se indican eluidas de la columna de Superosa 12 se marcan con [125 I] y las proteínas se separan por electroforesis en gel de 7,5% de poliacrilamida reductor y con SDS, tal como se describe en Procedimientos Experimentales. El gel se seca y se autorradiografía.

Pureza de la GlcNAc-fosfotransferasa y determinación del peso molecular

El grado de purificación de la GlcNAc-fosfotransferasa se comprueba por electroforesis en gel de poliacrilamida, en que las proteínas presentes en las fracciones eluidas de la columna de Superosa 12 se separan en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol. Se hace necesario marcar las proteínas con [125 I] para poder observarlas debido a la muy pequeña cantidad que es posible sembrar en cada carril del gel, del orden de 20 pg para las fracciones con mayor actividad GlcNAc-fosfotransferasa, y porque no todas las proteínas presentes se tiñen eficientemente con plata.

En la Figura 7 B se muestra la auroradiografía de la electroforesis de las distintas fracciones eluidas de la columna de Suprerosa 12. Se observa que hay dos bandas de 82 kDa y 71 kDa que tienen aproximadamente la misma intensidad y se correlacionan con el perfil de actividad GlcNAc-fosfotransferasa. Las dos bandas mencionadas representan el 70% de la marca de [125 I] en la región señalada con la barra horizontal (Figura 7 A).

Cuando la muestra eluída de la columna de lectina de *T. vulgaris* –paso 6 en la purificación– se cromatografía por una columna de exclusión molecular Superosa 6 (Rango de inclusión: 5 a 5×10^6 kDa), se observa que la mayor parte de la actividad eluye con un tamaño aparente correspondiente a 570 kDa (Figura 8).

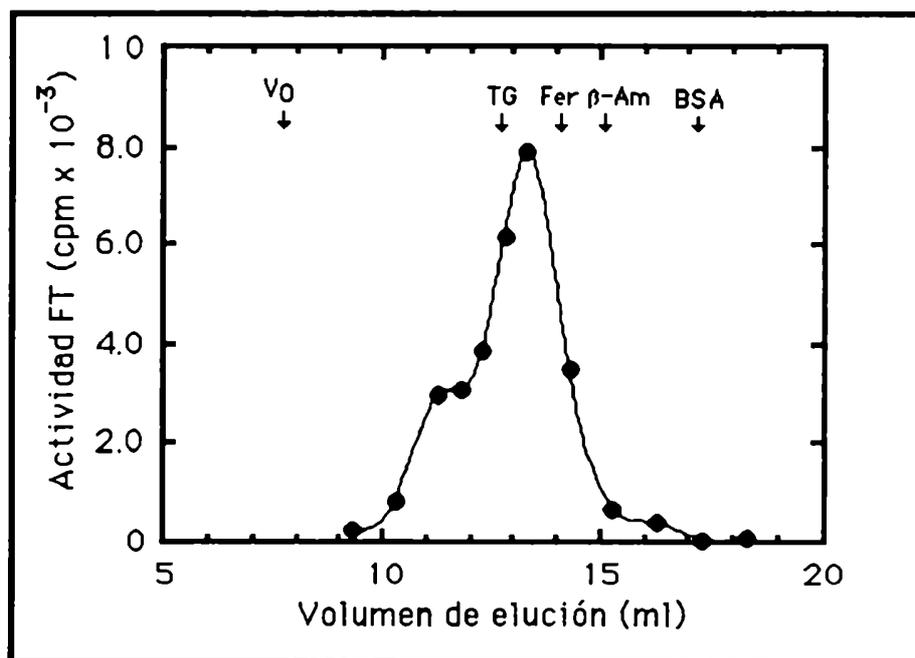


Figura 8: Cromatografía en Superosa 6 del material eluído de la columna de Q-Sepharosa. Se siembran 0,5 ml en una columna de Superosa 6 equilibrada con

HCl 50 mM pH 7,0 con 0,1% Lubrol PX y NaCl 200 mM. Se eluye con el mismo buffer a 0,5 ml min⁻¹ y se colectan fracciones de 0,5 ml. Se mide actividad GlcNAc-fosfotransferasa como se indica en Procedimientos Experimentales. Las flechas indican la posición de elución de los estándares albúmina sérica bovina (BSA, 66 kDa), β -amilasa (β -Am, 200 kDa), ferritina (Fer, 440 kDa) y tiroglobulina (TG, 669 kDa). El volumen de exclusión (V_0) se midió con Blue Dextran 2000.

En algunas preparaciones se observa una gran dispersión, con formas de tamaños aparentes que oscilan entre más de 1.000 kDa y 410 kDa. La tendencia a agregarse se ha descrito en otras glicosiltransferasas de membranas purificadas a homogeneidad y será discutida más adelante.

Basándose en la suposición de que las formas de alto peso molecular podrían resultar de interacciones no covalentes entre las formas de bajo peso molecular, se realizaron varios intentos para transformar una forma en otra. No resultó posible hacerlo variando la concentración de Lubrol PX, la de desoxicolato de sodio o ambas una vez solubilizadas las membranas, ni variando el pH en el rango 7,0 a 8,0. Tampoco resultó eficaz la extracción de las membranas con octilglucósido 1%, un detergente con una alta concentración micelar crítica, cercana a 25 mM (50). Considerando que la presencia de uno o ambos sustratos, o de Mn²⁺, que influye en la actividad de la enzima, podrían afectar el estado de agregación a través de algún cambio conformacional, se probó el efecto de varias concentraciones de α -metilmanósido, UDP-GlcNAc y MnCl₂, sin que se observara variación en la posición de elución de la columna de Superosa 12. Como se verá más adelante, solo la solubilización con Tritón X-114 brindó una forma de menor peso molecular, pero que no fue posible interconvertir con las más grandes.

Producción de anticuerpos policlonales contra la GlcNAc-fosfotransferasa

Los pasos seguidos para producir los anticuerpos contra la GlcNAc-fosfotransferasa están descritos en la sección de Procedimientos Experimentales.

Para la inmunización se utiliza la fracción con actividad GlcNAc-fosfotransferasa eluída de la columna de lectina de *T. vulgaris* –paso 6 del esquema de purificación–. En esta preparación la enzima estaba purificada unas 10.000 veces y tenía una actividad específica de más de 240.000 U mg⁻¹. Debido a que en este paso se tienen solo unos 40 μ g de proteínas totales, se usaron ratones para la producción de anticuerpos.

En la figura 9 A se muestra un gel de poliacrilamida teñido plata de las proteínas usadas en la inmunización. Hay dos bandas anchas predominantes con pesos moleculares relativos de 71 kDa y 82 kDa. Hay una banda estrecha y muy intensa de 118 kDa, y una o posiblemente tres bandas anchas en la zona de 50–57 kDa. Apenas perceptibles hay bandas de 180 kDa, 150 kDa, 94 kDa, 61 kDa, 42 kDa y 24 kDa de peso molecular relativo.

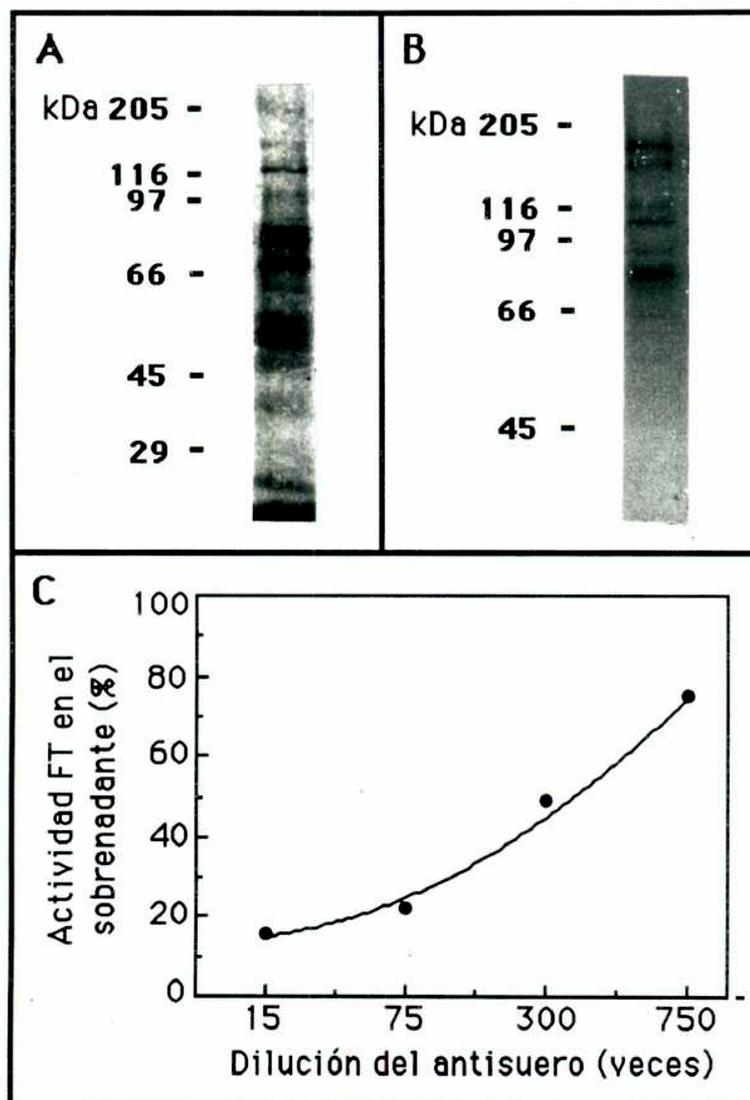


Figura 9. Panel A: Electroforesis en gel de 8% de poliacrilamida de 1,6 µg de proteínas eluidas de la columna de lectina de *T. vulgaris* (material de inmunización, ver Procedimientos Experimentales) y teñido con plata. Panel B: Inmunoblot de 130 µg de proteínas totales de *A. castellanii* reveladas con el antisuero de ratón contra la GlcNAc-fosfotransferasa, y suero de conejo anti ratón conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. Panel C: Inmunoprecipitación de actividad

GlcNAc-fosfotransferasa parcialmente purificada de *A. castellanii* por diversas diluciones del antisuero de ratón.

Cuando se hace reaccionar el anticuerpo contra proteínas totales de ameba, reconoce solo unas pocas proteínas (Figura 9 B). Las bandas principales tienen pesos moleculares de 158 - 150 kDa, 117 - 110 kDa, y 94 - 82 kDa. Hay otro par mucho más débil de 71 y 61 kDa, y una banda de 180 kDa. Estos pesos moleculares coinciden con los de las proteínas presentes en el material utilizado para la inmunización (Figura 9 A).

Las proteínas de membranas microsomales o de aparato de Golgi de hígado de rata, o de membranas microsomales de la mosca *C. capitata* y del hematófago *Triatoma infestans*, o proteínas totales de estos insectos o de *D. discoideum*, no reaccionaron en inmunoblots con el antisuero. Esto indica que los anticuerpos obtenidos son altamente específicos para proteínas de *A. castellanii*, reconociendo además solo unas pocas de ellas.

Se eligió la inmunoprecipitación de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa como indicativa de la presencia de anticuerpos capaces de reconocer esta enzima, debido a que no hace necesaria ninguna presunción sobre el peso molecular de la enzima o sus posibles subunidades. En la Figura 9 C se muestra que en las condiciones utilizadas para el ensayo (ver Procedimientos Experimentales), una dilución 1:300 del antisuero precipita el 50% de la actividad enzimática, indicando de esa manera la presencia de anticuerpos capaces de reconocer y unirse a la enzima. La actividad en la solución no disminuye cuando los anticuerpos no se precipitan con *S. aureus* - proteína A. Esto sugiere que no hay anticuerpos capaces de modificar el sitio catalítico de la enzima en el antisuero (5).

El antisuero no fué capaz de precipitar la actividad GlcNAc-fosfotransferasa presente en membranas solubilizadas de *D. discoideum* o de aparato de Golgi de células de hígado de rata, incluso a diluciones tan bajas como 1:10 o 1:20, por lo que se puede concluir que los anticuerpos obtenidos son específicos para la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii*.

Algunas de las proteínas reconocidas por los anticuerpos están relacionadas con la actividad GlcNAc-fosfotransferasa

Para identificar cuáles de las proteínas presentes en la preparación utilizada en la inmunización corresponden a la GlcNAc-fosfotransferasa, el eluido de la columna de lectina de *T. vulgaris* se cromatografió en una columna de Superosa 12. Como se ha visto, la actividad generalmente no se incluye en esta columna, y sale con un V_e de 7,6 ml, coincidente con el V_0 (Figura 10 A). Una alícuota de cada fracción se marca con [^{125}I]

y las proteínas se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida y se visualizan por autorradiografía (Figura 10 B). Con otra alícuota del material eluído de la columna de Superosa 12 se hace un inmunoblot que se revela con el antisuero de ratón (Figura 10 C).

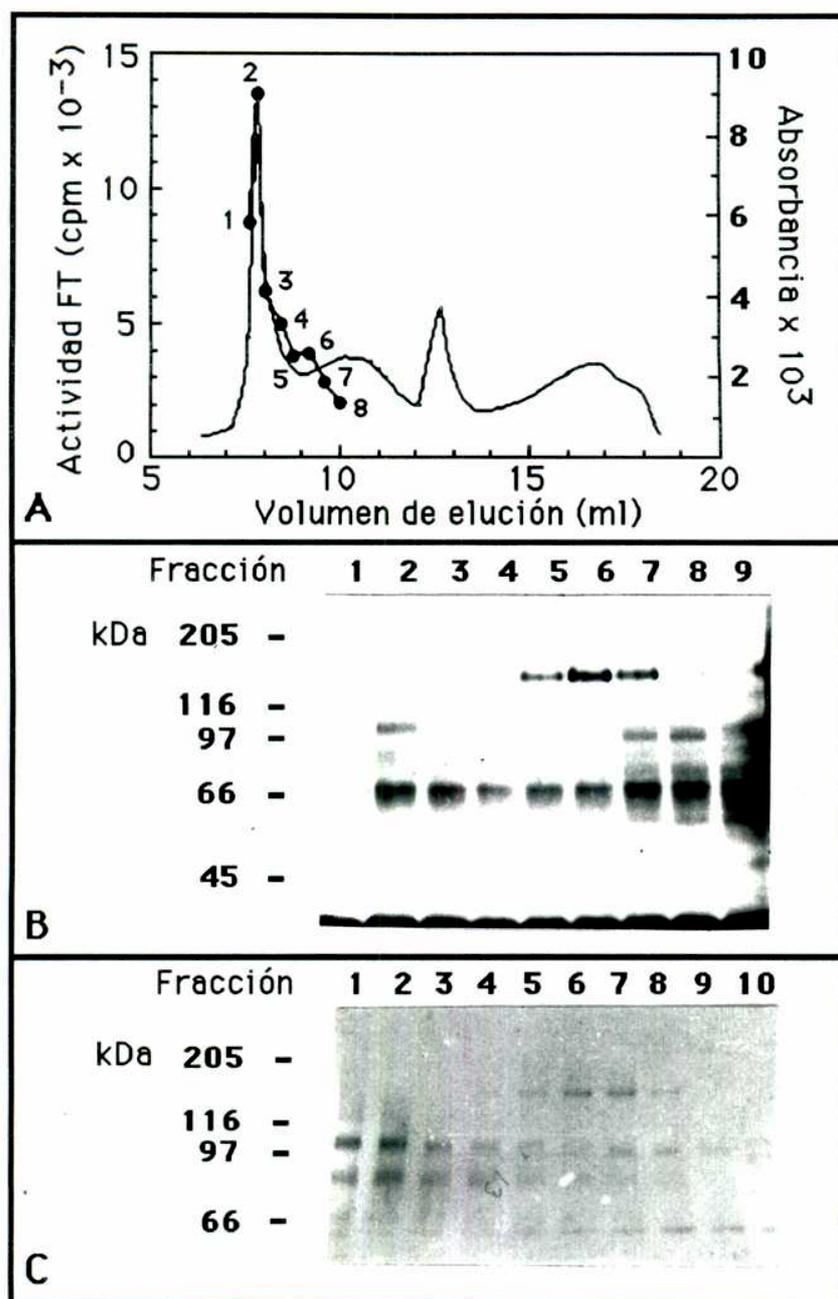


Figura 10. Cromatografía en Superosa 12. Preparación excluída. Panel A: Cromatografía en Superosa 12 del material aluído de la columna de lectina de *T. vulgaris* en preparaciones donde la GlcNAc-fosfotransferasa resultó excluída de esta columna. ●—● Actividad GlcNAc-fosfotransferasa (FT); — Absorbancia a

280 nm; 1 a 8 son los números de fracción. Panel B: Proteínas eluidas de la columna de Superosa 12. Alícuotas de cada fracción (1 a 10) se marcan con ^{125}INa y las proteínas se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % y se revelan por autorradiografía. Panel C: Inmunoblot de las proteínas eluidas de la Superosa 12. Alícuotas de las fracciones indicadas (1 a 9) se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa. El inmunoblot se revela con el anticuerpo de ratón contra la GlcNAc-fosfotransferasa, utilizando antisuero de conejo anti ratón conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario.

En la figura 10 C se ven dos bandas anchas de 104 kDa y 82 kDa con una distribución de intensidades de reacción con el anticuerpo que coincide con la de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa (Figura 10 A), y hay dos bandas débiles de 117 kDa y 71 kDa con la misma característica. También hay una banda estrecha de 150 kDa con un V_e de 9,6 ml. Todas estas proteínas se ven también cuando se marcan con ^{125}INa (Figura 10 B), aunque sus intensidades relativas difieren de aquellas que presentan en el inmunoblot; en este caso la banda de máxima intensidad en la zona de la actividad corresponde a la proteína de 71 kDa. La intensidad relativa de las bandas de proteínas tal como aparecen reveladas por tinción con plata, marcación con ^{125}INa , o detección con el anticuerpo, no es directamente comparable debido a que cada uno de estos métodos detecta aspectos específicos de cada proteína, que no tienen porqué guardar la misma relación de una proteína a otra.

Para probar si las mismas bandas observadas en el inmunoblot del material purificado también estaban presentes en un material más crudo, se repitió el análisis sembrando en la Superosa 12 el material del paso 3 del esquema de purificación (membranas solubilizadas, ver los Procedimientos Experimentales). Con alícuotas de las fracciones eluidas se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida y un inmunoblot. La principal banda fué la de 104 kDa, y hubo bandas más débiles de 82 kDa, 71 kDa y 61 kDa.

Si por cualquier razón cambiara el V_e de la GlcNAc-fosfotransferasa en la cromatografía de exclusión, entonces las bandas que correspondieran a la enzima deberían mostrar un corrimiento equivalente en los inmunoblots. Se encontró que en algunas preparaciones la actividad se incluye en la columna de Superosa 12. La Figura 11A muestra uno de esos casos, en que la actividad eluye con un V_e de 9,6 ml. Para estas preparaciones se obtuvo el mismo K_m con la enzima lisosomal uteroferrina que para aquellas en que la actividad resulta excluida (21), descartándose así la presencia de otra actividad enzimática que también transfiriera GlcNAc-1-fosfato a α -metilmanósido *in vitro*.

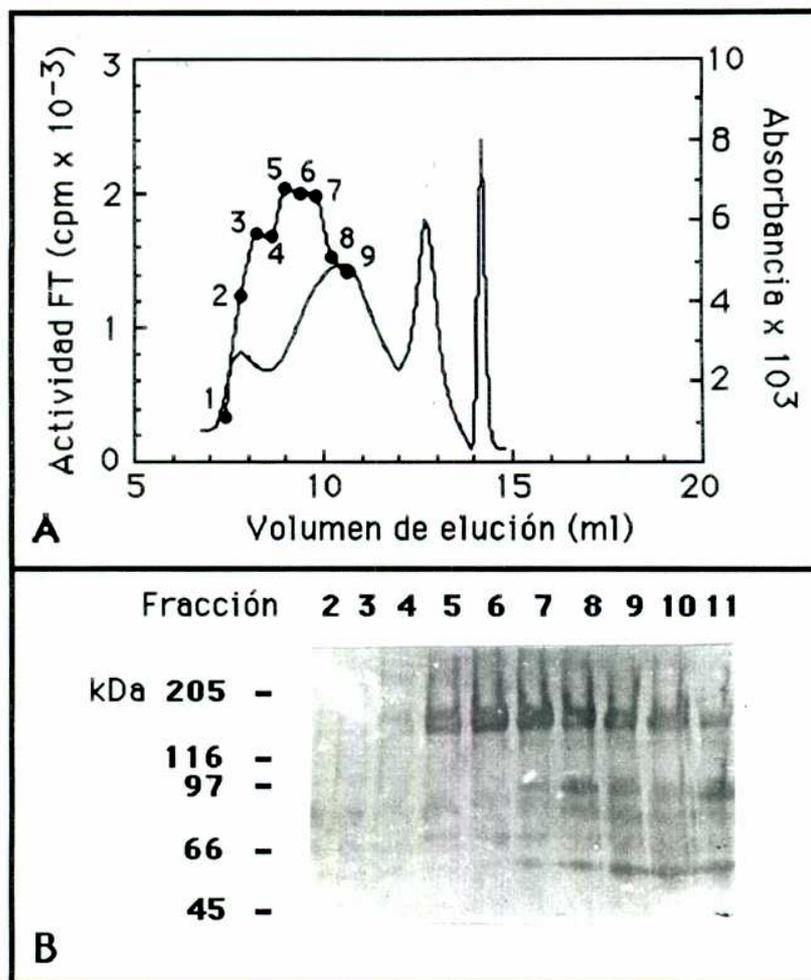


Figura 11. Cromatografía en Superosa 12. Preparación incluida. Panel A: Cromatografía en Superosa 12 del material aluído de la columna de lectina de *T. vulgaris* en preparaciones donde la GlcNAc-fosfotransferasa resultó incluida en esta columna. ●—● Actividad GlcNAc-fosfotransferasa (FT); — Absorbancia a 280 nm; 1 a 9 son los números de fracción. Panel B: Inmunoblot de las proteínas eluídas de la Superosa 12. Alícuotas de las fracciones indicadas (2 a 11) se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa. El inmunoblot se revela con el anticuerpo de ratón contra la GlcNAc-fosfotransferasa, utilizando antisuero de conejo anti ratón conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario.

En la figura 11 B se muestra un inmunoblot de alícuotas eluídas de una Superosa 12 de una preparación purificada de GlcNAc-fosfotransferasa (material eluído de la columna de lectina de *T. vulgaris*) que resultó incluida en esta columna. La banda de máxima

intensidad con un perfil de reacción con el anticuerpo coincidente con el de la actividad fué la de 150 kDa. Como se mencionó antes, en el caso de las preparaciones donde la actividad resultó excluída de la Superosa 12 esta banda no coincide con la actividad. También coinciden con la actividad las bandas de 71 kDa y de 82 kDa, aunque presentan intensidades mucho menores.

Cuando se sembró en la columna Superosa 12 una muestra de membranas solubilizadas de una preparación en que la actividad se incluye, la de 150 kDa fué la principal banda en el inmunoblot, y con menor intensidad, las de 71 kDa y 82 kDa. También aparecieron bandas más débiles de 180 kDa, 104 kDa, y varias en la zona de 117 - 128 kDa.

Se sabe de algunos casos en que una disminución en el número de unidades de polioxietileno en detergentes de la familia del Lubrol incrementa la eficiencia de la solubilización de ciertas proteínas (51). Para comprobar si había algún efecto atribuible a esta causa sobre las membranas de *A. castellanii*, se solubilizaron estas con Triton X-114 y se cromatografiaron en una columna Superosa 12. La actividad GlcNAc – fosfotransferasa eluyó ahora con un V_e de 11,6 ml (Figura 12 A).

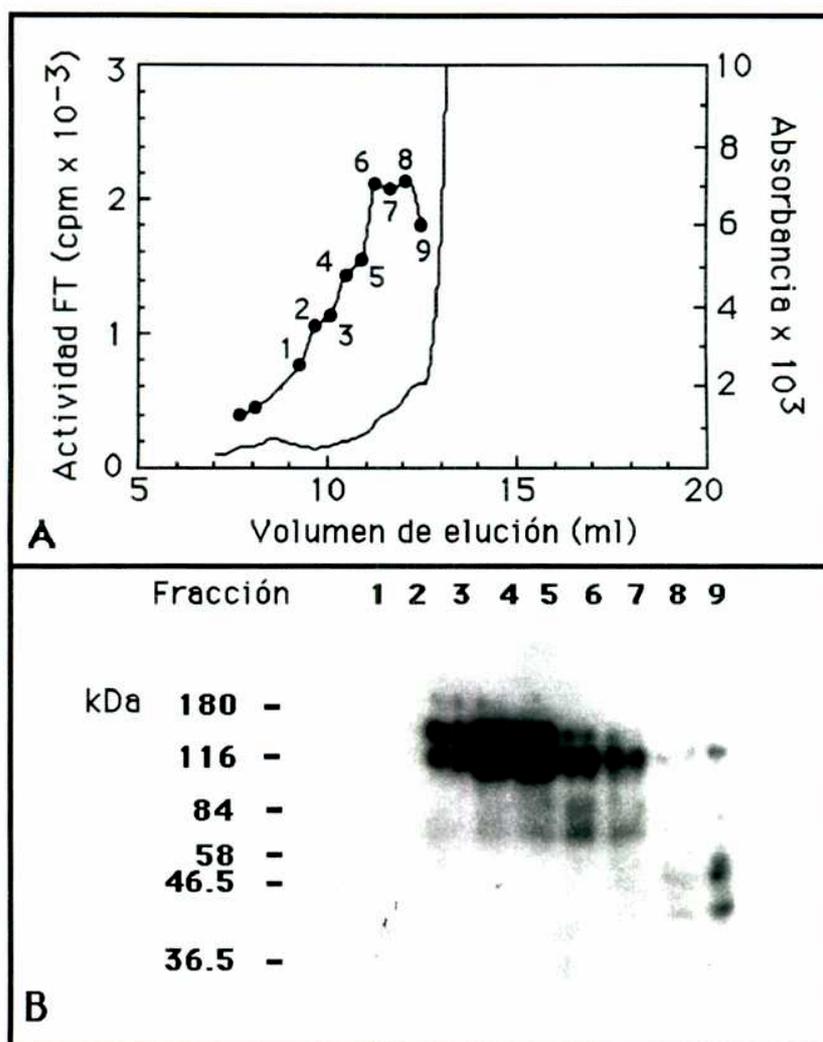


Figura 12. Cromatografía en Superosa 12 de preparaciones solubilizadas con Triton X-114. Panel A: Cromatografía en Superosa 12 de membranas de *A. castellanii* solubilizadas con Triton X-114. ●—● Actividad GlcNAc-fosfotransferasa (FT); — Absorbancia a 280 nm; 1 a 9 son los números de fracción. Panel B: Inmunoblot de las proteínas eluidas de la Superosa 12. Alícuotas de las fracciones indicadas (1 a 9) se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa. El inmunoblot se revela con el anticuerpo de ratón contra la GlcNAc-fosfotransferasa, utilizando antisuero de conejo anti ratón como anticuerpo secundario y revelando las bandas con [¹²⁵I] proteína A.

No se conoce la razón de este cambio en el volumen de elución, pero se puede suponer que la cadena hidrofílica más corta del Triton X-114 ($t\text{-Oct-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{-8OH}$)

disminuye el estado de agregación de la GlcNAc-fosfotransferasa en mayor medida que el Lubrol PX ($C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_9-10OH$). Por otra parte se sabe que hay proteínas que se unen aproximadamente a una sola micela de detergente por molécula si la concentración del detergente está por sobre la concentración micelar crítica (52, 53) Si este fuera el caso, el menor peso molecular micelar del Triton X-114 respecto del Lubrol PX podría explicar al menos en parte la diferencia.

En el inmunoblot correspondiente que se muestra en la figura 12 B, se ve que las bandas de 71 kDa y 82 kDa son las que coinciden con la actividad enzimática. Las bandas más intensas son las de 117 kDa y de 150 kDa, que eluyen con un V_e diferente al de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa. Se advierten bandas más débiles de 180 kDa y 47 kDa que tampoco coinciden con la actividad.

En la Tabla II se muestra un resumen de las bandas que presentan buena correlación con la actividad GlcNAc-fosfotransferasa. Las bandas de 71 kDa y 82 kDa están siempre presentes y siguen los cambios en el V_e de la GlcNAc-fosfotransferasa, aunque no siempre sean las bandas de máxima intensidad. Las mismas bandas se pueden ver en preparaciones altamente purificadas en las que las proteínas se han marcado con [^{125}I] (Figuras 7 B y 10 B).

Banda (kDa)	180	150	117	104	94	82	71	61	42	23
Material										
• Ameba total	+	+	+	+		+	+	+		
• Paso 6 ($V_e=7.6$)-Lubrol PX			+	+		+	+			
• Paso 3 ($V_e=7.6$)-Lubrol PX				+		+	+			
• Paso 6 ($V_e=9.6$)-Lubrol PX	+	+				+	+			
• Paso 3 ($V_e=9.6$)-Lubrol PX	+	+	+	+	+	+	+			
• Paso 3 ($V_e=11.6$)-Triton X-114						+	+			

Tabla II. Probable identificación de proteínas que forman parte de la GlcNAc – fosfotransferasa. En la fila superior se muestran los pesos moleculares de las proteínas presentes en el material de inmunización, según se visualizan en la tinción argéntica (Figura 9 A). Con las cruces se indican los pesos moleculares de las proteínas detectadas por el suero de ratón anti GlcNAc-fosfotransferasa, y cuyo

perfil de intensidades en inmunoblots coincide con el de actividad GlcNAc-fosfotransferasa en la misma preparación. Ameba total: Proteínas totales de *A. castellanii* ; paso 3: Membranas solubilizadas de *A. castellanii* ; paso 6: material eluído de la columna de lectina de *T. vulgaris*; Lubrol PX, Triton X-100 o Triton X-114 se refiere al detergente utilizado en la preparación del material.

Discusión

La GlcNAc-fosfotransferasa presente en membranas microsomales de *A. castellanii* fué solubilizada con una mezcla del detergente no iónico Lubrol PX y del detergente aniónico desoxicolato de sodio, y subsiguientemente purificada unas 65.000 veces con respecto a las proteínas presentes en el homogenato crudo, mediante cromatografías con las lectinas Concanavalina A y de *Triticum vulgare*, el intercambiador iónico Q-Sepharosa y cromatografía de exclusión molecular en Superosa 12.

La base para la purificación la constituyeron las cromatografías de afinidad con las lectinas Concanavalina A y de *T. vulgare*. El paso que brindó la mejor purificación fue este último, resultado muchas veces enriquecimientos mayores de 200 veces, ya que solo se une el 0,25% de las glicoproteínas del material que se carga en la columna. Ketcham y Kornfeld (30) informan que solo el 0,002% de las proteínas totales de la *A. castellanii* se unen a esta lectina, reflejando probablemente la composición inusual de la GlcNAc-fosfotransferasa en relación a las otras glicoproteínas de la ameba. Otra posibilidad que no se puede descartar es que la GlcNAc-fosfotransferasa esté *O*-glicosilada con *N*-acetilglucosamina, si bien este tipo de glicosilación no ha sido descrito para la *A. castellanii*.

Otras glicosiltransferasas de membrana fueron purificadas hasta homogeneidad gracias al empleo de columnas de afinidad construídas generalmente con algún sustrato o producto de la enzima, acoplado a Agarosa o Sepharosa (54-63). Dado este precedente se investigó la capacidad de la GlcNAc-fosfotransferasa de unirse varios compuestos de este tipo. Se probaron columnas de uteroferrina-Sepharosa, glicopéptidos de tiroglobulina (alta manosa)-Sepharosa, α -metilmanósido-Agarosa, UDP-Agarosa, UDP-hexanolamina-Agarosa y UDP-ácido glucurónico-Sepharosa CL-4B. No fué posible retener la enzima con ninguno de ellos a pesar de variarse ampliamente las condiciones que se utilizaron. La GlcNAc-fosfotransferasa tampoco se unió a la lectina de *Griffonia simplicifolia* I, que se une a galactosas en el extremo no reductor de oligosacáridos, a Affi-Gel Blue, a Reactive Red 120-Agarosa ni a Blue Sepharose CL-6B.

Por una combinación de cromatografías de intercambio iónico, exclusión molecular y afinidad por lectinas se pudo obtener una preparación altamente purificada de la enzima, como se describió previamente. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes y

reductoras en geles de poliacrilamida en presencia de SDS mostró dos especies proteicas principales, con pesos moleculares de 82 kDa y 71 kDa (Figura 7 B).

Estos dos polipéptidos son de peso molecular relativamente bajo para el V_e que presenta la enzima en las cromatografías de exclusión en Superosa 12, coincidente con el V_0 de la columna y por lo tanto de más de 300 kDa. Proteínas de mayor peso molecular en los geles de poliacrilamida eluyeron con V_e menores, como la de 150 kDa, que lo hizo con un peso molecular aparente de 140 kDa en la Superosa 12 (Figura 7 B). Esto indica que probablemente las proteínas de 82 y 71 kDa estén unidas en estado nativo, sea como subunidades de una forma activa mayor, o como agregados menos definidos, sin descartar que ocurran ambas cosas, dada la presencia de formas activas de más de 1.000 kDa.

La mayoría de las glicosiltransferasas de membrana purificadas hasta homogeneidad descritas tienen actividades específicas entre $0,1 \times 10^6$ y $15,9 \times 10^6$ U mg^{-1} con los mejores aceptores (54 – 63, 69), sugiriendo que la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii*, con una actividad específica de $1,6 \times 10^6$ U mg^{-1} con α -metilmanósido como sustrato, puede estar cerca de la homogeneidad, y que una o ambas bandas vistas en la zona de la actividad cuando se marcan las proteínas eluidas de la Superosa 12 con ^{125}I Na pueden pertenecer a la enzima.

Los resultados obtenidos con el anticuerpo contra la GlcNAc-fosfotransferasa también apoyan que las bandas de 82 kDa y 71 kDa que se ven en la Figura 7 B están relacionadas con la actividad enzimática. Tanto el título relativamente alto obtenido en los ensayos de inmunoprecipitación como la alta especificidad para las proteínas de la ameba, sugieren que al menos algunas de las bandas reveladas en los inmunoblots corresponden a la GlcNAc-fosfotransferasa.

En la Tabla II se muestra un resumen de los pesos moleculares en geles de poliacrilamida de las proteínas eluidas de columnas de Superosa 12 cuyas intensidades de reacción con los anticuerpos anti GlcNAc-fosfotransferasa se correlacionan bien con la actividad. Las bandas de 82 kDa y 71 kDa están siempre presentes y siguen los cambios en el V_e de la GlcNAc-fosfotransferasa que ocurren al variar las condiciones de la solubilización, aunque no siempre sean las bandas de máxima intensidad. Las mismas bandas se pueden ver en preparaciones altamente purificadas en las que las proteínas se han marcado con [^{125}I] (Figura 10 B). En consecuencia, estas dos proteínas son subunidades o fracciones de la GlcNAc-fosfotransferasa, si bien no se puede descartar que otras también podrían

corresponder a la enzima, como la de 104 kDa, que siempre aparece coincidiendo con la actividad aunque no se detecte en todas las preparaciones.

Varias glicosiltransferasas purificadas hasta homogeneidad se obtuvieron como dos o más polipéptidos de diferente peso molecular, situación que se presentó en el caso de la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii*.

Una posibilidad es que la especie de 71 kDa sea una forma parcialmente degradada de la forma de 82 kDa que aparecería al proteolizarse una porción de la enzima que no resulta esencial para la actividad catalítica ni para el reconocimiento del sustrato. Algo similar se comprobó para al menos una sialiltransferasa de hígado de rata (64), donde se demostró por secuenciación del cDNA y del extremo amino-terminal de la forma soluble, que esta última, de 37-43 kDa, corresponde a la porción luminal de la enzima completa de 47 kDa. También hay buenas evidencias de que lo mismo ocurre con la sialiltransferasa purificada de glándulas submaxilares porcinas, en la que la forma B, de 44 kDa es soluble y no se une a detergente, y probablemente derive por proteólisis de la forma A, de 49 kDa, que está asociada a membranas y se une a una micela de Triton X-100 (65). Lo mismo se postuló para las bandas de 44 y 56 kDa que se obtienen en preparaciones purificadas de sialiltransferasa de calostro bovino (66), aunque en este caso ambas formas son separables por filtración en gel y en el presente eluyen con el mismo V_e . Una sialiltransferasa de glándulas submaxilares porcina (56) también se presenta como dos formas moleculares de 100 y 160 kDa.

Otras glicosiltransferasas de membrana que se presentan en las preparaciones purificadas como dos bandas son la *N*-acetilglucosaminiltransferasa I de hígado de conejo –58 y 46 kDa– (58), la α 1,3-galactosiltransferasa de timo bovino –40 y 42 kDa– (54), la *N*-acetilgalactosaminiltransferasa II de hígado de rata – 43 y 48 kDa – (60), una sialiltransferasa de placenta humana –41 kDa la banda principal, y otras de menor intensidad de 40, 43 y 65 kDa– (61), una *N*-acetilglucosaminiltransferasa I de hígado de conejo –45 kDa la principal y bandas menores de 50 y 54 kDa – (62), la *N*-acetilglucosaminiltransferasa III de hígado de rata –62 y 52 kDa– (63), y lo mismo una fucosiltransferasa de la leche humana, que aparece como dos polipéptidos de 53 y 51 kDa (67).

El peso molecular de la GlcNAc-fosfotransferasa nativa estimado por filtración por gel está entre algo más de 1.000 kDa y 130 kDa dependiendo de la preparación y de las condiciones de solubilización, aunque su valor es bastante incierto teniendo en cuenta que

se trata de una proteína de membrana, y por lo tanto puede estar unida a cantidades apreciables de detergentes. Como ya se mencionó, algunas glicosiltransferasas de membrana se unen a una micela de detergente por molécula (55). También hay que considerar que la estimación de pesos moleculares en solventes no desnaturizantes se basa en el principio de que las propiedades hidrodinámicas de la proteína en cuestión se aproximan a las de una esfera de ese peso molecular (68), de lo que no hay certeza en este caso.

No resultó posible establecer la razón de esta variación en el V_e de la GlcNAc-fosfotransferasa. Podría deberse a la existencia de formas enzimáticas de diferentes pesos moleculares, o que se unan a diferente cantidad de detergentes, o que tengan diversos estados de agregación, ya sea consigo mismas o con otras proteínas (52).

En vista de la gran diferencia de peso molecular aparente que presentan las distintas formas de la GlcNAc-fosfotransferasa -desde 130 kDa hasta >1.000 kDa-, parece poco probable que esta diferencia se deba exclusivamente a la unión o no a una micela de detergentes. Aunque no se puede descartar que existan formas que unan diferente cantidad de detergentes, posiblemente también haya formas con actividad enzimática que presentan diferentes estados de agregación. La imposibilidad de disminuir el tamaño aparente de las formas de mayor peso molecular variando la composición del buffer, tipo y cantidad de detergente, pH y presencia o no de sustratos o Mn^{2+} , indica que las formas de 570 kDa y mayores pesos moleculares deben ser un complejo funcional con fuertes interacciones entre proteínas. Esta situación no es excepcional en otras proteínas de membrana, incluso muchas que no están relacionadas con la síntesis de glicoproteínas (60).

La GlcNAc-fosfotransferasa muestra cierta tendencia a agregarse, como lo demuestra la dispersión de tamaños que se observa en la cromatografía en columna de Superosa 6, que tiene un rango de inclusión de 5×10^6 a 5 kDa. En ciertas preparaciones se observa exclusivamente la forma de 570 kDa, y en otras está distribuida sobre un espectro bastante amplio de tamaños, desde más de 1.000 kDa hasta unos 400 kDa, con todas las formas presentando aproximadamente la misma actividad. Incluso algunas preparaciones muestran toda la actividad incluyéndose en la columna de Superosa 12, con un peso molecular aparente de unos 240 kDa. La formación de agregados también se observó en la galactosiltransferasa de timo bovino (54), la *N*-acetilglucosaminiltransferasa II de hígado de rata (60), y la *N*-acetilgalactosaminiltransferasa I de glándulas submaxilares porcinas (59).

Cuando se recromatografan, las formas de mayor y de menor tamaño no se interconvierten, lo que descarta que haya un intercambio entre diferentes estados de agregación que coexisten en equilibrio.

La *N*-acetilglucosaminiltransferasa I de hígado de conejo (62) aparece en las preparaciones como dos formas que no fué posible interconvertir: una eluye casi en el V_0 de la columna, y otra está bien incluida. Solo fué posible obtener exclusivamente la forma de menor peso molecular extrayendo las membranas con el detergente octilglucósido, aunque se piensa que se debe a que en este caso solo sea solubilizable la forma de bajo peso molecular. También se excluye de una columna de Sephadex G-200 una galactosiltransferasa de células de tumor ascítico de Ehrlich que por electroforesis en geles desnaturalizantes aparece como una banda de 80 kDa (69).

Otra alternativa es que la asociación de la actividad GlcNAc-fosfotransferasa sea con proteínas que no estén relacionadas a la enzima, o incluso en que sea un artefacto que no tiene existencia *in vivo*, sino que se forme a extraer las membranas con detergentes.

Como alternativa, la GlcNAc-fosfotransferasa se puede sintetizar como una proteína de mayor peso molecular, como aquella de 104 kDa que aparece en algunas preparaciones coincidiendo con la actividad, y las formas de menor peso molecular pueden representar fragmentos proteolíticos que contienen el sitio catalítico. Existe el precedente de una glicosiltransferasa que tiene una forma de alto peso molecular en geles de poliacrilamida con SDS de 160 kDa, con productos proteolíticos que retienen la actividad hasta de 55 kDa (56). Esta posibilidad parece improbable en el caso de la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii*, debido a que incluso las formas de mayor tamaño aparente, que resultan excluidas de la Superosa 12, dan las mismas dos bandas de 82 y 71 kDa que las formas mínimas de 130 kDa aparentes que se obtienen solubilizando las membranas con Triton X-114.

Actividad GlcNAc-fosfotransferasa en C. capitata

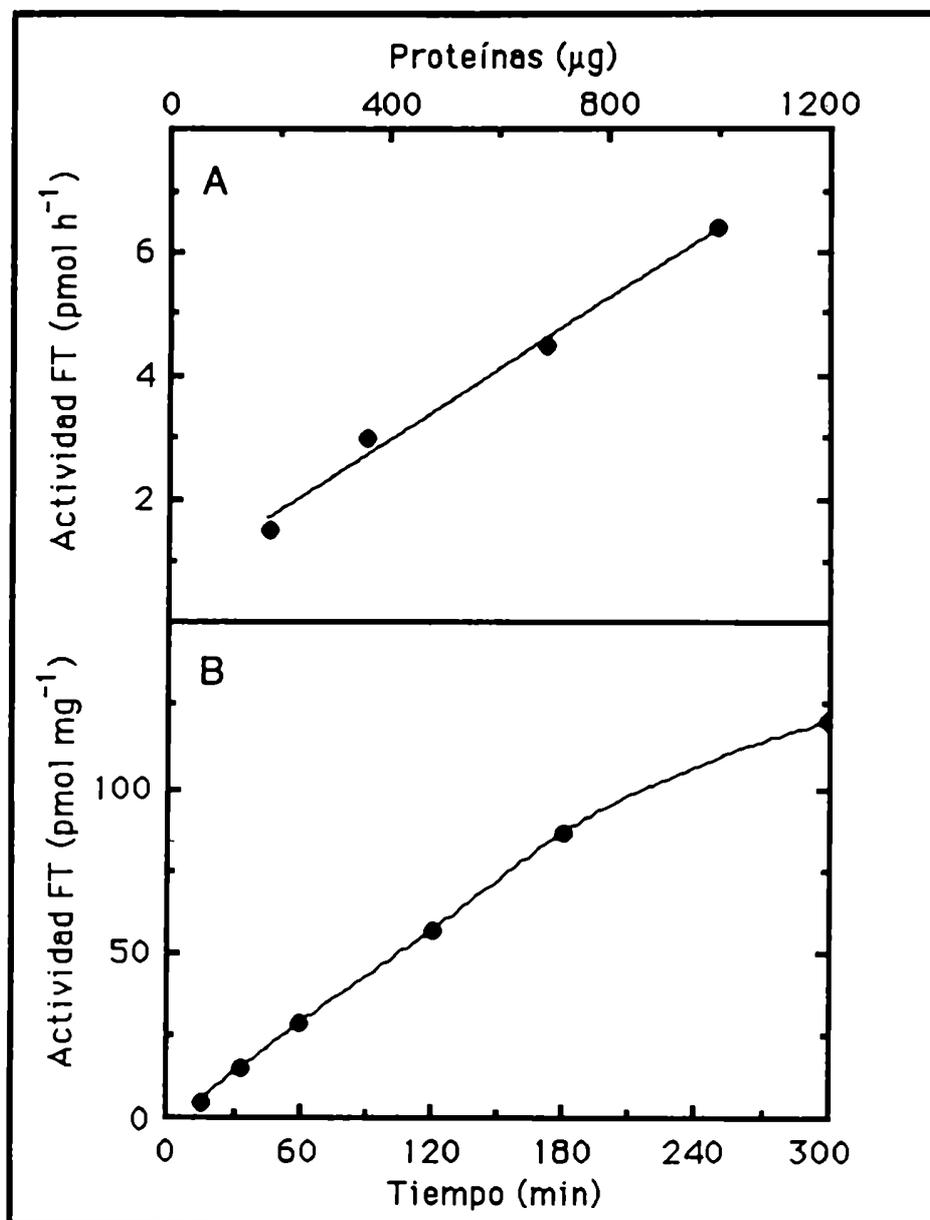
Resultados

Detección de GlcNAc-fosfotransferasa en C. capitata

Para estudiar la presencia de la enzima GlcNAc-fosfotransferasa en membranas de pupas de 6 días de *C. capitata* se utilizó un ensayo de la actividad *in vitro* empleando α -metilmanósido como aceptor exógeno de la *N*-acetilglucosamina-1-fosfato.

La actividad enzimática que se encontró en las membranas microsomales transfiere *N*-acetilglucosamina-1-fosfato a α -metilmanósido a partir de UDP-GlcNAc en forma dependiente del tiempo linealmente hasta tres horas (Figura 13 A), y la cantidad de sustrato transferido fue proporcional a la cantidad de proteínas totales en el extracto microsomal hasta 1 mg (Figura 13 B).

Figura 13 (En la siguiente página): Incorporación de *N*-acetilglucosamina-1-fosfato a α -metilmanósido en función de la cantidad de membranas microsomales de *C. capitata* (Panel A) y del tiempo de incubación (Panel B). El ensayo se realiza como se describe en Procedimientos Experimentales.

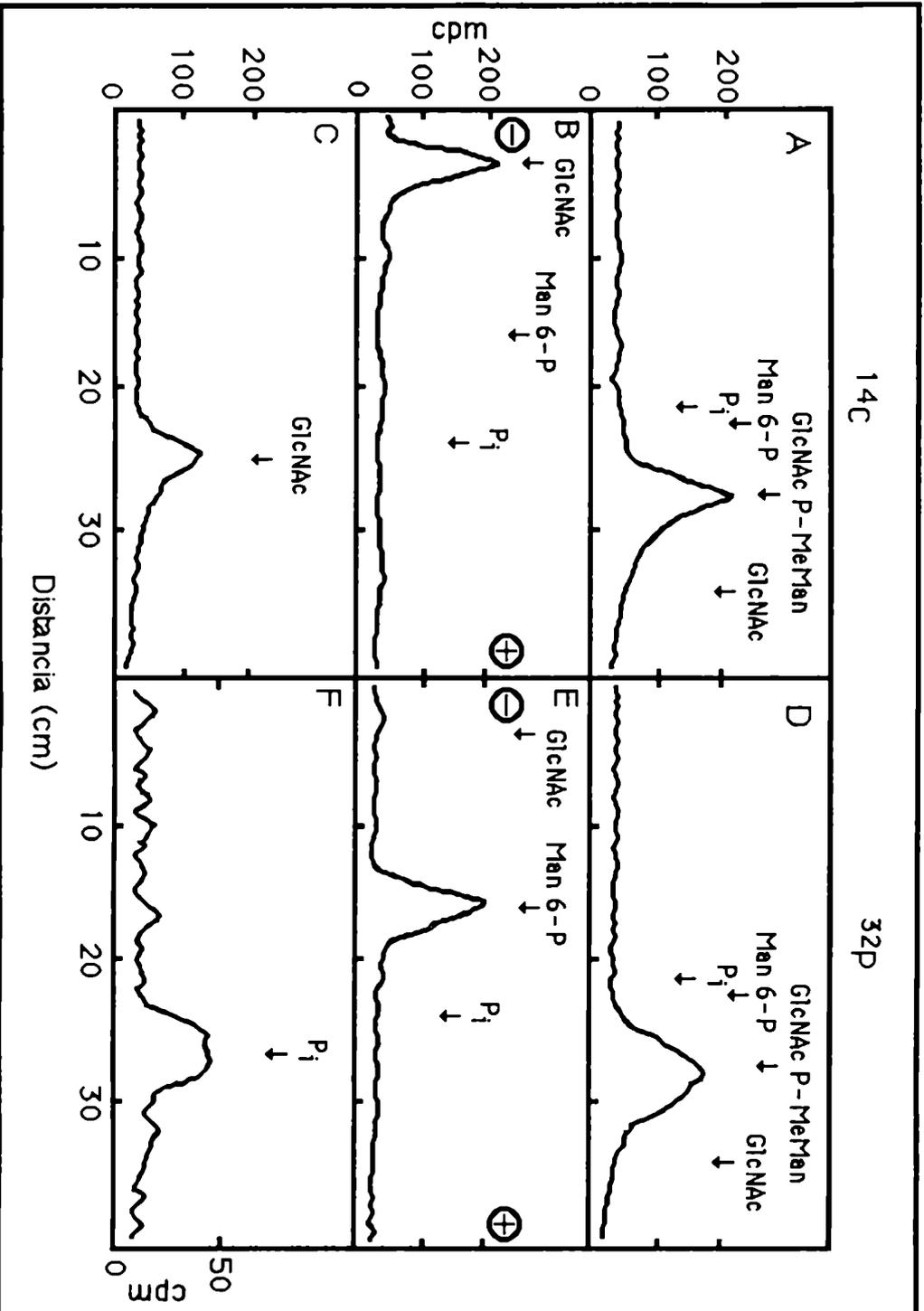


Para investigar la naturaleza del producto de la GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata*, las membranas se incubaron en presencia ya sea de $[\beta^{32}\text{P}]\text{UDP-GlcNAc}$ o $\text{UDP-}^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}$, y α -metilmanósido como sustratos, y el producto de reacción se aplicó a columnas de QAE-Sephadex. El producto que eluyó con NaCl 30 mM se concentró bajo corriente de nitrógeno y se desaló en una columna de Bio-Gel P-2. Los productos marcados con ^{32}P y ^{14}C migraron en una cromatografía en papel desarrollada con el solvente A con el mismo R_f que el $\text{GlcNAc-(}\alpha 1, 6\text{)}^{32}\text{P-(}\alpha 1\text{-metilmanósido)}$, el producto de la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii* en las mismas condiciones, y cuya estructura es conocida (29) (Figuras 14 A y 14 D). Ambos productos se hidrolizaron en medio ácido débil y fueron sometidos a electroforesis en buffer acetato de piridina. El

material marcado con [^{14}C] se comportó como un compuesto neutro (Figura 14 B) mientras que el marcado con [^{32}P] comigró con un estándar de manosa 6-fosfato (Figura 14 E). Cuando los productos marcados resultantes de la hidrólisis ácida se trataron con fosfatasa alcalina y se recromatografiaron en el solvente A, migraron como [^{32}P] y [^{14}C]GlcNAc respectivamente (Figuras 14 C y 14 F).

Es interesante señalar que ni el α -metilglucósido ni el α -metilgalactósido sirvieron como aceptores para la transferencia de GlcNAc-1-fosfato (no se muestran los datos).

Figura 14 (En la página siguiente): Análisis de los productos marcados utilizando α -metilmanósido como aceptor. El ensayo estándar para medir la incorporación de GlcNAc-fosfato a α -metilmanósido se realiza como se describe en Procedimientos Experimentales usando [$\beta^{32}\text{P}$]UDP-GlcNAc o UDP- ^{14}C GlcNAc como dadores del azúcar-fosfato. El producto de reacción fué aislado con una columna de QAE-Sepharosa, desalado en una columna de Bio-Gel P-2 y cromatografiado en el solvente A (Panel A, marca en [^{14}C]; panel D, marca en [^{32}P]). Las sustancias que comigran con GlcNAc-(α 1,6) ^{32}P -(α 1-metilmanósido) (Paneles A y D) se eluyeron, se hidrolizaron en medio ácido débil y los productos se separaron por electroforesis en papel (Panel B, marca en [^{14}C]; panel E, marca en [^{32}P]). El material neutro que comigró con GlcNAc, tal como se muestra en el panel B, se eluyó y se cromatografió en solvente A (Panel C). El material radioactivo que comigró con manosa 6-fosfato (Panel E) se hidrolizó con fosfatasa alcalina y se cromatografió en solvente A (Panel F).



En la Figura 15 A se muestra que el máximo de actividad de la GlcNAc-fosfotransferasa abarcó un rango bastante amplio de pH: entre 6,5 y 7,5 con el óptimo a pH 7,0 en buffer Tris-Maleato. Usando buffer Tris-HCl se observó un comportamiento similar en el rango de pH 7,0 a 8,5. La temperatura óptima de incubación para el ensayo *in vitro* fué de 30 °C para incubaciones de una hora de duración (Figura 15 B).

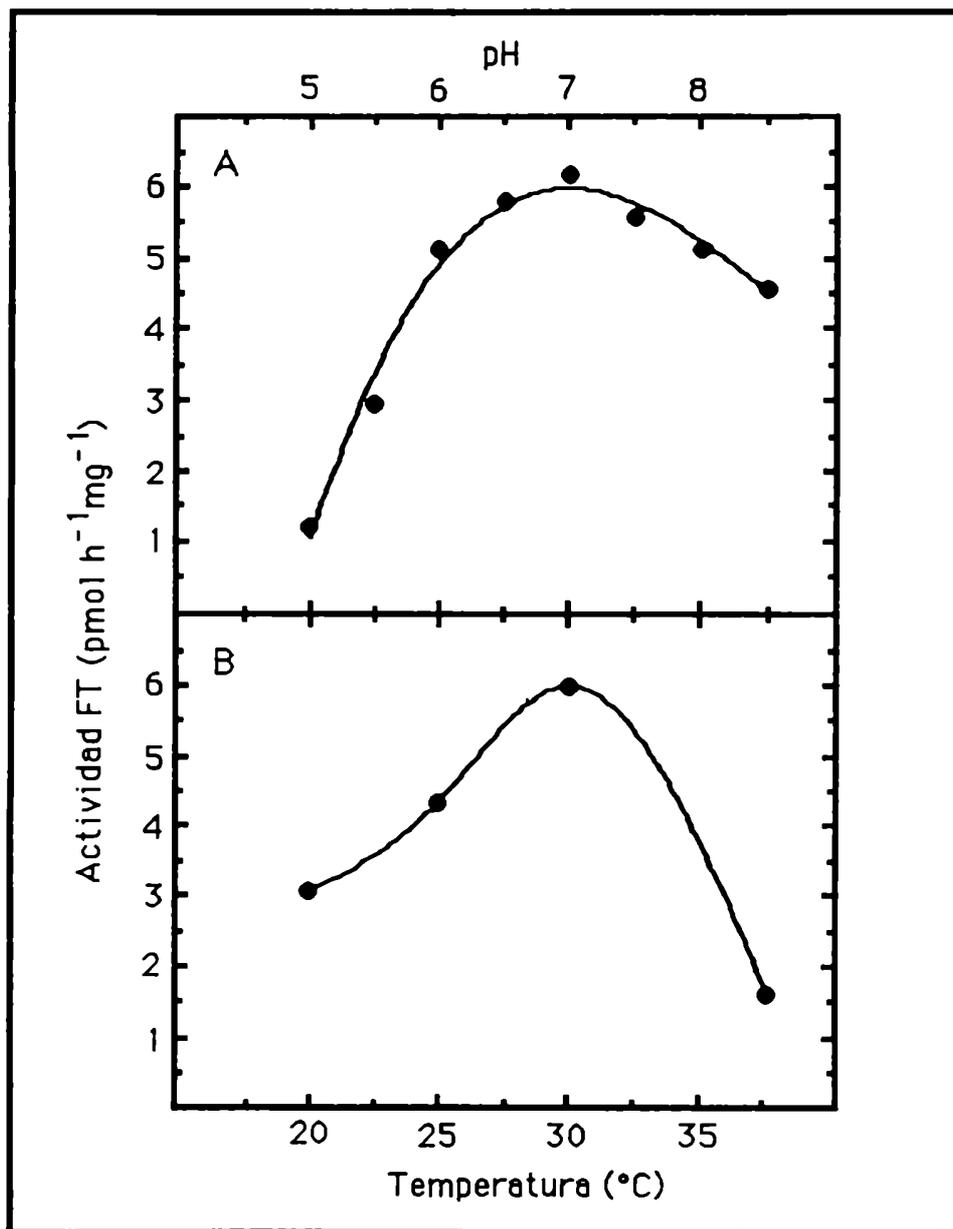


Figura 15: Efecto del pH y de la temperatura cuando se utiliza α -metilmanósido como aceptor. Las velocidades de reacción se determinaron en las condiciones estándar descritas en Procedimientos Experimentales. Panel A: Cada tubo se

incuba al pH indicado. Panel B: Cada tubo fué incubado a la temperatura indicada. Todos los puntos representan la transferencia promedio de duplicados sobre un blanco (sin aceptor) de $0,8 \text{ pmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

La GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata* requiere de cationes divalentes para su actividad, siendo Mn^{2+} 10 mM el doble de eficaz que Mg^{2+} 10 mM (Figura 16).

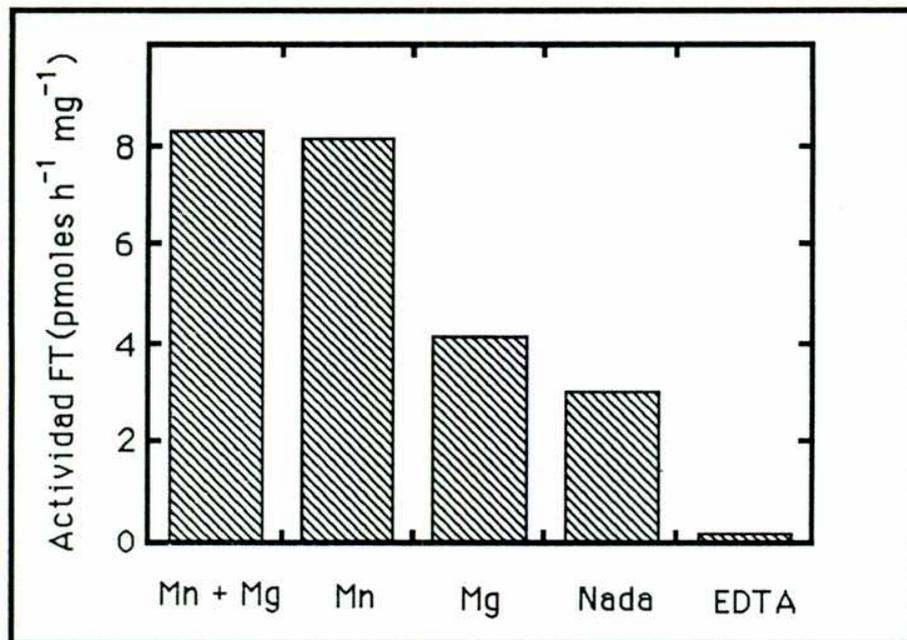


Figura 16: Requerimientos de algunos cationes para la actividad GlcNAc-fosfotransferasa: Se prueban concentraciones 10 mM de cada uno de los iones indicados como cloruros, o EDTA 10 mM a pH 7,0. Las barras representan la incorporación promedio de duplicados una vez deducido el blanco (sin aceptor) de $1,7 \text{ pmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

El K_m aparente para UDP-GlcNAc fué de $21 \text{ }\mu\text{M}$ en presencia de α -metilmanósido 200 mM , y para el α -metilmanósido fué de 150 mM en presencia de UDP-GlcNAc $140 \text{ }\mu\text{M}$ (Figuras 17 A y 17 B).

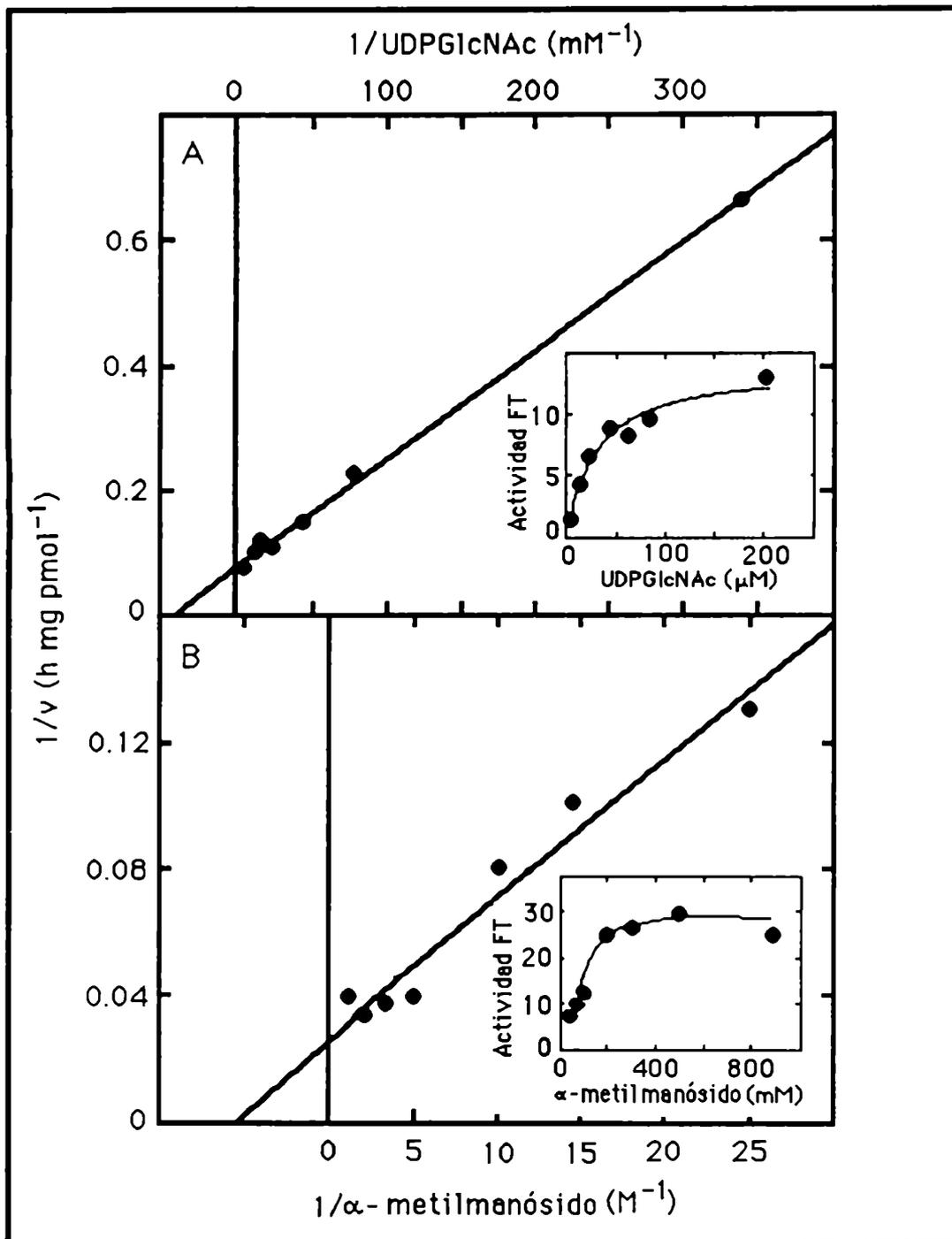


Figura 17: Cinética de la fosforilación en función de la concentración de sustratos. Se incuban las membranas con varias concentraciones de UDP-*N*-acetilglucosamina o α -metilmanósido en presencia de 200 μM α -metilmanósido (Panel A) o 140 μM UDP-*N*-acetilglucosamina (Panel B). En los gráficos principales se muestra la representación de Lineweaver-Burk y en los insertos la de Michaelis.

La GlcNAc-fosfotransferasa es una enzima asociada a membranas

Luego de separadas las membranas microsomales por ultracentrifugación (ver Procedimientos Experimentales), el pellet fué resuspendido en buffer Tris-HCl 50 mM con 2% Triton X-100 y 0,5% desoxicolato de sodio, pH 7,0, y el sobrenadante llevado a la misma concentración final de detergentes. Cuando se enzó la actividad GlcNAc-fosfotransferasa usando α -metilmanósido como aceptor exógeno, el 95–100% de la actividad estuvo en la fracción correspondiente a las membranas (no se muestran los datos).

La uteroferrina sirve como aceptor de UDP-N-Acetilglucosamina-1-Fosfato

Se estudió si la GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata* es capaz de transferir GlcNAc-1-fosfato a alguna enzima lisosomal, eligiéndose como aceptora la uteroferrina. Esta glicoproteína con actividad de fosfatasa ácida se aísla de úteros de cerdos (70), tiene un solo oligosacárido de alta manosa siendo la especie predominante $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (5). Se demostró que la GlcNAc-fosfotransferasa presente en el Golgi de rata, así como la de membranas de *A. castellanii* y de *D. discoideum*, tienen K_m muy bajos para la uteroferrina (21).

Se midió la velocidad de transferencia de GlcNAc-1-fosfato en función de la concentración de uteroferrina y se determinó un K_m ap de 65 μM para esta glicoproteína (Figura 18).

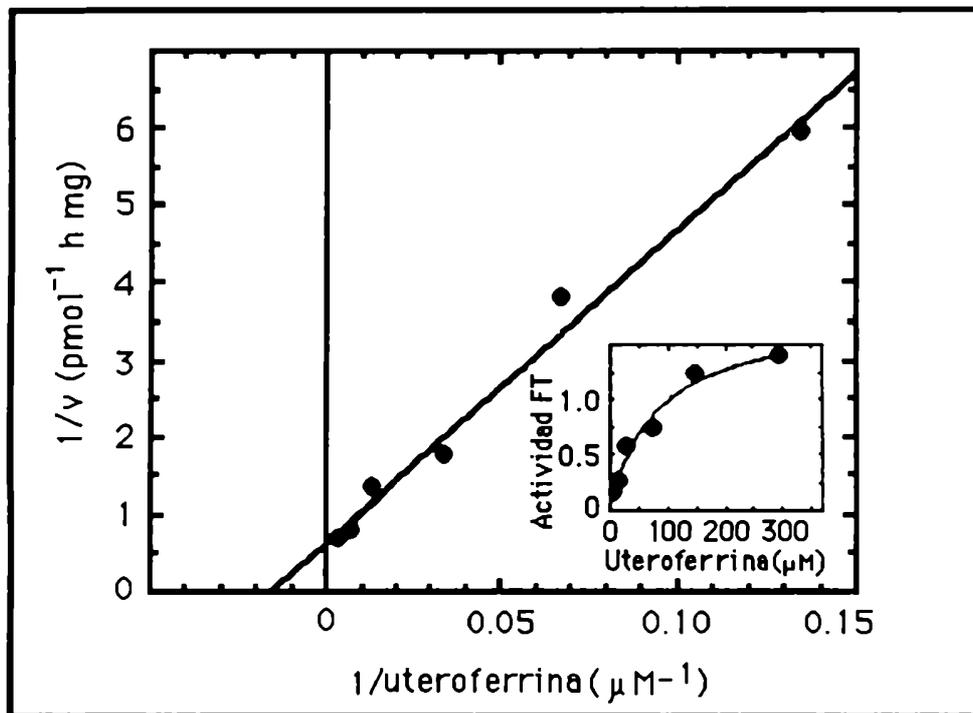


Figura 18: Transferencia de *N* – acetilglucosamina [³²P]fosfato a uteroferrina. Las membranas se incuban como se describe en Procedimientos Experimentales en presencia de 140 μM de UDP-GlcNAc y las concentraciones que se indican de uteroferrina. En el gráfico principal se muestra la representación de Lineweaver-Burk y en el inserto la de Michaelis.

Para probar que la transferencia se realiza sobre las manosas de los oligosacáridos de la uteroferrina, se aislaron los glicopéptidos de alta manosa y se hidrolizaron en medio ácido fuerte como se describe en los Procedimientos Experimentales. El producto de la hidrólisis de cromatografió en papel con acetato de etilo:piridina:ácido acético:agua (5:5:1:3) y el producto marcado con [³²P] comigró con manosa 6-fosfato (no se muestran los datos).

También se probaron otras dos glicoproteínas no lisosomales que tienen oligosacáridos de alta manosa como sustrato para la GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata* : avidina y RNasa B. Ambas mostraron ser aceptores muy pobres para la enzima de mosca y no fue posible determinar los K_m para ninguna de las dos en razón de la extremadamente baja incorporación de GlcNAc-1-³²P que presentaron.

Fosforilación in vitro de glicoproteínas de C. capitata

Se comprobó que esta GlcNAc – fosfotransferasa es capaz de transferir GlcNAc-1-P desde [UDP-GlcNAc a proteínas endógenas de *C. capitata* . Como se describe en los Procedimientos Experimentales, se agregaron pupas completas pulverizadas en mortero en presencia de nitrógeno líquido a las membranas con el objeto de aumentar la concentración de aceptores endógenos. Luego de la incubación, las proteínas se separaron por electroforesis y se pusieron en evidencia las marcadas con [³²P] por autorradiografía (Figura 19 A). Hay dos bandas principales de 62 KD y 39 KD, y otras bandas de menor intensidad, lo que indica que varias proteínas son aceptoras para la GlcNAc-fosfotransferasa *in vitro*.

La banda de 39 KD se cortó del gel y se digirió con proteasa. Los glicopéptidos resultantes se unieron a una columna de Concanavalina A-Sepharosa y se eluyeron con α -metilmanósido, lo que indica que el [³²P] está unido a oligosacáridos de alta manosa. El material marcado con [³²P] que se unió a la lectina se desaló por filtración en gel y se sometió a hidrólisis ácida fuerte. Luego de una electroforesis en papel con buffer de acetato de piridina, la fracción que corrió como manosa 6-fosfato se cromatógrafa en papel con acetato de etilo:piridina:ácido acético:agua (5:5:1:3) como solvente. El producto comigró con un estándar de manosa 6-fosfato (Figura 19 B).

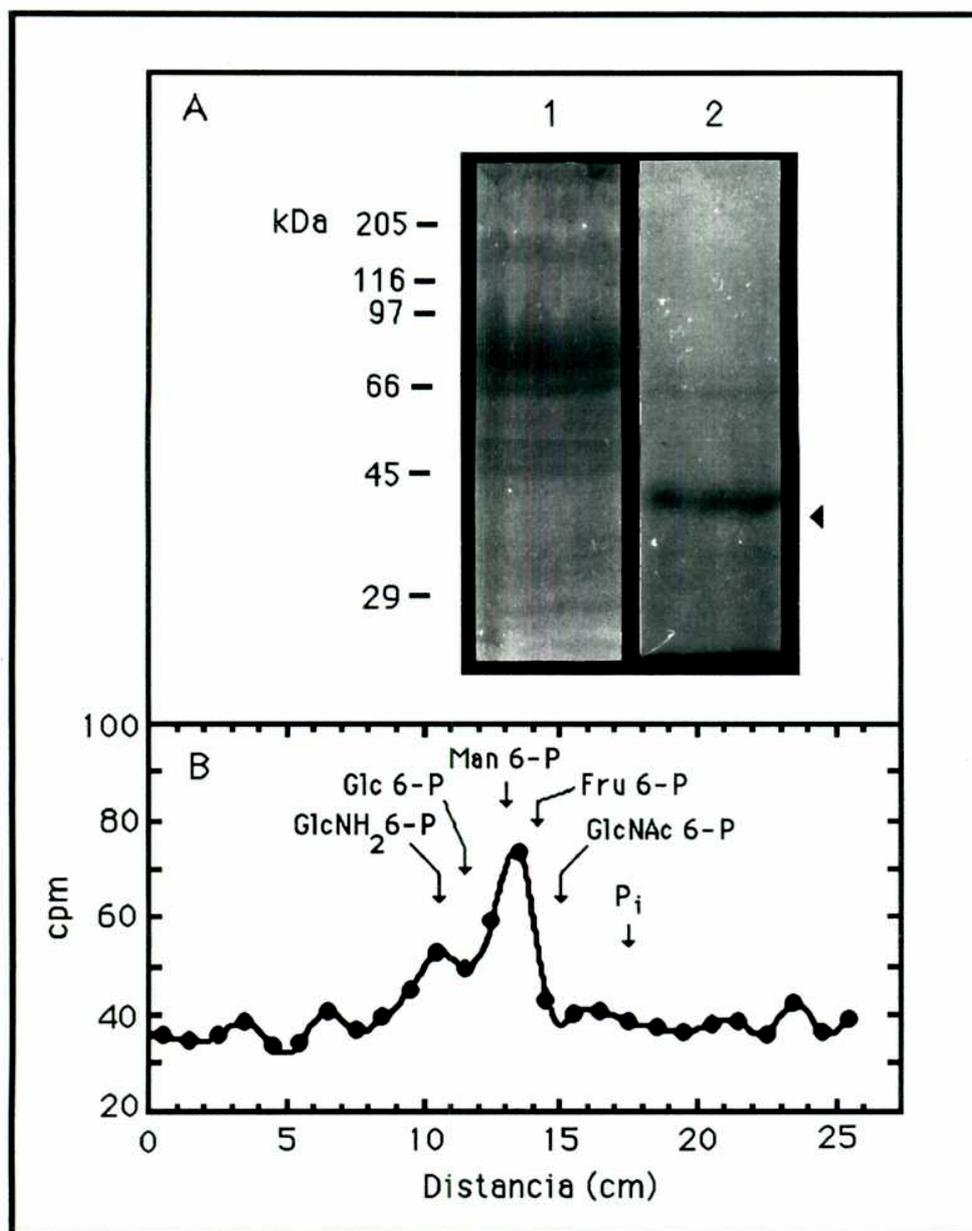


Figura 19: Transferencia de GlcNAc-1-³²P a glicoproteínas de *C. capitata* e identificación del producto. Se incuban 2,4 mg de proteínas solubilizadas de membranas y extracto pupal total como se describe en Procedimientos Experimentales. Panel A: Una alícuota de la mezcla de incubación se precipitó y sus proteínas se separaron por electroforesis. En el carril 1 se muestra el gel teñido para proteínas totales con Coomassie Blue, y el en carril 2 la autorradiografía del gel seco. Panel B: La banda de 39 kDa (señalada con la flecha) se cortó del gel anterior, se digirió con proteasa y los productos solubles se desalaron en una columna de

Bio-Gel P-2, se hidrolizaron en medio ácido fuerte y se cromatografiaron en el solvente B.

Discusión

Para este estudio se usó un sistema de ensayo *in vitro* en la búsqueda de indicios sobre el sistema de transporte de enzimas lisosomales a los lisosomas en insectos. Está bien establecida la existencia de lisosomas en los insectos, pero hasta ahora nada se había descrito sobre el transporte de hidrolasas ácidas hacia esas organelas, ni sobre la presencia de enzimas de la vía metabólica de la manosa 6-fosfato.

Se ha establecido la presencia de una actividad GlcNAc-fosfotransferasa en membranas de pupas de seis días de la mosca mediterránea de la fruta *C. capitata*, capaz de transferir *in vitro* GlcNAc-1-fosfato a α -metilmanósido. Se demostró también que el producto es GlcNAc - (α 1, 6) P - (α 1 - metilmanósido), similar al descrito para otras GlcNAc - fosfotransferasas (29). La transferencia sobre la manosa parece específica ya que la enzima no puede utilizar como sustratos α -metilglucósido ni α -metilgalactósido.

El pH óptimo hallado para la GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata* -7,0- se parece al de la enzima de hígado de rata, que está entre 6,5 y 7,5 en buffer Tris-HCl (29) y al de *A. castellanii*, con mayor actividad a pH 6,5 - 7,0 en el mismo buffer (71). La temperatura óptima para la actividad se asemejó más a la descrita para la enzima de *A. castellanii*, que es de 22-28 °C en condiciones de ensayo semejantes (71). La enzima de hígado de rata, por su parte, tiene una temperatura óptima de 37 °C.

En forma similar a lo descrito para otras GlcNAc-fosfotransferasas -de hígado de rata (19, 72), de *A. castellanii* (71), de linfoblastos humanos (20)-, la enzima de *C. capitata* también requiere de cationes divalentes para expresar su actividad. Contrastando con su efecto sobre la enzima de hígado de rata, Mn^{2+} y Mg^{2+} juntos no fueron más efectivos que Mn^{2+} solo.

La actividad específica de varias preparaciones varió entre 0,006 y 0,012 U mg^{-1} con α -metilmanósido 200 μM como sustrato aceptor, y está entre las más bajas descritas hasta la fecha. Esto contrasta con la actividad de 0,38 U mg^{-1} en membranas solubilizadas de fibroblastos humanos (28) y los 0,52 U mg^{-1} de membranas microsomales de hígado de rata (29).

La baja actividad en membranas de *C. capitata* podría deberse a que la enzima no se ha solubilizado en las mejores condiciones para que se exprese su actividad en el ensayo *in vitro*. Zhao y col. (20) informan que el desoxicolato de sodio tiene efecto inhibitorio sobre la actividad de la GlcNAc-fosfotransferasa de linfoblastos humanos, pero no se ha

encontrado diferencias significativas de actividad en las membranas de *C. capitata* cuando se solubilizaron en buffer con Lubrol PX, o con este detergente más desoxicolato de sodio. La actividad específica baja no arroja necesariamente luz sobre la función de esta enzima en insectos; en membranas solubilizadas de *A. castellanii* la actividad GlcNAc-fosfotransferasa es mayor a 60 U mg^{-1} , y sin embargo no hay pruebas de que en estos microorganismos la enzima sirva para dirigir el tráfico de enzimas lisosomales.

A pesar de su baja actividad específica, la GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata* mostró afinidades similares a las de otras GlcNAc-fosfotransferasas por los sustratos empleados para el ensayo *in vitro*. (Tabla III).

Fuente	K_m ap UDP-GlcNAc μM	K_m ap α - metilmanósido mM	Referencia
<i>C. capitata</i>	21	150	
Linfoblastos humanos	24	117	20
Hígado de rata	38	183	29
<i>A. castellanii</i>	43	568	71
<i>D. discoideum</i>		250	21

Tabla III: Comparación entre los K_m ap de la GlcNAc-fosfotransferasa presente en pupas de seis días de *C. capitata* y las de GlcNAc-fosfotransferasas de otro origen, para el α -metilmanósido y el UDP-GlcNAc.

La GlcNAc-fosfotransferasa de mamíferos es la enzima clave en la vía de la manosa 6-fosfato porque es capaz de discriminar entre las enzimas lisosomales y las que no lo son, reconociendo 200 veces mejor las enzimas lisosomales de otras glicoproteínas no lisosomales conteniendo oligosacáridos de alta manosa similares. Una característica parecida presenta la GlcNAc-fosfotransferasa de *A. castellanii*, que tiene un K_m 30 veces menor para las enzimas lisosomales que para las que no lo son; si bien hay que recordar que no se conoce la función de la enzima en este microorganismo, en el que no se han encontrado la fosfodiéster *N*-acetilglucosaminidasa ni el receptor de manosa 6-fosfato.

La GlcNAc-fosfotransferasa de *C. capitata* *in vitro* es capaz de usar como sustrato glicoproteínas de mamífero exógenas. El K_m aparente para la uteroferrina $-65 \mu\text{M}$ - se

asemeja al de la GlcNAc-fosfotransferasa de hígado de rata, que es 16 μ M (5), y el de la enzima de *A. castellanii*, 59 μ M (71). Por otra parte dos glicoproteínas no lisosomales con oligosacáridos de alta manosa, la RNAsa B y la avidina, fueron malos sustratos para la enzima de insecto.

También se demostró que puede utilizar *in vitro* glicoproteínas endógenas como sustrato, y que la transferencia de GlcNAc-1-fosfato se realiza sobre grupos manosa, como se deduce del hallazgo de manosa 6-fosfato en esas glicoproteínas.

Ya se habían encontrado azúcares-fosfato en algunas glicoproteínas de insecto. Osir y col. los describieron en vitelogenina de *Manduca sexta* (31) y Masuda y Olivera hallaron manosa 6-fosfato en vitelina de *Rhodnius Prolixus* (32). Recientemente, Cho y Raikhel encontraron que el cDNA de una proteasa aspártica lisosomal del mosquito *Aedes aegypti* presenta gran homología con el de las catepsinas D y E. Analizando la secuencia encontraron que presenta un sitio de glicosilación posible, además de una secuencia que en la catepsina está relacionada con el reconocimiento por la GlcNAc-fosfotransferasa y la formación de la manosa 6-fosfato (73).

Aquí se describe por primera vez en insectos e invertebrados pluricelulares la GlcNAc-fosfotransferasa, enzima clave en el tráfico de enzimas lisosomales en mamíferos. Resultados no publicados indican que otro artrópodo, el cangrejo de estuario *Chasmagnatus granulata*, posee una actividad GlcNAc-fosfotransferasa similar. También se encontró manosa 6-fosfato en las glicoproteínas del cangrejo y en una de sus enzimas lisosomales, la α -L-fucosidasa (V. Alvarez, E. Guillén y R.O. Couso, en preparación).

Aunque no hay evidencia directa de que las hidrolasas ácidas de insectos tengan manosa 6-fosfato en sus oligosacáridos de alta manosa, se encontró que hay glicoproteínas de *C. capitata* capaces de actuar como aceptoras *in vitro*, por lo que no se puede descartar que aquí la GlcNAc-fosfotransferasa esté involucrada en el transporte de hidrolasas ácidas a los lisosomas.

Como alternativa se puede suponer que las glicoproteínas fosforiladas por la actividad GlcNAc-fosfotransferasa son proteínas exportadas por las células, como las vitelogeninas, y no las enzimas lisosomales.

Referencias

Referencias

1. Walter P., Gilmore R., y Blobel G. (1985) Protein Translocation Across the Endoplasmic Reticulum. *Cell* **38**, 5-8.
2. Kornfeld S. (1990) Lysosomal Enzyme Targeting. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 367-374.
3. Kornfeld S. (1987) Trafficking of Lysosomal Enzymes. *FASEB J.* **1**, 462-468.
4. von Figura K. y Hasilik A. (1986) Lysosomal Enzymes and their Receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 167-193.
5. Lang L., Reitman M., Tang J., Roberts R. M., y Kornfeld S. (1984) Lysosomal Enzyme Phosphorylation: Recognition of a Protein-dependent Determinant Allows Specific Phosphorylation of Oligosaccharides Present on Lysosomal Enzymes. *J. Biol. Chem.* **259**, 14663-14671.
6. Varki A. y Kornfeld S. (1980) Identification of a Rat Liver α -N-Acetylglucosaminyl Phosphodiesterase Capable of Removing "Blocking" α -N-Acetylglucosamine Residues from Phosphorylated High Mannose Oligosaccharides of Lysosomal Enzymes. *J. Biol. Chem.* **255**, 8398-8401.
7. Varki A. y Kornfeld S. (1981) Purification and Characterization of Rat Liver α -N-Acetylglucosaminyl Phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **256**, 9937-9943.
8. Dahms N. M., Lobel P., y Kornfeld S. (1989) Mannose 6-phosphate Receptors and Lysosomal Enzyme Targeting. *J. Biol. Chem.* **264**, 12115-12118.
9. Waheed A., Pohlmann R., Hasilik A., y von Figura K. (1981) Subcellular Location of Two Enzymes Involved in the Synthesis of Phosphorylated Recognition Markers in Lysosomal Enzymes. *J. Biol. Chem.* **256**, 4150-4152.
10. Reitman M. L. y Kornfeld S. (1981) Lysosomal enzyme targeting: N - Acetylglucosaminyl phosphotransferase Selectively Phosphorylates Native Lysosomal Enzymes. *J. Biol. Chem.* **256**, 11977-11980.
11. Baranski T. J., Faust P. L., y Kornfeld S. (1990) Generation of a Lysosomal Enzyme Targeting Signal in the Secretory Protein Pepsinogen. *Cell* **63**, 281-291.

12. Fischer H. D, Gonzalez-Noriega A., y Sly W. S. (1980) β -Glucuronidase Binding to Human Fibroblast Membrane Receptors. *J. Biol. Chem.* **255**, 5069-5074.
13. Sahagian G. G. Distler J., y Jourdian G. W. (1981) Characterization of a Membrane-Associated Receptor from Bovine Liver that Binds Phosphomannosil Residues of Bovine Testicular β -Galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4289-4293.
14. Hoflack B. y Kornfeld S. (1985) Purification and Characterization of a Cation-Dependent Mannose-6-Phosphate Receptor from Murine P388D₁ Macrophages and Bovine Liver. *J. Biol. Chem.* **260**, 12008-12014.
15. Gonzalez-Noriega A., Grubb J. H., Talkad V., y Sly W. S. (1980) Chloroquine Inhibits Lysosomal Enzyme Pinocytosis and Enhances Lysosomal Enzyme Secretion by Impairing Receptor Recycling. *J. Cell Biol.* **85**, 839-852.
16. Brown W. J., Goodhouse J., y Farquar M. G. (1986) Mannose-6-Phosphate Receptors for Lysosomes Enzymes Cycle Between the Golgi Complex and Endosomes. *J. Cell Biol.* **103**, 1235-1247.
17. Vladutiu G. D. y Rattazzi M. (1979) Excretion-reuptake Route of β -Hexosaminidase in Normal and I-Cell Disease Cultured Fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **63**, 595-601.
18. Reitman M. L. y Kornfeld S. (1981) UDP - N - Acetylglucosamine : Glycoprotein N - Acetylglucosamine - 1 - phosphotransferase: Proposed Enzyme for the Phosphorylation of the High Mannose Oligosaccharides Units of Lysosomal Enzymes. *J. Biol. Chem.* **256**, 4275-4281.
19. Waheed A., Hasilik A., y von Figura K. (1982) UDP-N - acetylglucosamine : Lysosomal Enzyme Precursor N - Acetylglucosamine - 1 - phosphotransferase. Partial Purification and Characterization of the Rat Liver Golgi Enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**, 12322-12331.
20. Zhao K., Yhe R. y Miller A. L. (1992) Purification and Characterization of Human Lymphoblast N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *Glycobiology* **2**, 119-125.
21. Lang L., Couso R. O. y Kornfeld S. (1986) Glycoprotein Phosphorylation in Simple Eucaryotic Organisms. Identification of UDP-GlcNAc:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase Activity and Analysis of Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **261**, 6320-6325.

-
22. Cazzulo J. J., Hellman U., Couso R., y Parodi A. J. (1990) Aminoacid and Carbohydrate Composition of a Lysosomal Cysteine Proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of Phosphorylated Mannose Residues. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 41-48.
 23. Gaudreault P. y Beevers L. (1984) Protein Bodies and Vacuoles as Lysosomes: Investigations into the Role of Mannose 6-Phosphate in Intracellular Transport of Glycosidases in Pea Cotyledons. *Plant Physiol.* **76**, 228-232.
 24. Jhonson L. M., Bankaitis V. A., y Emr S. D. (1987) Distinct Sequence Determinants Direct Intracellular Sorting and Modification of a Great Vacuolar Protease. *Cell* **48**, 875-885.
 25. Valls L. A., Hunter C. P., Rothman J. H., y Stevens T. H. (1987) Proteing Sorting in Yeast: The Localization Determinant of Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Resides in the Propeptide. *Cell* **48**, 887-897.
 26. Tague B. W. y Chrispeels M. J. (1987) The Plant Vacuolar Protein, Phytohemagglutinin, is Transported to the Vacuole of Transgenic Yeast. *J. Cell Biol.* **105**, 1971-1979.
 27. Reitman M. L., Varki A., y Kornfeld S. (1981) Fibroblasts from Patients with I-Cell Disease and Pseudo-Hurler Polydystrophy Are Deficient in Uridine 5' - Diphosphate - N - Acetylglucosamine: Glycoprotein N - Acetylglucosaminylphosphotransferase Activity. *J. Clin. Invest.* **67**, 1574-1579.
 - 28 Varki A. P., Reitman M. L., y Kornfeld S. (1981) Identification of a Variant of Mucopolidosos III (Pseudo Hurler Polydystrophy): A Catalitic Active N-Acetylglucosaminyl-Phosphotransferase that Fails to Phosphotylate Lysosomal Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7773-7777.
 29. Reitman M. L., Lang L., y Kornfeld S. (1984) UDP-N - Acetylglucosamine : Lysosomal Enzyme N -Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase. *Methods Enzymol.* **107**, 163-172.
 30. Ketcham C.M. y Kornfeld S. (1992) Purification of UDP - N - Acetylglucosamine : Glycoprotein N - Acetylglucosamine - 1 - Phosphotransferase from *Acanthamoeba castellanii* and Identification of a Subunit of the Enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**, 11645-11653.

-
31. Osir E.O., Anderson D.R., Grimes W.J., y Law J.H. (1986) Studies on the Carbohydrate Moety of Vitellogenin from the Tobacco Hornworm *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **16**, 471-478.
 32. Masuda H., y Olivera P.L. (1985) Characterization of Vitellin and Vitellogenin from *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* **15**, 543-550.
 33. Korn E. D. (1974) The Isolation of the Amoeba Plasma Membrane and the Use of Latex Beads for the Isolation of Phagocytic Vacuole (Phagosome) Membranes from Amoebae Including the Culture Techniques for Amoebae. *Methods Enzymol.* **XXXI**, 686-698.
 34. Timmons T. M. y Dunbar B. S. (1990) Protein Blotting and Immunodetection. *Methods Enzymol.* **182**, 679-688.
 35. Harlow E. y Lane D. (1988) Antibodies. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor (Ed.)* 494.
 36. Faye L. y Chrispeels M.J. (1985) Characterization of *N*-Linked Oligosaccharides by Affinoblotting with Concanavalin A-Peroxidase and Treatment of the Blots with Glycosidases. *Anal. Biochem.* **149**, 218-224.
 37. Lang L. y Kornfeld S. (1984) A Simplified Procedure for Synthesizing Large Quantities of Highly Purified Uridine [$\beta^{32}\text{P}$] Diphospho-*N* -Acetylglucosamine. *Anal. Biochem.* **14**, 264-269.
 38. Paladini A. C. y Leloir L. F. (1952) Studies on Uridine-Diphosphate-Glucose. *Biochem. J.* **51**, 426-430.
 39. Bray G. A. (1984) A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aqueous Solutions in a Liquid Scintillation Counter. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279-285.
 40. Couso R., Lang L., Roberts R. M., y Kornfeld S. (1986) Phosphorylation of the Oligosaccharide of Uteroferrin by UDP-GlcNAc:Glycoprotein *N* - Acetylglucosamine-1-phosphotransferase from Rat Liver, *Acanthamoeba castelanii*, and *Dictyostelium discoideum* Requires α 1,2-Linked Mannose Residues. *J. Biol. Chem.* **261**, 6326-6331.

41. Laëmli U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685:
42. Oakley B. R., Kirsh D. R., y Morris N. R. (1980) A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* **105**, 361-363.
43. Reitman M. L. y Kornfeld S. (1981) UDP-N-Acetylglucosamine:Glycoprotein N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase: Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* **265**, 4275-4281.
44. García R. C., Recondo E., y Dankert M. (1974) Polysaccharide Biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. Enzymatic Synthesis of Lipid Diphosphate and Monophosphate Sugars. *Eur. J. Biochem.* **43**, 93-105.
45. Lowry O. H., Rosebrough A., Farr A. L., y Randall R. J. (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
46. Peterson G. L. (1983) Determination of Total Protein. *Methods Enzymol.* **91**, 95-119.
47. Rabossi A., Bocaccio G. L., Wappner P., y Quesada - Allue L. A. (1991) Morphogenesis and Cuticular Markers During the Larval-Pupal Transformation of the Medfly *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. Appl.* **60**, 135-141.
48. Quesada-Allué L. A., y Belocopitow E. (1978) Lipid-bound Oligosaccharides in Insects. *Eur. J. Biochem.* **88**, 529-541.
49. Liener I.E., Sharon N., y Goldstein I.J. (1986) The Lectins. p. 103-115 Academic Press.
50. Hjelmeland L. M. y Chrambach A. (1984) Solubilization of Functional Membrane Proteins. *Methods Enzymol.* **104**, 305-318.
51. Wong R. K. M., Nichol C. P., Sekar M .C y Roufogalis B. D. (1987) The Efficiency of Various Detergents for Extraction and Stabilization of Acetylcholinesterase from Bovine Erythrocytes. *Biochem. Cell Biol.* **65**, 8-18.
52. Tanford C. y Reynolds J. (1976) Characterization of Membrane Proteins in Detergent Solutions. *Biochem. Biophys. Acta* **457**, 133-170.

-
53. Helenius A. and Simons K. (1975) Solubilization of Membrane Proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **415**, 29-79.
 54. Biosynthesis of Terminal Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R Oligosaccharide Sequences on Glycoconjugates. Purification and Acceptor Specificity of a UDP-Gal:*N*-acetillactosaminide α 1,3-Galactosyltransferase from Calf Thymus (1985) Blanken W. M., y Van den Eijnden D. H. *J. Biol. Chem.* **260**, 12927-12934.
 55. Sadler J. E., Rearick J. I., Paulson J. C., y Hill R. L. (1979) Purification to Homogeneity of a β -galactoside α 2,3 Sialyltransferase and Partial Purification of an α -*N* - acetylgalactosaminide α 2,6 Sialyltransferase from Porcine Submaxillary Glands. *J. Biol. Chem.* **254**, 4434-4443.
 56. Sadler J. E., Rearick J. I., y Hill R. L. (1979) Purification to Homogeneity and Enzymatic Characterization of an α -*N*-Acetylgalactosaminide α 2,6 Sialyltransferase from Porcine Submaxillary Glands. *J. Biol. Chem.* **254**, 5934-5941.
 57. Weinstein J., de Souza e Silva U., y Paulson J. (1982) Purification of a Gal β 1,4 GlcNAc α 2,6 Sialyltransferase and a Gal β 1,3 (4) GlcNAc α 2,3 Sialyltransferase to Homogeneity from Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **257**, 13835-13844.
 58. Oppenheimer C. L. y Hill R. L. (1981) Purification and Characterization of a Rabbit Liver α 1,3 Mannoside β 1,2 *N* - Acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **256**, 799-804.
 59. Schwyzer M y Hill R. L. (1977) Porcine A Blood Group - specific *N* - acetylgalactosaminyltransferase. I. Purification from Porcine Submaxillary Glands. *J. Biol. Chem.* **252**, 2338-2345.
 60. Bendiak B. y Schachter H. (1987) Control of Glycoprotein Synthesis. Purification of UDP-*N* -Acetylglucosamine: α -D-Mannoside β 1-2 *N* -Acetylglucosaminyltransferase II from Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **262**, 5775-5783.
 61. Joziase D. H., Bergh M. L. E., ter Hart H. G. J., Koppen P. L., Hooghwinkel G. J. M., y Van den Eijnden D. H. (1985) Purification and Enzymatic Characterization of CMP-sialic Acid: β -galactosyl 1,3-*N*-Acetylgalactosaminide α 2,3-Sialyltransferase from Human Placenta. *J. Biol. Chem.* **260**, 4941-4951.

62. Nishikawa Y., Pegg W., Paulsen H., y Schachter H. (1988) Control of Glycoprotein Synthesis. Purification and Characterization of Rabbit Liver UDP - *N* - Acetylglucosamine : α - 3-D-Mannoside β -1,2-*N* -Acetylglucosaminyltransferase I. *J. Biol. Chem.* **263**, 8270-8281.
63. Nishikawa A., Ihara Y., Hatakeyama M., Kangawa K., y Taniguchi N. (1992) Purification, cDNA Cloning, and Expression of UDP-*N* -acetylglucosamine: β -1,4 *N*-Acetylglucosaminyltransferase III from Rat Kidney. *J. Biol. Chem.* **267**, 18199-18204.
64. Weinstein J., Lee E. U., McEntee K., Lai P. H., y Paulson J. C. (1987) Primary Structure of β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase. Conversion of Membrane-bound Enzyme to Soluble Forms by Cleavage of the NH₂-terminal Signal Anchor. *J. Biol. Chem.* **262**, 17735-17743.
65. Wescott K. R., Wolf C. C., y Hill R. L. (1985) Regulation of β -D-Galactoside α 2,3 Sialyltransferase Activity. The Effects of Detergents and Lyso phosphatidates. *J. Biol. Chem.* **260**, 13109-13115.
66. Paulson J. C., Beranek W. E., y Hill R. L. (1977) Purification of a Sialyltransferase from Bovine Calostrum by Affinity Chromatography on CDP-agarose *J. Biol. Chem.* **252**, 2356-2362.
67. Prieels J. P., Monnom D., Dolmans M., Beyer T. A., y Hill R. L. (1981) Co-purification of the Lewis Blood Group *N* - Acetylglucosaminide α 1,4 Fucosyltransferase and an *N* - Acetylglucosaminide α 1,3 Fucosyltransferase from Human Milk *J. Biol. Chem.* **256**, 10456-10463.
68. Andrews P. (1965) The Gel-filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range. *Biochem. J.* **96**, 595-605.
69. Elices M. J., Blake D. A. y Goldstein I. J. (1986) Purification and Characterization of a UDP-Gal: β -D-Gal(1,4)-D-GlcNAc α (1,3)-Galactosyltransferase from Ehrlich Ascites Tumor. *J. Biol. Chem.* **261**, 6064-6072.
70. Schlösnagle D.C., Bazer F.W., Tsibris J.C.M., y Roberts R.M. (1974) An iron-containing Phosphatase Induced by Progesterone in the Uterine Fluids of Pigs. *J. Biol. Chem.* **249**, 7574-7579.

71. Ketcham C.M. y Kornfeld S. (1992) Characterization of UDP-*N*-Acetylglucosamine : Glycoprotein *N*-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* **267**, 11654-11659.
72. Reitman M.L. y Kornfeld S. (1981) UDP-*N*-Acetylglucosamine:Glycoprotein *N*-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase: Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* **265**, 4275-4281.
73. Cho W. y Raikhel A.S. (1992) Cloning of cDNA for Mosquito Lysosomal Aspartic Protease. Sequence Analysis of an Insect Lysosomal Enzyme Similar to Cathepsins D and E. *J. Biol. Chem.* **267**, 21823-21829.