

Tesis de Posgrado

La UDP-Glc: Glicoproteína glucosiltransferasa es un sensor del plegamiento de glicoproteínas : Estudio de su especificidad

Sousa, Marcelo Carlos

1995

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:

Sousa, Marcelo Carlos. (1995). La UDP-Glc: Glicoproteína glucosiltransferasa es un sensor del plegamiento de glicoproteínas : Estudio de su especificidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2732_Sousa.pdf

Cita tipo Chicago:

Sousa, Marcelo Carlos. "La UDP-Glc: Glicoproteína glucosiltransferasa es un sensor del plegamiento de glicoproteínas : Estudio de su especificidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2732_Sousa.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**LA UDP-GLC:GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASA
ES UN SENSOR DEL PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS.
ESTUDIO DE SU ESPECIFICIDAD**

AUTOR: Marcelo Carlos Sousa

DIRECTOR: Armando J. Parodi

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
Fundación Campomar

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

- 1995 -

182

AGRADECIMIENTOS

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

A los profesores y miembros del Instituto que me brindaron su consejo y ayuda, en particular al Dr. Ricardo A. Wolosiuk.

A Susana Raffo y Ami Curto por su invaluable ayuda.

Al Dr. Mario Ermácora y al Dr. Robert O. Fox por su desinteresada colaboración.

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

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

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

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
El Retículo Endoplásmico como compartimiento de plegamiento de proteínas.	4
Condiciones dentro del RE.....	4
Factores que facilitan el plegamiento de proteínas en el RE.	5
N-Glicosilación de proteínas en el RE	8
La glicosilación y el procesamiento de los oligosacáridos afecta el plegamiento, secreción y degradación de proteínas en el RE.	12
Los oligosacáridos unidos a proteína son transitoriamente glucosilados en el RE.	14
Las glicoproteínas mal plegadas sufren ciclos de deglucosilación y reglucosilación en el RE.	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Materiales	19
Standards radioactivos	19
Preparación de Glicopéptidos de tipo alta manosa	20
Preparación de las lectinas	20
Métodos.	20
Preparación de Microsomas	21
Preparación de glucosiltransferasa soluble de hígado de rata	21
Purificación de UDP-Glcglicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata	21
Extracción.....	21
DEAE-celulosa.....	22
Con A-Sepharosa	22
Mono Q.....	22
Fenil-Superosa	22
Ensayos con glucosiltransferasa	23
Ensayo Standard de Glucosiltransferasa.....	23
Influencia de la secuencia de los oligosacáridos en la velocidad de glucosilación	23
Desnaturalización de glicoproteínas	24
Espectros de fluorescencia y absorbancia	24
Degradaciones con tripsina	24

Reducción de tiroglobulina	25
Tratamiento de glicoproteínas con Endo H.....	25
Tratamiento de glicoproteínas con α -manosidasa.....	25
Tratamiento de SBA con N-glicanasa/Endoglicosidasa F	25
Acoplamiento de glicopéptidos a β -lactoglobulina.....	25
Acoplamiento de glicopéptidos a la nucleasa de <i>Staphylococcus</i>	26
Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano	26
Proteólisis limitada de especies glicosiladas de la nucleasa de <i>Staphylococcus</i>	27
Renaturalización de SBA	27
Tratamientos realizados sobre aglutinina de soja (SBA)	27
Tratamiento con anhídrido acético.....	27
Tratamiento con anhídrido succínico	27
Tratamiento con cianato de potasio	28
Tratamiento con Iodo	28
Tratamiento con tetranitrometano	28
Tratamiento con ciclohexanodiona	28
Interacción de la glucosiltransferasa con péptidos hidrofóbicos.....	28
Marcado de péptidos con [¹²⁵ I]NaI	29
Unión de la glucosiltransferasa a péptidos hidrofóbicos	29
Actividad de la nucleasa de <i>Staphylococcus</i>	30
RESULTADOS	31
Influencia de la secuencia primaria de los oligosacáridos en la velocidad de glucosilación.....	31
Efecto de la desnaturalización en la capacidad aceptora de las glicoproteínas	36
Capacidad aceptora de glicopéptidos obtenidos por digestión con Pronasa	37
Glucosilación de glicopéptidos derivados de glicoproteínas tripsinizadas.....	40
Accesibilidad de oligosacáridos tipo alta manosa en glicoproteínas nativas.....	42
Efecto de azúcares y glicoproteínas deglicosiladas en la reacción de glucosilación.....	45
La glucosiltransferasa es inhibida por glicoproteínas desnaturalizadas y deglicosiladas con Endo H, pero no por proteínas desnaturalizadas	48
La UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa interactúa con el residuo mas interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos	49
El efecto inhibitorio de las glicoproteínas tratadas con Endo H depende de su estructura	53

Los elementos proteicos reconocidos por la glucosiltransferasa también se encuentran presentes en las proteínas desnaturalizadas.....	54
La UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa es un sensor sensible de diferencias en la estructura terciaria de glicoproteínas.	56
Paralelo entre la capacidad aceptora de una glicoproteína y su estado de plegamiento.	61
Glucosilación de glicoproteínas conteniendo aminoácidos químicamente modificados.	63
La UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa interactúa con aminoácidos hidrofóbicos.	67
DISCUSIÓN	72
REFERENCIAS	81

Abs: absorbancia
 β Lg: β -lactoglobulina
BSA: seroalbúmina bovina
ConA: concanavalina A
CHD: ciclohexanodiona
Dol: dolicol
Dol-P: dolicol fosfato
Dol-P-P: dolicol difosfato
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
Endo H: Endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
Endo F: Endo- β -N-acetilglucosaminidasa F
Fig: figura
PDI: proteína disulfuro isomerasa
pdTp: 3',5' difosfotimidina
PHA: aglutinina de porotos comunes
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
POPOP: 2,2-p-fenilenbis-5-fenil oxazol
PPO: 2,5-difeniloxazol
Prot: proteína
RE: retículo endoplásmico
RNAsa: ribonucleasa
SBA: aglutinina de porotos de soja
SNAsa: nucleasa de *Staphylococcus*
TCA: ácido tricloroacético
TFA: ácido trifluoroacético
Tg: tiroglobulina
TLCK: tosil-lisil-clorometilcetona
TNM: tetranitrometano
TPCK: tosil-fenilalanil-clorometilcetona

RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es el compartimiento de síntesis, modificación post-traducciona l y plegamiento de proteínas y glicoproteínas que serán destinadas a secreción, membrana plasmática o distintas organelas de los sistemas endocítico y exocítico. Una de las modificaciones post-traduccionales mas frecuentes, la N-glicosilación, está relacionada con el plegamiento de las proteínas ya que sin la adición de los oligosacáridos, numerosas proteínas son incapaces de alcanzar su conformación nativa.

En general, los intermediarios de plegamiento, las proteínas no totalmente ensambladas, las proteínas mal plegadas y los agregados son selectivamente retenidos en el RE. El transporte hacia el aparato de Golgi ocurre solamente cuando las proteínas se han plegado correctamente y se han ensamblado para el caso de los multímeros. Este importante fenómeno, que asegura la integridad funcional de las proteínas que salen del RE, ha sido denominado "control de calidad" del RE. Para el caso de las glicoproteínas la estructura o grado de procesamiento de sus oligosacáridos ha sido postulado como una señal para la retención o el transporte de las mismas.

La N-glicosilación comienza en la mayoría de los eucariotas con la transferencia de un oligosacárido de estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde un intermediario lipídico (dolicol-P-P-oligosacárido), a proteínas nacientes en el RE. Inmediatamente luego de la transferencia, los tres residuos de glucosa son removidos por las glucosidasas I y II. Es importante notar que no se encuentran residuos de glucosa unidos a los oligosacáridos de proteínas maduras.

Parodi y colaboradores demostraron que los oligosacáridos unidos a proteína son transitoriamente reglucosilados dentro del RE mediante la acción de la enzima UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. Esta enzima fue purificada a homogeneidad a partir de hígado de rata y de *Schizosaccaromyces pombe*, y demostró ser una proteína soluble del RE que depende del Ca^{2+} para su actividad y que utiliza UDP-Glc como dador de glucosa. En cuanto a la glicoproteína aceptora, en un ensayo libre de células, ésta debe estar desnaturalizada para funcionar eficientemente como aceptor.

Experimentos presentados en este trabajo de Tesis demuestran que el efecto de la desnaturalización no se debe a que esta vuelve accesibles los oligosacáridos que pudieran estar no disponibles en la estructura nativa. Por el contrario, la enzima reconoce en el esqueleto proteico elementos expuestos en las conformaciones desnaturalizadas pero no en las nativas de las glicoproteínas.

Al mismo tiempo el grado de procesamiento de los oligosacáridos por α -manosidasas del RE, modula la capacidad aceptora de las glicoproteínas ya que los oligosacáridos $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ fueron glucosilados con velocidades del 15 y 50 % respectivamente de la velocidad con que se glucosiló el $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

Un estudio detallado de las bases moleculares del reconocimiento de glicoproteínas desnaturalizadas por la glucosiltransferasa permitió establecer que: (a) No existe ninguna secuencia consenso de aminoácidos que sea reconocida por la enzima. (b) La glucosiltransferasa reconoce el residuo más interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos de las glicoproteínas sustrato. Esto le permite distinguir entre glicoproteínas desnaturalizadas y proteínas desnaturalizadas dado que las proteínas no contienen este residuo. (c) La glucosiltransferasa interactúa con aminoácidos hidrofóbicos. Esto y otros datos mostrados, sugiere que los residuos hidrofóbicos expuestos en las conformaciones no nativas de las glicoproteínas podrían ser el otro elemento reconocido por la enzima para seleccionar estas estructuras. (d) La capacidad aceptora de las glicoproteínas disminuye a medida que éstas adquieren estructura nativa.

A. Helenius ha propuesto recientemente un modelo en el cual la calnexina (una proteína de membrana del RE), la glucosidasa II y la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa forman parte del mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE.

De acuerdo al mencionado modelo, las glicoproteínas serían deglucosiladas por la glucosidasa II y, si no se encuentran correctamente plegadas, sufrirían una reglucosilación catalizada por la glucosiltransferasa. La calnexina es capaz de unir glicoproteínas con oligosacáridos monoglucosilados, por lo tanto, las glicoproteínas no plegadas serían unidas por la calnexina siendo retenidas dentro del RE dado que la calnexina es una proteína de membrana. Este ciclo continuaría hasta que las glicoproteínas adquieren sus estructuras terciarias nativas. En estas condiciones dejarían de ser sustrato de la glucosiltransferasa y solo serían sustrato de la glucosidasa II que las liberaría del residuo de glucosa y por lo tanto de la interacción con la calnexina permitiendo su salida del RE.

La glucosiltransferasa tendría un rol fundamental dentro de este modelo ya que sería el sensor de la estructura de las glicoproteínas, marcándolas o no con el residuo de glucosa que determinará su unión a la calnexina.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados en:

“Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase”

Sousa, M., Ferrero García, M. A., and Parodi, A. J. (1992) *Biochemistry* 31, 97-105

“The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase”

Sousa, M., and Parodi, A. J. (1995) *The EMBO Journal*, en prensa

INTRODUCCIÓN

El Retículo Endoplásmico como compartimiento de plegamiento de proteínas.

En una célula eucariota la mayoría de los polipéptidos son traducidos en el citosol, sin embargo, varios de ellos se pliegan y ensamblan para dar proteínas funcionales solo luego de ser transportados a otros compartimentos subcelulares. Estos compartimientos incluyen mitocondria, cloroplasto, peroxisomas y el retículo endoplásmico (RE). Por lo general, el plegamiento ocurre en el compartimiento que será la residencia final del polipéptido. En este aspecto el RE se presenta como una excepción ya que es responsable de la biosíntesis y del plegamiento de proteínas y glicoproteínas que serán destinadas a secreción, membrana plasmática o que serán transportadas a las distintas organelas de los sistemas endocíticos y exocíticos.

En algunos tipos celulares, la producción diaria de proteínas del RE excede la masa de la propia célula. Varias de estas proteínas son complejos multiméricos de varios cientos de kDa de masa molecular. El RE es responsable no solamente de la síntesis de estas proteínas, sino también de su plegamiento, ensamblado, modificación post-traduccional, transporte y eventualmente también de su degradación. El reciente progreso hecho en el campo del plegamiento de proteínas ha permitido la comprensión de algunos de los mecanismos a través de los cuales el RE lleva a cabo sus múltiples funciones.

Condiciones dentro del RE

El lumen del RE constituye un medio que es intermedio entre el citosol y el espacio extracelular. La concentración de Ca^{2+} es del orden milimolar, aproximándose a los valores medidos extracelularmente. La maduración de varias proteínas es dependiente del Ca^{2+} en el RE (1, 2). La concentración de otros electrolitos es similar a la del citosol y el pH en el lumen parece ser cercano a la neutralidad. Las condiciones redox dentro del RE son de particular interés dada su relación con la formación de puentes disulfuro (3). A diferencia de las proteínas del citosol, las que se sintetizan en el RE suelen ser ricas en cisteínas y usualmente adquieren múltiples puentes disulfuro. El glutatión es probablemente el principal buffer redox dentro del RE. Estudios recientes realizados por Lodish y colaboradores (4) sugieren que, en contraste con la relación de glutatión reducido a oxidado de 100:1 que existe en el citosol, la relación en el RE es de 10:1. Experimentos *in vitro* han demostrado que este último es un valor óptimo para la formación espontánea de disulfuros durante el plegamiento de proteínas (3). Tanto el modo en que el glutatión entra al RE, como la manera en que el gradiente

redox es mantenido son problemas que permanecen sin ser aclarados. Cuando agentes reductores como DTT o 2-mercaptoetanol, o agentes oxidantes como diamina son agregados a las células las condiciones redox en el RE cambian y el plegamiento, maduración y transporte de proteínas es afectado (5). Al remover estos agentes, las condiciones redox normales se restablecen rápidamente, y esto resulta en el plegamiento post-traducciona l de las cadenas no plegadas.

Estudios recientes de Clairmont y colaboradores (6), han demostrado que el RE contiene ATP. Este es translocado desde el citosol al RE mediante un transportador específico. La presencia de ATP en el lumen del RE es importante ya que algunos de los factores que facilitan el plegamiento de proteínas como la BiP o Grp78, dependen del ATP para su función (7).

Cuando las células son privadas de ATP se inhibe el plegamiento de proteínas en el RE. En lugar de plegarse normalmente las proteínas tienden a agregarse. El ATP es también necesario para mantener algunas proteínas en su estado plegado dentro del RE y para rescatar y replegar las proteínas mal plegadas o agregadas generadas por la privación de ATP.

Factores que facilitan el plegamiento de proteínas en el RE.

El plegamiento de proteínas en soluciones acuosas ha sido exhaustivamente estudiado desnaturizando las mismas y siguiendo el replegamiento *in vitro* luego de remover el desnaturizante (8, 9, 10). De estos estudios surgen las siguientes generalizaciones: (a) la estructura tridimensional de las proteínas esta determinada por su secuencia de aminoácidos; (b) las proteínas pueden plegarse espontáneamente, es decir no requieren *a priori*, de la asistencia de otras macromoléculas; (c) el plegamiento no ocurre al azar, sino siguiendo caminos específicos y con intermediarios definidos; (d) en las proteínas con mas de un dominio, éstos se pliegan independientemente; (e) el plegamiento comienza con reacciones rápidas que conducen a la formación de intermediarios compactos con estructura secundaria similar a la nativa pero con una estructura terciaria no bien definida. Este es el estado llamado "glóbulo fundido" (molten globule); a esto sigue un número de reacciones mas lentas que involucran la isomerización de prolinas, la formación de puentes disulfuro y la adaptación conformacional entre dominios. Si bien estos principios son importantes para entender el mecanismo de plegamiento de las proteínas en la célula, los mismos no son suficientes para explicar el proceso *in vivo*, ya que el medio intracelular difiere muy significativamente de aquellos usados para obtener un plegamiento eficiente *in vitro*. Un número muy grande de estudios han hecho evidente que el

plegamiento *in vivo* es asistido. El pasaje de los polipéptidos a través de las vías de plegamiento depende de la acción de proteínas celulares llamadas chaperones moleculares y de algunas enzimas de plegamiento (11, 12, 13, 14). Estas proteínas son necesarias para aumentar la eficiencia del plegamiento intracelular de proteínas, especialmente durante las reacciones tardías que conducen desde el estado de glóbulo fundido al estado final correctamente plegado. La función de los chaperones no es impartir información sobre el plegamiento, ya que la misma está contenida en la secuencia de aminoácidos de cada proteína, sino prevenir interacciones intra e intermoleculares inapropiadas o no productivas para la reacción de plegamiento.

Consistentemente con su rol de punto central de biogénesis de proteínas, el RE es rico en chaperones moleculares y factores de plegamiento. De hecho casi todas las proteínas residentes del lumen del RE parecen tener funciones relacionadas de uno u otro modo con el plegamiento de proteínas. El chaperón mas importante del RE es un miembro de la familia de chaperones de 70 kDa llamado BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) (15), que también fue conocida como proteína regulada por glucosa o grp 78 (16). En condiciones de crecimiento normal, la BiP es sintetizada constitutivamente y representa el 5 % del contenido total del lumen del RE. Su síntesis puede ser aún mayor por inducción a través de una serie de condiciones de stress (17) que conducen a la acumulación de polipéptidos mal plegados (18). La BiP se asocia transitoriamente con una gama muy amplia de proteínas nacientes y en forma mas permanente con proteínas mal plegadas o no ensambladas cuyo transporte fuera del RE se encuentra bloqueado (15, 19). Los complejos de BiP con proteínas de secreción nacientes, aislados de extractos de células de mamífero, pueden disociarse *in vitro* por el agregado de ATP, pero no por análogos no hidrolizables ni por ADP (20). Se ha demostrado también que la BiP es una proteína esencial para las levaduras (21). Por todos estos datos, se supone que esta proteína tiene un rol en el plegamiento y ensamblado de proteínas en el lumen del RE bajo condiciones normales de crecimiento celular y no solamente como respuesta a un determinado stress (14, 15, 19, 22).

El RE contiene, además, peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas (PPI) similares a las encontradas en el citosol. Si bien su rol en el plegamiento de proteínas dentro del RE ha sido demostrado sin ambigüedad solo para un grupo de rodopsinas en *Drosophila*, (23) numerosos estudios sugieren que su actividad específica es efectivamente la de un factor de plegamiento (24). Este actuaría catalizando uno de los pasos limitantes de la reacción de plegamiento, la interconversión de los rotámeros *cis* y *trans* de los polipéptidos que contienen prolina (25). El tratamiento de fibroblastos de embrión de pollo con ciclosporina A, inhibidor de las PPI, retardó el plegamiento de la triple

hélice del colágeno tipo I, indicando un rol fisiológico para esta enzima en el plegamiento de proteínas dentro del RE (26).

También existen enzimas de plegamiento que se encuentran únicamente en el RE como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (27, 28). Esta enzima está involucrada en la formación y reacomodamiento de los puentes disulfuro durante el proceso de plegamiento. Estudios bioquímicos de la PDI han demostrado que puede servir como reductasa, isomerasa o como oxidasa, dependiendo de las condiciones redox del medio. Experimentos de plegamiento en microsomas han demostrado que la PDI es requerida para el plegamiento y la formación de puentes disulfuro (29). La disrupción del gen que codifica para la PDI en levaduras resulta letal para la célula (30). La función de otras dos abundantes proteínas llamadas ERp72 y ERp61, que al igual que la PDI tienen actividades tipo tioredoxina, permanecen sin ser aclaradas (31). Sin embargo es bastante probable que tengan un papel, junto con la PDI, en la formación de puentes disulfuro.

Si bien la oligosacaryltransferasa, la enzima encargada de transferir oligosacáridos a residuos de asparagina en proteínas, no puede ser categorizada como una enzima de plegamiento, esta juega un papel importante en facilitar el plegamiento de muchas proteínas en el RE. Sin la adición de los oligosacáridos a asparagina, numerosas proteínas son incapaces de alcanzar su estado nativo (32). Los oligosacáridos que se agregan cotraduccionalmente son polares y voluminosos, y podrían tener tres funciones potenciales facilitando el plegamiento de proteínas: (1) podrían asegurar el correcto posicionamiento local de los segmentos polipeptídicos a los cuales se hallan unidos, por ejemplo, dirigiéndolos hacia la superficie en el estado de glóbulo fundido; (2) podrían evitar la unión de chaperones a sitios específicos de los polipéptidos y (3) dada su naturaleza hidrofílica podrían aumentar la solubilidad de los intermediarios de plegamiento, disminuyendo la probabilidad de que se agreguen irreversiblemente (33). Si la función principal de los oligosacáridos unidos a asparagina fuera, de hecho, facilitar el plegamiento, esto explicaría el porqué las células agregan estos oligosacáridos a las cadenas nacientes, antes de que se plieguen. También explicaría el porqué la célula desarrolló una elaborada maquinaria de glicosilación en el RE separada de la que existe en el aparato de Golgi.

En general, los intermediarios de plegamiento, las proteínas no totalmente ensambladas (aquellas en que sus monómeros no están asociados correctamente formando el multímero final), las proteínas mal plegadas y los agregados son selectivamente retenidos en el RE. El transporte hacia el aparato de Golgi ocurre solamente cuando las proteínas se han plegado correctamente y se han ensamblado para el caso de los

multímeros. Este importante fenómeno, que asegura la integridad funcional de las proteínas que salen del RE, ha sido denominado "control de calidad" del RE (34). Las señales moleculares y los mecanismos que inducen retención o transporte durante el control de calidad, son pobremente entendidos. Aparentemente las proteínas asociadas con el chaperón BiP no son transportadas. Los sulfhidrilos libres también podrían estar involucrados en el mecanismo de retención. Para el caso de las glicoproteínas la estructura o grado de procesamiento de sus oligosacáridos ha sido postulado como una señal para la retención o el transporte de estas glicoproteínas (35, 36).

N-Glicosilación de proteínas en el RE

Las estructuras encontradas en los oligosacáridos unidos a los restos de asparagina de las glicoproteínas de células de mamífero se pueden dividir en tres grandes grupos (Fig. 1) (37, 38). Los de alta manosa o polimanosos, compuestos de N-acetilglucosamina y manosa. Los complejos, compuestos de N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, ácido siálico y fucosa formando una familia de estructuras muy variadas. Por último, los híbridos tienen algunas características de los de alta manosa y de los complejos. Los oligosacáridos unidos a asparagina de las glicoproteínas de eucariotas inferiores o plantas presentan además otras estructuras conteniendo ramnosa, xilosa etc.

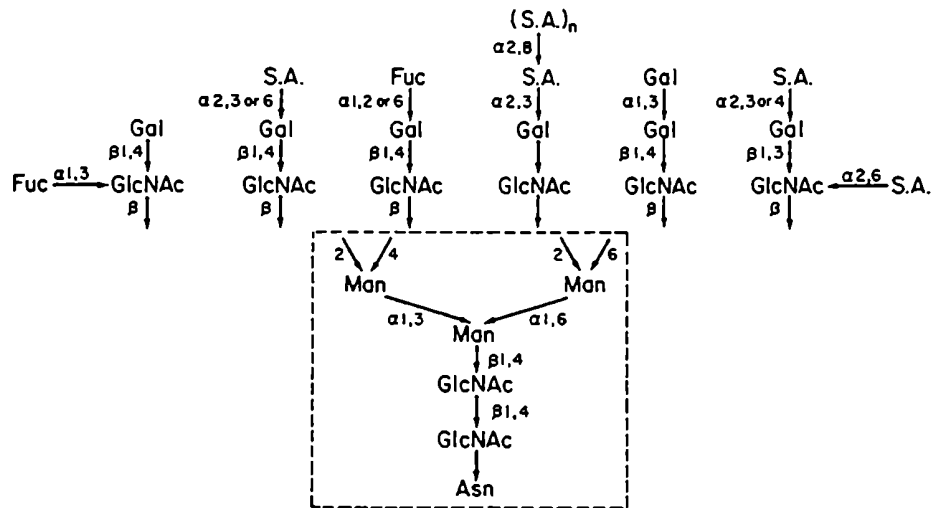


Figura 1. Estructura de N-oligosacáridos representativos

La gran variedad de estructuras posibles tiene un origen biosintético común. La glicosilación de residuos de asparagina no ocurre por el agregado de los sucesivos monosacáridos componentes a la proteína portadora, sino que todas tienen un mismo precursor que luego se procesa para dar origen a las distintas estructuras finales. En prácticamente todos los eucariotes la N-glicosilación de proteínas comienza con la formación de un oligosacárido de estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unido a un lípido. El oligosacárido se biosintetiza en el RE mediante la acción concertada de glicosiltransferasas que da como resultado un solo isómero para cada uno de los oligosacáridos

con número creciente de monosacáridos (Fig. 2). El oligosacárido completo es transferido en bloque desde el lípido a los residuos de asparagina de las proteínas nacientes en el RE mediante una oligosacariltransferasa. A continuación la acción ordenada de glicosidasas y glicosiltransferasas da origen a las estructuras encontradas en las glicoproteínas maduras.

En 1970-1972 se describió por primera vez la síntesis *in vitro* de un oligosacárido glucosilado unido a un lípido y su transferencia a proteínas (39). A partir de entonces, se elucidó la secuencia detallada de reacciones que conduce a la formación del intermediario, su transferencia a proteína y posterior procesamiento (40, 41, 42). El lípido al cual está unido el oligosacárido por un puente pirofosfato es el dolicol (Dol), compuesto de 18-21 unidades de isopreno en mamíferos (43, 44). El Dol-P actúa como transportador de manosa y de glucosa, y el Dol-P-P participa como transportador del oligosacárido intermediario.

En la Fig. 2 se detalla la secuencia y topología de reacciones que conduce a la formación del oligosacárido transferido en las reacciones de N-glicosilación. Los primeros siete monosacáridos son transferidos directamente desde sus correspondientes nucleótido-azúcares. Con la transferencia de GlcNAc-P a Dol-P a partir de UDP-GlcNAc, se forma Dol-P-P-GlcNAc al que se le agrega otro resto de N-acetilglucosamina también a partir de UDP-GlcNAc (Fig. 2, reacciones 1 y 2). Luego se transfieren cinco restos de manosa a partir de GDP-Man (Fig. 2, reacción 3). Estas reacciones utilizan los nucleótido azúcares disponibles en el citoplasma y son catalizadas por glicosiltransferasas situadas en la cara citoplasmática del RE (45, 46).

El intermediario $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ se transloca hacia el interior del RE donde continúa la adición de restos de manosa (Fig. 2, reacción 4). El dador de los 4 últimos restos de manosa es el Dol-P-Man. El agregado secuencial de tres restos de glucosa utilizando Dol-P-Glc como dador de glucosa completa la síntesis del $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Fig. 2, reacción 5). Los sustratos dadores de manosa y glucosa en estas reacciones de glicosilación que ocurren en el interior del RE, Dol-P-Man y Dol-P-Glc, son sintetizados en la cara externa del RE a partir de Dol-P y los correspondientes nucleótido azúcares. Luego son translocados hacia el interior del RE donde son utilizados como dadores de manosa y glucosa (45, 46).

La transferencia del oligosacárido precursor a las proteínas tiene lugar en forma cotraduccional en el interior del RE y es catalizada por la dolicol difosfato oligosacárido:proteína oligosacariltransferasa (Fig 2, reacción 6) (47, 48). Esta enzima reconoce la presencia de los tres residuos de glucosa en el oligosacárido transferido: la remoción de la glucosa más externa disminuye la velocidad de transferencia 10-20

veces. No se sabe aún qué es lo que determina que un resto de asparagina sea glicosilado o no (49) pero se sabe que la oligosacaryltransferasa reconoce específicamente al tripéptido Asn-X-Ser/Thr (X puede ser cualquier amino ácido excepto Pro) dentro de un marco adecuado, pero aún no identificado de la proteína aceptora.

El oligosacárido transferido comienza a ser procesado inmediatamente después de ser transferido a la proteína. Los tres residuos de glucosa son removidos por dos glucosidasas específicas localizadas en el RE. La glucosidasa I, específica de uniones $\alpha(1,2)$, hidroliza el resto de glucosa más externo (Fig 2, reacción 7). La glucosidasa II remueve los dos residuos de glucosa más internos en unión $\alpha(1,3)$ (Fig 2, reacción 8). También algunas manosas son removidas por manosidasas específicas localizadas en el retículo endoplásmico. Un procesamiento adicional de los oligosacáridos unidos a proteína ocurre a medida que las glicoproteínas migran a través de las distintas cisternas del aparato de Golgi donde se exponen a las sucesivas glicosidasas y glicosiltransferasas que dan por resultado las distintas estructuras encontradas en las glicoproteínas maduras.

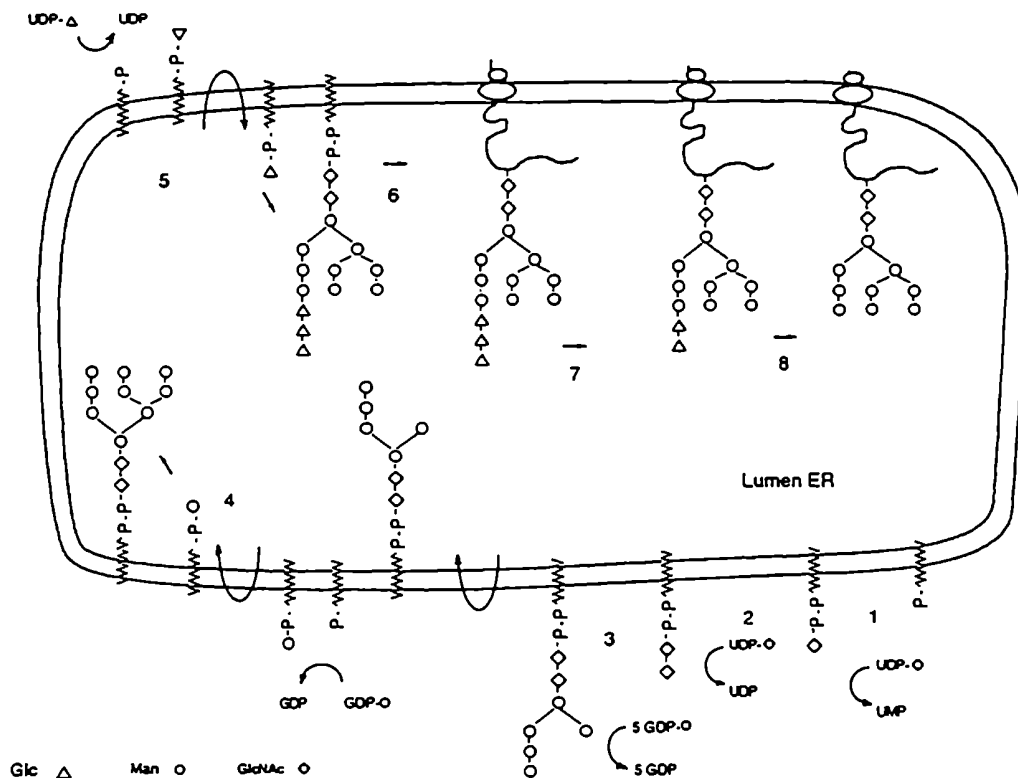


Figura 2. Secuencia y topografía de las reacciones de N-glicosilación en el RE

La glicosilación y el procesamiento de los oligosacáridos afecta el plegamiento, secreción y degradación de proteínas en el RE.

Si bien los oligosacáridos unidos a asparagina no son necesarios para mantener la estructura nativa de la mayoría de las glicoproteínas maduras, los mismos suelen ser cruciales para el correcto plegamiento y oligomerización de estas glicoproteínas. Se encuentra bien documentado en la bibliografía que cuando la N-glicosilación es inhibida usando tunicamicina (un inhibidor de la síntesis del Dol-P-P-oligosacárido precursor) o por una mutación que elimina la secuencia consenso NxT/S, numerosas glicoproteínas son incapaces de adquirir su estructura terciaria correcta (50, 51, 52, 53, 54). Típicamente, dichas proteínas se agregan rápidamente luego de la síntesis y se asocian no covalentemente con la proteína BiP, el chaperón de RE (34, 50, 52). El destino final de estas proteínas es la degradación, que tiene lugar en el RE o algún otro compartimiento pre-Golgi, unas pocas horas luego de la síntesis (55). Las proteínas mal plegadas están frecuentemente unidas covalentemente unas con otras, mediante la formación de puentes disulfuro aberrantes (33, 53).

Si bien es entonces cierto que la mayoría de las glicoproteínas necesitan de su oligosacárido para el correcto plegamiento, el grado de dependencia que muestran varía ampliamente. En algunos casos, una fracción de la proteína se pliega correctamente y es transportada normalmente fuera del RE, mientras que el resto se agrega y permanece dentro del RE (56, 57). En otras ocasiones, se observa una dependencia con la temperatura. En estos casos, la proteína se agrega a 37 °C pero es capaz de plegarse adecuadamente a temperaturas reducidas aún en ausencia de los oligosacáridos (51). Finalmente, existen también numerosos casos en los que la presencia de N-oligosacáridos no parece ser requerida para el plegamiento correcto de los polipéptidos (56, 58). El motivo por el cual el comportamiento de las glicoproteínas difiere de este modo se desconoce. La única regla que ha podido establecerse es que aquellas glicoproteínas que tienen dificultades para plegarse cuando tienen los oligosacáridos en su lugar, muestran aún más problemas para adquirir su estructura correcta cuando los mismos están ausentes o modificados. Por el contrario las glicoproteínas que se pliegan fácilmente, son menos sensibles a la ausencia de los oligosacáridos.

Cuando el efecto de la N-glicosilación es analizado mediante la eliminación de una secuencia consenso de glicosilación en glicoproteínas con más de un oligosacárido, es frecuentemente observado que ningún sitio en particular es esencial para que el plegamiento se lleve a cabo. Solamente aparecen problemas cuando más de un sitio es eliminado al mismo tiempo (50, 59). Sin embargo, algunos sitios suelen ser más importantes que otros, no siendo sorprendente que estos sitios tiendan a ser conserva-

dos. Ha sido sugerido que este tipo de oligosacáridos particularmente importantes pueden funcionar de modo cooperativo, aumentando las chances de una proteína de alcanzar un estado conformacional correcto y estable (59). También se ha informado que la creación de sitios de glicosilación en ubicaciones completamente nuevas dentro de un polipéptido ha podido, en algunos casos, reemplazar la necesidad de los oligosacáridos constitutivos normales (60). Esto sugiere un alto grado de flexibilidad en las posiciones que resultan aceptables para los oligosacáridos, siendo su presencia mas importante que su ubicación específica. Los oligosacáridos parecen tener, por lo tanto, un rol mas global que local en el plegamiento de glicoproteínas.

Es importante notar sin embargo, que no solo la presencia de los oligosacáridos sino también su grado de procesamiento parecen ser importantes en el plegamiento y transporte de glicoproteínas. Los inhibidores de las glucosidasas I y II como castanospermina, deoxinojirimicina y bromoconduritol frecuentemente retardan o evitan el plegamiento y/o transporte intracelular de las glicoproteínas recién sintetizadas (53, 61, 62). Nuevamente, la magnitud de este efecto varia ampliamente entre las distintas glicoproteínas. El bromoconduritol, un inhibidor de glucosidasas que bloquea preferentemente la remoción del residuo mas interno de glucosa, parece ser mas eficiente en la inhibición de la secreción de glicoproteínas que la castanospermina y la deoxinojirimicina (63). En el caso de la hemoaglutinina del virus de la influenza, la inhibición de la remoción de las glucosas mas externas no tiene efecto alguno sobre la maduración del virus, mientras que la inhibición de la remoción del residuo de glucosa mas interno de los oligosacáridos con bromoconduritol, genera una glicoproteína que no puede ser transportada fuera del RE (63). Esto sugiere que el residuo de glucosa mas interno es, de alguna manera, mas importante para la maduración de la HA, que los dos residuos de glucosa mas externos.

Es interesante mencionar que la inmunoglobulina (Ig) D no es secretada en presencia de deoxinojirimicina (64), mientras si lo es en presencia de tunicamicina (65). Esto implica que la IgD se pliega o es transportada mas eficientemente cuando no posee ningún N-oligosacárido que cuando tiene uno no procesado.

En base a los efectos observados con estos inhibidores, numerosos investigadores han sugerido que el transporte hacia afuera del RE podría estar regulado por lectinas (35, 36). Se ha especulado que estas lectinas se unirían específicamente a los oligosacáridos procesados de las glicoproteínas y facilitarían su salida del RE. Sin embargo esta noción es incompatible con el concepto de transporte en masa (66) que sugiere que las proteínas salen del RE sin la necesidad de unirse a receptores específicos que se lo faciliten. Como se vera mas adelante, resultados obtenidos recientemente apoyan la

idea de que existen receptores tipo lectina dentro del RE (67, 68, 69). Sin embargo, su rol parece estar relacionado con la retención mas que con el transporte activo de proteínas fuera del RE.

En contraste con los inhibidores de las glucosidasas, los inhibidores de manosidasas no parecen tener un efecto significativo en el plegamiento y secreción de glicoproteínas (69, 70). Sin embargo, recientemente se describió que la deoximanojirimicina bloqueaba la degradación de una glicoproteína de levadura que no era capaz de ser transportada fuera del RE (71). Por otro lado, ha habido dos comunicaciones de que los inhibidores de glucosidasas pueden acelerar la degradación de formas no ensambladas de las cadenas pesadas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (64, 72). Esto sugiere que el procesamiento de las glicoproteínas dentro del RE, que involucra la remoción de residuos de glucosa y manosa, podría estar relacionado con el mecanismo de control de calidad y degradación que funciona dentro del RE.

Los oligosacáridos unidos a proteína son transitoriamente glucosilados en el RE.

Como ya se menciono anteriormente, la N-glicosilación de proteínas es iniciada, en la mayoría de los eucariotes, por la transferencia de un oligosacárido de estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde un derivado unido a Dol-P-P hacia residuos de asparagina de polipéptidos nacientes en el lumen del RE. El procesamiento de los oligosacáridos comienza inmediatamente luego de la transferencia y es iniciado por la remoción de los tres residuos de glucosa por dos glucosidasas específicas. La glucosidasa I remueve la glucosa mas externa ligada en unión $\alpha(1-2)$ y luego la glucosidasa II remueve los otros dos residuos de glucosa ligados en unión $\alpha(1-3)$. Además, algunos residuos de manosa también pueden ser removidos dentro del RE mediante la acción de α -manosidasas específicas.

Los tripanosomátidos poseen una característica única en su mecanismo de N-glicosilación, ya que transfieren a proteína oligosacáridos no glucosilados (73). Estos microorganismos son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc que es el dador de glucosa para la síntesis del precursor glucosilado en células de mamífero, aves, hongos y plantas. A pesar del hecho que oligosacáridos no glucosilados son transferidos a proteína en estos microorganismos, Parodi y colaboradores detectaron la presencia de oligosacáridos tipo alta manosa unidos a proteína transitoriamente glucosilados en células incubadas con $[^{14}\text{C}]$ glucosa ($\text{Glc}_1\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ -proteína dependiendo de las especies) (74). La formación transitoria de $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ -proteína también fue detectada en células de mamífero incubadas con el mismo precursor radioactivo (75, 76). En todos los tipos celulares, los compuestos glucosilados radioactivos desapare-

cieron por "chase" con glucosa no marcada. Como se muestra en la Fig. 3, dos caminos biosintéticos podían postularse para la formación de estos compuestos. De acuerdo al camino A, podrían generarse por deglucosilación y demanosilación sucesivas de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ o alternativamente, una glucosilación directa de los compuestos no glucosilados podría tener lugar (camino B). Se obtuvieron evidencias con ensayos *in vitro* en células de tiroides de vaca (75), que mostraron que los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína se generaron por glucosilación directa de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ respectivamente (Fig. 3 camino B) y no por demanosilación sucesiva de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 3 camino A). Entre estas evidencias se encontraba el hecho de que luego de la incubación de las células con $[^{14}\text{C}]$ glucosa, la marca en los residuos de glucosa de los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína aparecía en forma prácticamente instantánea. En cambio, la marca en los residuos de manosa en el oligosacárido $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína, apareció mucho más rápido que la marca en los mismos residuos de manosa de los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. El intervalo de tiempo requerido para la marcación de los residuos de manosa y glucosa en los oligosacáridos glucosilados debería haber sido el mismo si estos compuestos se hubieran formado a través del camino A. Un análisis similar realizado con células de *Trypanosoma cruzi* (77) también mostró que los oligosacáridos monoglucosilados se formaban por el mecanismo delineado en la Fig. 3 camino B.

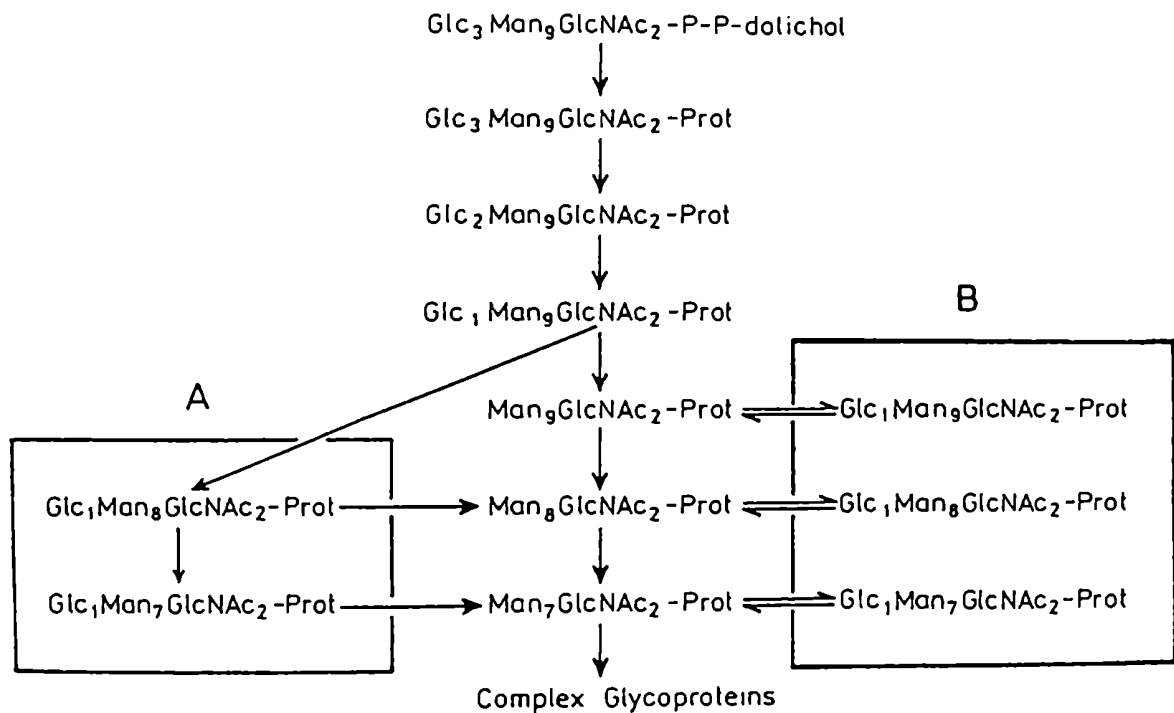


Figura 3. Mecanismos posibles para la formación de compuestos glucosilados

La reacción de glucosilación fue luego detectada en células de hígado de rata (76), lo que permitió un fraccionamiento celular que ubicó la actividad en el RE. Utilizando estas membranas microsomales como sistema, se demostró la no intervención de derivados del dolicol en la reacción de glucosilación y se obtuvieron evidencias que señalaban al UDP-Glc como el dador de glucosa en dicha reacción. Se observó además que la presencia de iones Ca^{2+} era estrictamente requerida para que la reacción tuviera lugar (78).

El desarrollo posterior de un ensayo *in vitro* libre de células, permitió la detección de esta actividad glucosilante en fracciones microsomales de células de mamíferos, plantas, hongos y protozoos. Este ensayo libre de células utilizaba una proteína exógena, la tiroglobulina bovina (una glicoproteína con oligosacáridos tipo alta manosa) como sustrato aceptor de glucosa y UDP-Glc como sustrato dador (78). Es importante mencionar que se ha descrito un transportador de UDP-Glc que transloca el nucleótido azúcar desde el citosol al lumen del RE (79, 80).

Fue durante el desarrollo del ensayo *in vitro* que se hizo la interesante observación de que la tiroglobulina debía ser previamente desnaturalizada para servir eficientemente como sustrato aceptor. La tiroglobulina nativa era muy pobremente glucosilada. La proteína responsable de la actividad glucosilante, la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa fue posteriormente purificada a homogeneidad a partir de hígado de rata (81) y de *Schizosaccaromyces pombe* (82). La enzima resultó ser una proteína soluble del RE (83) conformada por dos subunidades idénticas de 150 kDa de peso molecular (81). La actividad fue estrictamente dependiente de Ca^{2+} , que no puede reemplazarse con Mg^{2+} ni con Mn^{2+} . El único dador de azúcar eficiente fue el UDP-Glc, ya que no se observó transferencia de azúcar con ADP-Glc, TDP-Glc ni con UDP-Gal. La máxima actividad se registró a pH neutro y los productos de reacción formados por la preparación homogénea de enzima resultaron ser los mismos descriptos para las preparaciones crudas, es decir $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ que se generaron a partir de las correspondientes especies no glucosiladas unidas a proteína (81). En todos los casos el resto de glucosa se une con el mismo tipo de unión $\alpha(1-3)$ y al mismo residuo de manosa que en el intermediario $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$ (Fig. 4 y Fig 2). Este y otros resultados indican que la glucosidasa II es la enzima que hidroliza *in vivo* los residuos de glucosa transferidos por este mecanismo.

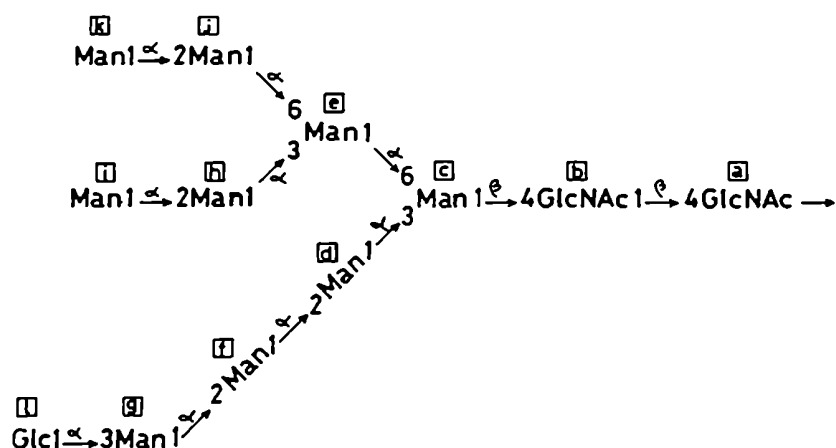


Figura 4. Estructura del producto $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$

Las glicoproteínas mal plegadas sufren ciclos de deglucosilación y reglucosilación en el RE.

Como se mencionó anteriormente, la remoción de los residuos de glucosa de los oligosacáridos transferidos a proteína ocurre en los primeros minutos luego de la síntesis. Sin embargo, cuando las glicoproteínas permanecen mal plegadas son incompetentes para el transporte, y permanecen retenidas dentro del RE. Suh y colaboradores (84) demostraron que una mutante termosensible de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, quedaba retenida dentro del RE a la temperatura no permisiva debido a que su estructura aberrante no permitía la trimerización. El ensamblado de esta glicoproteína en un trímero era requerido para el pasaje al aparato de Golgi. El estudio de los oligosacáridos de la proteína G mostró que dichos oligosacáridos permanecen en un estado monoglucosilado ($\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$) a la temperatura no permisiva. El residuo de glucosa está sometido a rápido recambio debido a una continua deglucosilación y reglucosilación (84). La deglucosilación es causada por la glucosidasa II y la reglucosilación por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa.

La particularidad de la glucosiltransferasa de reconocer tiroglobulina desnaturalizada como sustrato *in vitro* hizo especular sobre la posibilidad de que esta enzima estuviera involucrada en los mecanismos mediante los cuales las glicoproteínas se pliegan en el RE o los que permiten el reconocimiento y la degradación de las estructuras mal plegadas.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue determinar que condiciones debía reunir una glicoproteína para ser sustrato de la glucosiltransferasa y estudiar el motivo por el cual solo las glicoproteínas desnaturalizadas son glucosiladas. El objetivo final sería establecer las bases moleculares del mecanismo de reconocimiento.

Los resultados que aquí se muestran representan los primeros estudios de la especificidad de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa que, conjuntamente con datos obtenidos en otros laboratorios, permiten suponer que efectivamente esta enzima forma parte del mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas que opera dentro del RE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Tiroglobulina porcina y bovina, tiroglobulina-Sepharosa, seroalbúmina bovina (BSA), ribonucleasa A y B de pancreas bovino, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H), N-glicanasa/endo- β -N-acetilglucosaminidasa F (Endo F), proteasa de *Streptomyces griseus* tipo XIV (Pronasa), concanavalina A (Con A), β -lactoglobulina (β Lg), tripsina de pancreas bovino, inhibidor de tripsina de porotos de soja tipo I-S, 1-deoxinojirimicina y castanospermina fueron compradas a Sigma (St. Louis, MO). Con A-Sepharosa fué de Pharmacia (Uppsala Suecia). Borohidruro de sodio tritiado (8 Ci/mmol) fué de Amersham (Amersham, UK). UDPG-[14 C]Glc fué preparado de acuerdo a Wright y Robbins (85) con pequeñas modificaciones.

Las mutantes de la nucleasa de *Staphylococcus* fueron un generoso donativo del Dr. R. O. Fox, Department of Molecular Biophysics, Yale University, USA.

Los péptidos utilizados fueron un generoso donativo del Dr. Gunnar Lindeberg, Department of Immunology, University of Uppsala Biomedical Center, Suecia.

Standards radioactivos

[14 C]Man₇₋₉GlcNAc: se obtuvieron incubando 3 g de crestas de oviducto de gallina ponedora con 500 μ Ci de [14 C]glucosa (285 Ci/M, New England Nuclear) en 7 ml de solución de marcación conteniendo 40 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 85 mM NaCl, 5 mM sodio piruvato, 2 mM glutamina, vitaminas y amino ácidos no esenciales 1x (Gibco). Luego de 4 h a 37 °C se agregaron 14 ml de metanol y 21 ml de cloroformo y se desintegró la mezcla en un *Omni-Mixer*[®] (Sorvall). La interfase proteica se lavó una vez con 25 ml de cloroformo/metanol/agua (3:2:1), luego tres veces con 10 ml de agua y finalmente se extrajo 4 veces con 5 ml de cloroformo/metanol/agua (1:1:0.3).

[14 C]Man₇₋₉GlcNAc se obtuvieron por degradación con Pronasa de la interfase proteica delipidada obtenida. Los glicopéptidos se trataron con Endo H y los oligosacáridos se aislaron por cromatografía descendente en papel con solvente A.

[glucosa- 14 C]Glc₁Man₇₋₉GlcNAc: fue preparado incubando tiroglobulina desnaturalizada en urea 8 M con UDP-[14 C]Glc y membranas microsomales de hígado de rata, seguido por tratamiento con proteasa y Endo H como fué descrito anteriormente.

[14 C]Man₇₋₉GlcNAcol: se obtuvieron por tratamiento con borohidruro de sodio de los oligosacáridos [14 C]Man₇₋₉GlcNAc.

Preparación de Glicopéptidos de tipo alta manosa

Se incubaron 100 mg de tiroglobulina bovina (Sigma) en 3.5 ml de una solución conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 8.0, 2 mM CaCl₂, 2 mg de proteasa de *S. griseus* (Sigma) durante 4 días a 37 °C en atmósfera de tolueno. La reacción se calentó 5 min a 100 °C y se sembró en una columna de Con A-Sepharosa (Pharmacia) de 0.5 x 7 cm equilibrada en buffer Con A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM). La columna se lavó con 20 ml del mismo buffer y luego con 15 ml de buffer Con A conteniendo 10 mM α -metilglucósido. Los glicopéptidos de tipo polimánosa se eluyeron con 20 ml de buffer Con A conteniendo 0.1 M α -metilmanósido. Este eluido se dividió en dos, cada una de las mitades se concentró a 0.5 ml y se pasaron por una columna de Sephadex G-10 fino (Pharmacia) equilibrada y corrida en isopropanol 7 %. Se reunieron los excluidos conteniendo glicopéptidos, se concentraron y se determinó la concentración de azúcares. El rendimiento en glicopéptidos (mg de azúcar en los glicopéptidos/mg proteína) estimado usando [¹⁴C]Glc₁Man₉GlcNAc como standard interno, fue de 1.5-2 % y concuerda bien con lo descripto (86).

Preparación de las lectinas

La aglutinina de soja (SBA) fué preparada de acuerdo a lo descripto por Gordon y colaboradores (87). La lectina fué luego purificada por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B tratada con ácido . La fitohemoaglutinina (PHA) se preparó esencialmente según lo descripto por Felsted y colaboradores (88). El paso final de purificación fué una cromatografía de afinidad en tiroglobulina-Sepharosa. Ambas lectinas resultaron purificadas a homogeneidad a juzgar por el análisis en SDS-PAGE.

Métodos.

La acetólisis se realizó como fué descripta anteriormente (89). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (90). La concentración de azúcares se determinó por el método del fenol-sulfúrico (91). Las cromatografías y las electroforesis se desarrollaron en papel Whatman 1. Los solventes utilizados fueron: A: 1-propanol/nitrometano/agua (5:4:2); B: 1-butanol/piridina/agua (4:3:4) y C 1-butanol/etanol/agua (4:1:1)

Preparación de Microsomas

Para preparar microsomas de hígado de rata se utilizó el método clásico de fraccionamiento subcelular con el que se obtienen vesículas microsomales cerradas orientadas correctamente (conservan la cara citoplasmática hacia afuera y el contenido del RE en su interior). Ratas *Albinus wistar* adultas, machos o hembras, se dejaron en ayuno (sin comida pero con agua) 18 h antes de sacrificarlas por dislocación cervical. Se extrajeron los hígados y se colocaron inmediatamente en sacarosa 0.25 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, pH 7.4 (solución A) en hielo. Cuando los microsomas se prepararon con la finalidad de purificar la glucosiltransferasa, se incluyó en esta solución 0.5 mM TPCK, 0.5 mM TLCK y 1 mM PMSF. Todos los pasos posteriores se realizaron en hielo o a 0-4 °C. Se perfundieron con solución A o se cortaron en trozos pequeños y se lavaron con la misma solución para limpiarlos de sangre. Finalmente se mezclaron los hígados con solución A en proporción 1:2 (Ej. 150 g de hígado con 300 ml de solución A). Se licuaron en *Omni-Mixer*® (Sorvall) aproximadamente 20 s a máxima velocidad y se pasaron 4 veces por un homogeneizador (Potter) vidrio-*Teflon*®. El homogenato se centrifugó 10 min a 5.000 x g. El sobrenadante se centrifugó 10 min a 12.000 x g y el sobrenadante se ultracentrifugó 60 min a 100.000 x g. El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen posible de solución A con ayuda de un Potter, luego se diluyó hasta una concentración de proteínas aproximadamente 2-8 mg/ml y se ultracentrifugó nuevamente 60 min a 100.000 x g (lavado). El precipitado se resuspendió en solución A hasta una concentración de proteína aproximadamente 60 mg/ml. El rendimiento fue de 9-12 mg de proteína microsomal por cada gramo de hígado fresco.

Preparación de glucosiltransferasa soluble de hígado de rata

Los microsomas de hígado de rata se prepararon como ya fué descrito mas arriba. Las membranas se sometieron a alta presión con una French Press y luego se centrifugó a 100.000 x g durante 60 min. Se agregó sulfato de amonio hasta 50 % de saturación, se centrifugó y el precipitado se dializó exhaustivamente contra buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM 2-mercaptoetanol.

Purificación de UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de hígado de rata

Extracción: Como material de partida se utilizaron microsomas de hígado de rata preparados como se indica mas arriba y se solubilizó la glucosiltransferasa tratando los microsomas, diluídos a una concentración de proteínas de 10 mg/ml en solución

A, pH 7,4-8,0, con saponina 0.5 %. Se incubó la preparación a 4 °C 30 min y luego se ultracentrifugó durante 1 h a 100.000 x g a 4 °C.

DEAE-celulosa: El sobrenadante del material solubilizado se sembró en una columna de DEAE-celulosa pre-equilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 5 mM 2-mercaptoetanol (solución B). El 2-mercaptoetanol resultó necesario para aumentar la estabilidad de la enzima y para permitir una buena resolución en las sucesivas cromatografías, por lo que se lo incluyó en los buffers de todos los pasos de purificación. Generalmente se utilizó una columna de 1.8 x 20 cm en la que se cargaron hasta 400 mg de proteínas totales. Luego de lavarla con un volumen de columna de solución B, se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 150 ml entre 0 y 0.5 M en solución B. Se utilizaron distintos tipos de soportes con iguales resultados: DE-52 (Whatman), DEAE-Sephacel o DEAE-Sepharaosa Fast Flow (Pharmacia). Dependiendo de la cantidad de muestra a cromatografiar, se emplearon columnas de diferentes dimensiones con resultados semejantes, eluyendo siempre con un gradiente lineal de 0 a 0.5 M NaCl de 5 volúmenes de columna.

Con A-Sepharaosa: El pico de actividad eluido de la DEAE se llevó a 2 mM CaCl₂, 2 mM MnCl₂ y 2 mM MgCl₂. y se lo pasó 2 veces por una columna de Con A-Sepharaosa (Pharmacia) de 1.6 x 2 cm equilibrada en buffer Con A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM). Se lavó con buffer Con A hasta absorbancia a 280 nm = 0 y luego se pasaron por la columna 5 ml de buffer Con A conteniendo α -metilmanósido al 8 % a 0 °C. Luego se dejó la columna a 37 °C durante 30-60 min al cabo de los cuales se eluyó a 37 °C con buffer Con A conteniendo 8 % α -metilmanósido.

Mono Q: Se utilizó una columna Mono Q®; HR 5/5 (Pharmacia) corrida a un flujo de 1 ml/min en un equipo de FPLC o de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. El pico de actividad eluido de la Con A-Sepharaosa se diluyó a la mitad con Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 5 mM 2-mercaptoetanol (solución B) y se sembró en la columna equilibrada en la misma solución. Se eluyó con un gradiente de NaCl en solución B, de 0 a 0.25 M en 5 min y luego de 0.25 M a 0.45 M en otros 20 min (25 min en total). En algunas ocasiones el pico de actividad eluido de esta primera Mono Q se recromatografió en idénticas condiciones (se diluyó con 4 volúmenes de solución B para sembrarlo en la columna).

Fenil-Superosa: Se utilizó una columna Phenyl-Superose®; HR 5/5 (Pharmacia) corrida a un flujo de 0.5 ml/min en un equipo de FPLC o de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. El pico de actividad eluido de la Mono Q se diluyó con 10 volúmenes de sulfato de amonio 0.5 M, 5 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM imidazol-

HCl pH 7.0 (solución C) y se sembró en la columna equilibrada en el mismo buffer. Se eluye con un gradiente lineal de 20 ml desde 100 % solución C hasta 100 % solución D (5 % sacarosa, 5 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM imidazol-HCl pH 7.0) y luego se continuó la elución con solución D. El eluido de esta columna es estable, conservando 80-100 % de actividad luego de 2-3 meses a -20 °C.

Ensayos con glucosiltransferasa

Las mezclas de incubación están descritas en el texto. Dos métodos fueron utilizados para cuantificar la marca incorporada en los productos de reacción:

A) Las reacciones se detienen por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético 10 %. Los tubos se calientan 2 min a 100 °C, los precipitados se lavan tres veces con el mismo ácido y luego son cuantificados por centelleo líquido.

B) Para medir la incorporación en glicopéptidos o péptidos trípticos, las reacciones se detuvieron por el agregado de 1 ml de agua. Los tubos fueron calentados 5 min a 100 °C. Las proteínas y péptidos se degradaron con 0.2 mg de Pronasa en 1,2 ml de 0,15 M Tris-HCl buffer pH 8.0, 2 mM CaCl₂, incubando 16 h a 37 °C. Las soluciones resultantes se aplican a una columna de Sephadex G-10 (1,2 x 57 cm) equilibrada en isopropanol 7 %. Los glicopéptidos se recogen en el volumen muerto y se los somete a electroforesis en papel en 10 % de ácido fórmico (25 V/cm durante 120 min). Luego se cuenta la actividad de las sustancias que migraron al cátodo.

Ensayo Standard de Glucosiltransferasa

En un ensayo típico, la actividad de glucosiltransferasa se midió en un volumen de 50 µl de una mezcla conteniendo 5 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 4 µM UDP-[¹⁴C]Glc, 25 µg de SBA y la preparación a ser ensayada. Luego de 5 min de incubación a 37 °C, la cantidad de glucosa incorporada en la proteína aceptora se cuantificó por el método A, descripto mas arriba.

Influencia de la secuencia de los oligosacáridos en la velocidad de glucosilación (Fig. 5 y 6)

Las mezclas de incubación para medir glucosilación contenían en un volumen total de 100 µl, 10 mM CaCl₂, 5 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 300 µM castanospermina, 6 µM UDP[¹⁴C]Glc, 0.6 % Triton® X-100, 12 µg de glicopéptidos derivados de tiroglobulina bovina o porcina y 0.8 mg de proteína microsomal de hígado de rata. Las muestras fueron incubadas 15 y 30 min a 37 °C y las reacciones se detuvieron por agregado de un volumen de metanol, los tubos fueron centrifugados y se tomó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 0.5 ml de metanol/agua (1:1) y los tres sobrena-

dantes fueron combinados y sometidos a electroforesis en papel con ácido fórmico al 10 % (25 V/cm) durante 120 min en la que los glicopéptidos cargados positivamente migran entre 8 y 11 cm hacia el cátodo. La incorporación de radioactividad resultó proporcional al tiempo de incubación. Los glicopéptidos marcados fueron eluidos y tratados con Endo H (5 mU en 200 µl de buffer trietilamina acetato 50 mM pH 5.5 por 16 h a 37 °C) y corridos en cromatografía en papel. Los oligosacáridos utilizados como sustratos fueron marcados con tritio de la siguiente manera: 20 µg de glicopéptidos fueron tratados con Endo H como fué indicado mas arriba, secados y disueltos en 1.5 ml de buffer borato de sodio 10 mM pH 11.3. Borohidruro de sodio sólido, marcado con tritio, fué agregado a la solución. Luego de 16 h a temperatura ambiente, la solución fué acidificada con ácido acético 1 M y llevada a sequedad. Un ml de metanol y una gota de ácido acético glacial fueron agregados a la solución y luego llevada a sequedad. Este paso se repitió dos veces mas. La muestra fué corrida en cromatografía en papel con el solvente C y las sustancias que permanecieron en el origen fueron eluidas y corridas con solvente A.

Desnaturalización de glicoproteínas

Las glicoproteínas fueron disueltas en 200 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea y calentadas a 60 °C durante 4 h. Por último se dializó la solución contra un buffer apropiado dependiendo del experimento.

Espectros de fluorescencia y absorbancia

El espectro de fluorescencia de triptofano para monitorear el estado conformacional de glicoproteínas se realizó en un espectrofluorómetro Jasco excitando a 280 nm y midiendo el espectro de emisión entre 310 y 360 nm. Para el caso de la RNAsa se midió el espectro de absorbancia UV entre 240 y 310 nm en un espectrofotómetro Gilford y se calcularon las derivadas del espectro por cálculo numérico.

Degradaciones con tripsina

Las mezclas de reacción contenían, en un volumen total de 0.4 ml, 3.5 mg de la correspondiente glicoproteína desnaturalizada, 10 mM CaCl₂, 0.2 mg de tripsina libre de quimotripsina y buffer 100 mM Tris-HCl pH 8.0. El inhibidor de tripsina (0.5 mg) se agregó luego de 4 h a 37 °C. En los controles sin digerir, el inhibidor se agregó antes que la proteasa.

Reducción de tiroglobulina

Se realizó en 8 M urea, 1 mM Na-EDTA pH 7.7, 20 mM DTT durante 16 h a 37 °C. Luego se dializó contra buffer 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoetanol. En el caso de la tiroglobulina tratada con tripsina, la solución conteniendo urea, DTT y EDTA, se aplicó a una columna de Sephadex G-10 (1.2 x 57 cm) equilibrada con isopropanol 7 %, 5 mM 2-mercaptoetanol. El material recogido en el volumen muerto se secó y luego se disolvió en buffer 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoetanol.

Tratamiento de glicoproteínas con Endo H

La glicoproteína nativa o desnaturalizada fue dializada contra 50 mM buffer acetato de sodio pH 5.5 y tratada con 60-100 mU/ml de Endo H durante 24-48 h. Finalmente fue dializada contra un buffer adecuado dependiendo del experimento. En el caso que fuese necesario, se inactivó la enzima sometiendo la preparación nuevamente al proceso de desnaturalización.

Tratamiento de glicoproteínas con α -manosidasa

Se dializó la glicoproteína a ser tratada contra 50 mM citrato de sodio pH 4.5, 0.1 mM acetato de zinc. Al dializado se le agregaron 1.6 unidades de α -manosidasa de *jack bean* previamente dializada contra el mismo buffer. La mezcla se incubó a 37 °C 6 h. Finalmente se dializó contra un buffer adecuado dependiendo del experimento. En el caso que fue necesario, se inactivó la enzima sometiendo la preparación nuevamente al proceso de desnaturalización.

Tratamiento de SBA con N-glicanasa/Endoglicosidasa F

SBA desnaturalizada dializada contra buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0, se trató con 1 U de N-glicanasa/Endoglicosidasa F a 37 °C durante 18 h. Para inactivar la enzima se sometió la preparación nuevamente al proceso de desnaturalización.

Acoplamiento de glicopéptidos a β -lactoglobulina

Glicopéptidos de tipo alta manosa (1 mg), obtenidos por degradación de tiroglobulina con Pronasa, se disolvieron en 0.3 ml de agua y se mezclaron con 0.1 ml de 0.4 M buffer fosfato de sodio conteniendo 1.5 mg de β -lactoglobulina bovina. Se agregaron entonces gota a gota 0.2 ml de una solución 20 mM de glutaraldehído y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con agitación. Luego se agregaron 9 μ l de una solución 275 mM de NaCNBH₃ en 0.1 N NaOH y la mezcla se incubó otros 30 min a temperatura ambiente. La solución fue desalada en Fast Desalter (Pharmacia)

equilibrado en 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.15 M NaCl. La muestra fue suplementada con CaCl₂, MnCl₂ y MgCl₂ a una concentración final de 2 mM y sembrados en una columna de Con A-Sepharosa (3 ml) equilibrada en la misma solución. La columna fue lavada con el mismo buffer y la β -lactoglobulina derivatizada se eluyó a 37 °C con 0.2 M α -metilmanósido en el mismo buffer. Finalmente la muestra fue dializada y liofilizada.

Acoplamiento de glicopéptidos a la nucleasa de Staphylococcus

Glicopéptidos de tipo alta manosa (1 mg), obtenidos por degradación de tiroglobulina con Pronasa, se disolvieron en 0.45 ml de buffer borato de sodio 0.2 M pH 7.4. Se agregaron entonces 50 μ l de dimetilsulfóxido conteniendo el equivalente a un exceso molar de 30 veces de 3-(2-piridilditio)propionato. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente 30 min y desalada en una columna de Sephadex G-10 (57 x 1 cm) equilibrada en 2-propanol 7 %. Las fracciones conteniendo los glicopéptidos fueron reunidas y llevadas a sequedad. Las mutantes completas o truncadas de la nucleasa de *Staphylococcus* conteniendo una cisteína (5 mg) fueron disueltas en 0.5 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM DTT e incubadas a temperatura ambiente durante 20 min. Las muestras fueron desaladas en columnas NAP-5 (Pharmacia) equilibradas en 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM EDTA. Las proteínas desaladas se mezclaron con los glicopéptidos derivatizados y la mezcla se incubó toda la noche a 4 °C. Las muestras se diluyeron con 5 volúmenes de 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.15 M NaCl y 2 mM CaCl₂, MnCl₂ y MgCl₂ y se sembraron en una columna de Con A-Sepharosa (3 ml) equilibrada en la misma solución. La columna fue lavada con el mismo buffer y la neoglicoproteína eluída a 37 °C con 0.2 M α -metilmanósido. El material eluído se dializó contra 20 mM Tris-HCl pH 8.0.

Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano

El espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de la nucleasa completa y nativa (65 μ M), del fragmento 1-135 K70C-Glico (18 μ M) y del fragmento 1-135 K70C-Glico + Ca²⁺ (10 mM) y 3',5' difosfotimidina (pdTp) (1 mM) fue registrado en un espectropolarímetro Jasco. El promedio de 5 espectros menos el espectro del buffer correspondiente (20 mM Tris-HCl pH 8.0 con o sin Ca²⁺ y pdTp) es mostrado para cada una de las proteínas.

Proteólisis limitada de especies glicosiladas de la nucleasa de Staphylococcus

La neoglicoproteína completa (K70C-Glico, 25 µg) y la troncada (1-135 K70C-Glico, 25 µg) fueron incubadas con 50 ng de tripsina a 37 °C en un solución conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂ y 1 mM pDTP. Se retiraron alícuotas a los tiempos indicados, se mezclaron con "cracking buffer" y se calentaron a 100 °C durante 5 min. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE según Schägger y von Jagow (92).

Renaturalización de SBA

Se realizó según lo indicado por Nagai y Yamaguchi (93, 94) con algunas modificaciones. Aglutinina de soja pura fue desnaturalizada en 6 M clorhidrato de guanidina, 50 mM HEPES pH 7.0. La muestra se diluyó 100 veces en 100 mM HEPES pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MnCl₂, a una concentración final de proteína de 40 µg/ml y se incubó a 23 °C para permitir su renaturalización. A los tiempos indicados la fluorescencia intrínseca de triptofano fue registrada a 350 nm (excitación a 280 nm). Alícuotas de la mezcla de renaturalización (40 µl) fueron tomadas a los tiempos indicados y su capacidad aceptora de glucosa se midió en un volumen final de 50 µl conteniendo las siguientes concentraciones finales: 80 mM HEPES pH 7.0, 80 µM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 42 µM UDP-[¹⁴C]Glc, 0.3 µM glucosiltransferasa y 32 µg/ml SBA. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 min.

Tratamientos realizados sobre aglutinina de soja (SBA)

Tratamiento con anhídrido acético (95): SBA pura (14.9 mg) se disolvieron en 0.2 ml de agua y se agregaron 0.2 ml de solución saturada de acetato de sodio. A esta solución se agregaron tres porciones de 3 µl cada una de anhídrido acético distribuidas en un lapso de 30 min y luego se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Finalmente la muestra se llevó a sequedad, se disolvió en 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, se calentó a 60 °C durante 4 h y se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Tratamiento con anhídrido succínico (96): 20 mg de SBA pura fueron disueltos en 1 ml de buffer carbonato de sodio 1 M pH 8.0 y 25 mg de cristales de anhídrido succínico se agregaron en el lapso de 1 h. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 2 h y luego dializada exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Finalmente la muestra se llevó a sequedad, se disolvió en 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, se calentó a 60 °C durante 4 h y se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Tratamiento con cianato de potasio (97): Se trataron 20 mg de SBA pura con 1 ml de una solución conteniendo 0.2 M buffer borato de sodio pH 8.0, 1 M cianato de potasio. La mezcla se incubó a 37 ° C durante 20 h y luego se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Finalmente la muestra se llevó a sequedad, se disolvió en 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, se calentó a 60 ° C durante 4 h y se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Tratamiento con I₂ (98): Se trataron 20 mg de SBA pura con 0.1 ml de una solución conteniendo 0.05 M I₂, 0.24 M KI. La mezcla se incubó en hielo durante 25 min y la reacción se detuvo por agregado de 5 gotas de NaSO₃H 1 M. Luego se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Finalmente la muestra se llevó a sequedad, se disolvió en 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, se calentó a 60 ° C durante 4 h y se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Tratamiento con tetranitrometano (99): Se disolvieron 20 mg de SBA pura en 5.7 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y se mezclaron con 0.15 ml de una solución 0.85 M de tetranitrometano (TNM) en etanol 95 %. La mezcla se dejó reaccionar por el término de 20 min y luego se agregaron otros 0.15 ml de la solución de tetranitrometano dejando reaccionar la mezcla un total de 1 h y se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Finalmente la muestra se llevó a sequedad, se disolvió en 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, se calentó a 60 ° C durante 4 h y se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Tratamiento con ciclohexanodiona (100): Se disolvieron 20 mg de SBA y 30 mg de ciclohexanodiona (CHD) en 2 ml de NaOH 0.2 M y se dejó reaccionar la mezcla por el término de 15 h. Luego se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Finalmente la muestra se llevó a sequedad, se disolvió en 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, se calentó a 60 ° C durante 4 h y se dializó exhaustivamente contra 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Interacción de la glucosiltransferasa con péptidos hidrofóbicos (Tablas VII-IX)

En todos los experimentos la glucosiltransferasa se encontraba en una solución conteniendo 10 mM imidazol-HCl pH 7.0, 5 % sacarosa, 5 mM 2-mercaptoetanol a una concentración de 1 mg/ml excepto en el experimento 4 Tabla VIII donde se encontraba a una concentración de 0.5 mg/ml. Los nonapéptidos hidrofóbicos estaban disueltos a una concentración de 0.2 mM en 5 % dimetilsulfóxido. El

nonapéptido hidrofílico estaba disuelto a una concentración de 1.2 mM en 5 % dimetilsulfóxido. Las mezclas se centrifugaron en centrífuga Eppendorf a 15.000 x g y las mitades superiores fueron removidas. Las mitades inferiores fueron agitadas vigorosamente en Vortex.

Tabla VII: 50 µl de glucosiltransferasa fueron mezclados con 150 µl del nonapéptido y luego de la centrifugación se midió la actividad de glucosiltransferasa en ambas mitades como fue descrito en ensayo standard de glucosiltransferasa.

Tabla VIII experimento 1: en este caso el nonapéptido fue marcado con [¹²⁵I]NaI y en mezclas iguales que las anteriores, la marca radioactiva se cuantificó en 45 µl de cada mitad. Experimentos 2 y 3: en estos casos las mezclas contenían 25 µl de glucosiltransferasa, 50 µl de nonapéptido y 120 µg de SBA nativa o desnaturalizada en 25 µl de 10 mM imidazol-HCl pH 7.0. Se ensayó la actividad de glucosiltransferasa en ambas mitades. Experimento 4: 87 µl de glucosiltransferasa, 42 µl de 10 mM imidazol-HCl pH 7.0 conteniendo 205 µg de SBA desnaturalizada y 35 µl del péptido hidrofóbico se mezclaron con 564 µl de Tris-HCl pH 8.0. La concentración de proteína se midió en ambas mitades luego del paso de centrifugación.

Tabla IX: 25 µl de glucosiltransferasa, 50 µl de péptido y 25 µl de agua fueron mezclados y centrifugados. La mitad superior fue removida y 50 µl de 10 mM imidazol-HCl pH 7.0 conteniendo 245 µg de SBA desnaturalizada fueron agregados a la mitad inferior. El tubo fue agitado vigorosamente en Vortex, incubado a 37 ° C por 10 min y centrifugado nuevamente. La actividad de glucosiltransferasa fue ensayada en ambas mitades.

Marcado de péptidos con (¹²⁵I)NaI

Fue realizado por el método del Iodo-Gen (101). La actividad específica del péptido obtenido fue 2.8 mCi/mmol.

Unión de la glucosiltransferasa a péptidos hidrofóbicos (Tabla X)

Los nonapéptidos (1.5 mM) disueltos en 5 % dimetilsulfóxido fueron acoplados a Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La glucosiltransferasa (50 µl) fue mezclada con un volumen igual de 40 mM HEPES pH 7.0, 0.3 M NaCl y sembrado en columnas conteniendo 0.5 ml de cada resina equilibradas en 20 mM HEPES pH 7.0, 0.15 M NaCl. La elución se realizó con el mismo buffer y se recogieron fracciones de 0.1 ml. Luego de la quinta fracción las columnas se lavaron con 3 porciones de 1 ml del buffer de elución y las resinas fueron extraídas de las columnas. La actividad de glucosiltrans-

ferasa fue medida en los eluidos y en las resinas en diferentes condiciones y por lo tanto no deben ser cuantitativamente comparadas.

Actividad de la nucleasa de Staphylococcus

Se realizó según lo descrito por Cuatrecasas y colaboradores (102), en 1 ml de solución conteniendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA desnaturalizado por calor, 1 mg/ml de BSA y 50 mM Tris-HCl pH 8.8. Se midió el cambio de absorbancia a 260 nm.

RESULTADOS

Influencia de la secuencia primaria de los oligosacáridos en la velocidad de glucosilación.

Como se mencionó anteriormente, los oligosacáridos $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína son glucosilados por la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa para dar los correspondientes productos monoglucosilados $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Los primeros experimentos que se realizaron para describir la especificidad de la glucosiltransferasa, estuvieron orientados a determinar si la enzima glucosilaba preferencialmente algún oligosacárido en particular. Para estudiar si los tres oligosacáridos aceptores eran glucosilados a la misma velocidad, y para no tener ninguna interferencia de la parte proteica de la molécula aceptora, se realizaron experimentos utilizando como aceptores de glucosa los glicopéptidos obtenidos por degradación exhaustiva de tiroglobulina bovina y porcina con una proteasa inespecífica. Yamashita y colaboradores (103) determinaron que un solo residuo de asparagina permanece unido al oligosacárido cuando la ovoalbúmina era degradada con Pronasa en las condiciones empleadas en este estudio. Sin embargo para asegurar que un solo aminoácido permanecía unido al oligosacárido (o en el peor de los casos solo unos pocos de ellos) el procedimiento descrito por Yamashita se efectuó dos veces, primero sobre la tiroglobulina y luego sobre los glicopéptidos resultantes (ver Materiales y Métodos). Experimentos preliminares mostraron que estos glicopéptidos son pobremente glucosilados *in vitro* por la glucosiltransferasa. Sin embargo en las condiciones de reacción utilizadas se logró una incorporación de glucosa adecuada para el estudio.

Los glicopéptidos obtenidos fueron incubados con UDP- ^{14}C Glc y membranas microsomales de hígado de rata, las reacciones se detuvieron agregando 50 % metanol y los sobrenadantes se corrieron en electroforesis con 10 % ácido fórmico. Las sustancias cargadas positivamente en la electroforesis fueron eluidas, tratadas con Endo H y corridas en electroforesis en papel para analizar los productos obtenidos (Fig 5A y 5B: patrones de glicopéptidos glucosilados de tiroglobulina porcina y bovina respectivamente).

Para poder estudiar el perfil de los sustratos aceptores utilizados, glicopéptidos no marcados, obtenidos por degradación exhaustiva de tiroglobulinas bovina y porcina fueron tratados con Endo H, reducidos con borohidruro de sodio tritiado y corridos en cromatografía en papel (Fig 5C Y 5D: perfiles de glicopéptidos obtenidos a partir de tiroglobulina porcina y bovina respectivamente). La comparación de los paneles A,

C y B, D muestran diferencias significativas. Por ejemplo, en ambos sustratos el compuesto $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ constituyó una proporción relativamente alta de los oligosacáridos presentes (Fig 5 C y D), sin embargo muy pequeñas cantidades de $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ fueron obtenidas en ambos casos como productos de la reacción de glucosilación (Fig 5 A y B). Esto podría deberse a que el procesamiento hubiera removido del compuesto $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (y del $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$) la unidad de manosa a la que se une el residuo de glucosa en la reacción de glucosilación. Se sugiere referirse a la Fig. 4 para un mejor entendimiento de este y otros puntos explicados mas adelante.

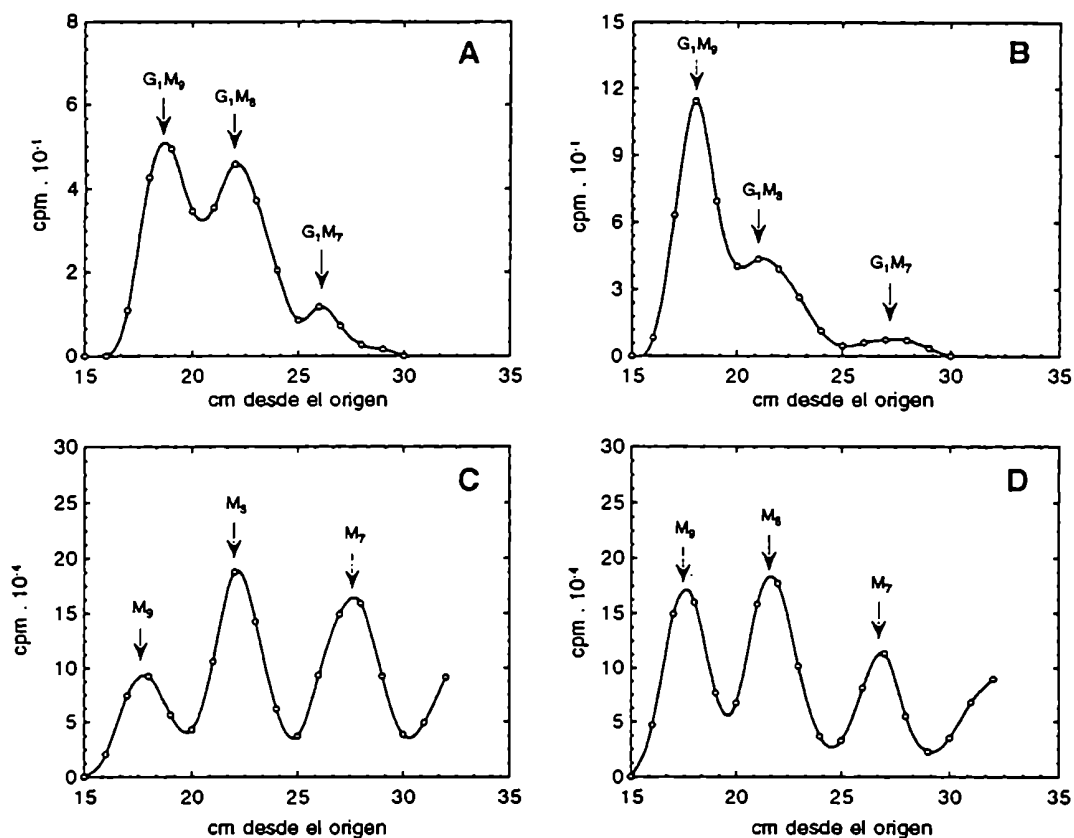


Figura 5. Influencia de la secuencia primaria de los oligosacáridos en la velocidad de glucosilación.

Paneles A y B: glicopeptidos obtenidos por degradación exhaustiva con Pronasa de tiroglobulina porcina (A) y bovina (B), fueron incubados con $\text{UDP-}^{14}\text{C}\text{Glc}$ y glucosiltransferasa durante 30 min a 37°C . Los glicopeptidos glucosilados fueron tratados con Endo H y corridos en cromatografía en papel (solvente A). Paneles C y D: los glicopéptidos de las tiroglobulinas porcina (C) y bovina (D) utilizados como sustrato en A y B fueron tratados con Endo H, reducidos con borohidruro de sodio tritiado y corridos en cromatografía en papel (solvente A). Standards: G_1M_9 , $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$; G_1M_8 , $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}$; G_1M_7 , $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$; M_9 , $\text{Man}_9\text{GlcNAcol}$, M_8 , $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$, M_7 , $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Para cuantificar que proporción de los isómeros de Man₇GlcNAcol y Man₈GlcNAcol contienen el residuo de manosa necesario para poder ser utilizados como sustrato de la glucosiltransferasa, se sometió estos compuestos (y al Man₉GlcNAcol) a acetólisis. Esta es una reacción química que rompe preferencialmente uniones $\alpha(1,6)$ entre unidades de manosa.

Dado que los oligosacáridos se encontraban marcados en su extremo reductor, el único compuesto marcado que se esperaba obtener por tratamiento del Man₉GlcNAcol era Man₄GlcNAcol, mientras que el Man₈GlcNAcol y el Man₇GlcNAcol debían producir Man₄GlcNAcol y/o Man₃GlcNAcol. La proporción de Man₄GlcNAcol está en relación directa con la cantidad de los isómeros que pueden ser utilizados como sustratos en la reacción de glucosilación (es decir los que contienen la manosa a la cual se adiciona el residuo de glucosa; residuo "g" Fig. 4) ya que solo éstos darán como producto Man₄GlcNAcol. En la Fig. 6 se muestran los perfiles obtenidos por acetólisis de los distintos oligosacáridos aceptores de las tiroglobulinas bovina y porcina. Los perfiles obtenidos para los oligosacáridos Man₉GlcNAcol de cada una de las tiroglobulinas se muestran en la Fig. 6A y 6D. Si bien el producto principal fue como se esperaba Man₄GlcNAcol, en los cromatogramas también se aprecian fragmentos mas pequeños producidos por clivaje inespecífico (estos son productos normales de la reacción de acetólisis). De todas maneras la acetólisis de Man₈GlcNAcol y Man₇GlcNAcol produjeron cantidades mucho mayores de Man₃GlcNAcol que el Man₉GlcNAcol (Fig. 6 B, C, E y F).

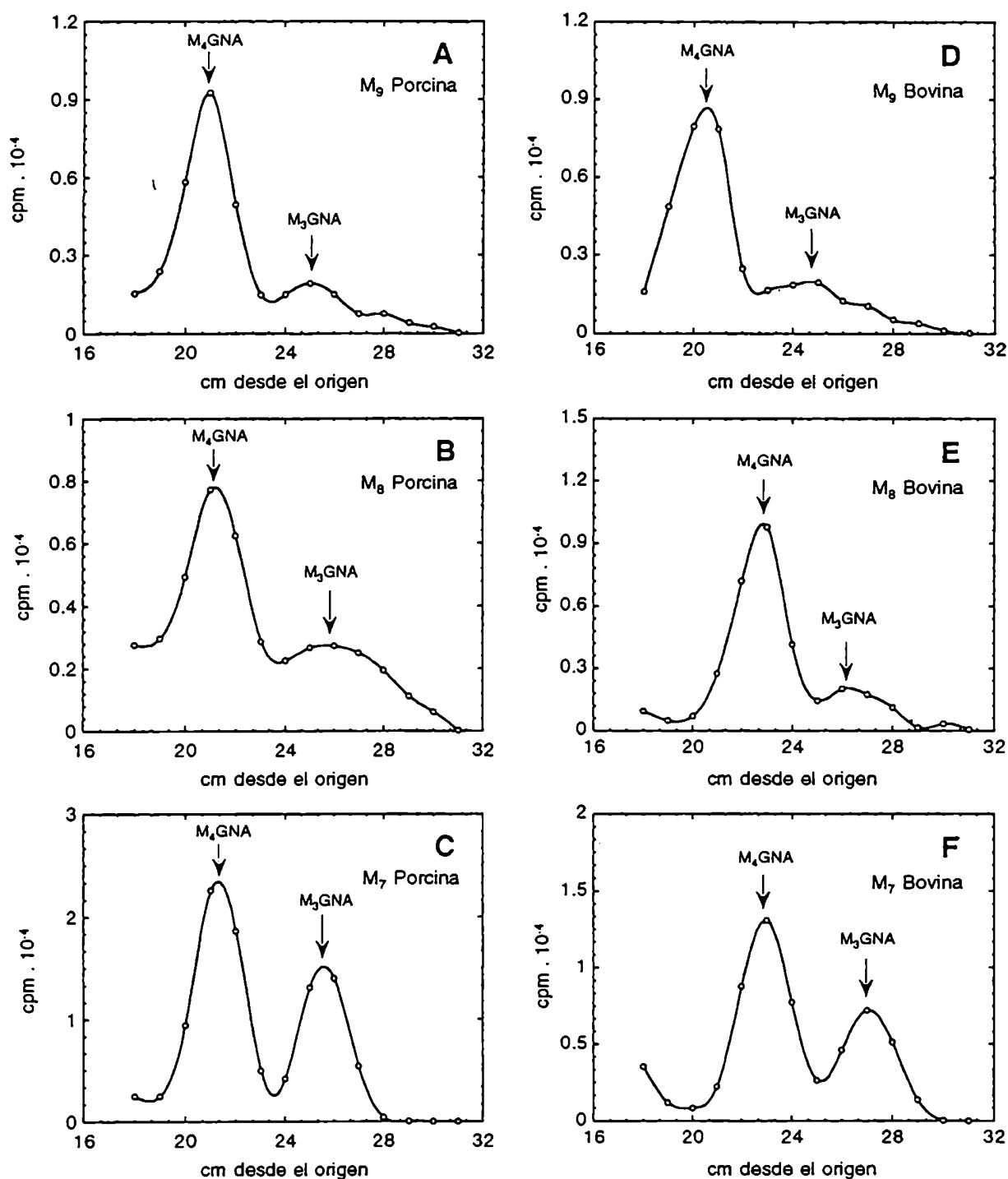


Figura 6. Acetólisis de glicopéptidos sustrato

Las sustancias migrando como Man₉GlcNAcol (A y D), Man₈GlcNAcol (B y E) y Man₇GlcNAcol (C y F) en la curva C y D de la Fig. 5 fueron sometidas a acetólisis y luego corridas en cromatografía en papel (solvente B). Standards: M₄GNA, Man₄GlcNAcol; M₃GNA, Man₃GlcNAcol. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Los datos obtenidos de las acetólisis de $\text{Man}_9\text{GlcNAcol}$, $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$ provenientes de ambas tiroglobulinas permitieron calcular que proporción de los oligosacáridos $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$ que se utilizaron como sustratos (Fig 5C y D) poseían la estructura necesaria para ser usados como aceptores. Teniendo en cuenta estos resultados y el porcentaje de cada una de los productos de reacción obtenidos (Fig 5A y B) se realizó el cálculo de las capacidades aceptora relativas de los oligosacáridos $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (15 %) y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (50 %) con respecto al $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (100 %) que se representan en la Fig. 7. Estos datos indican que el procesamiento de los oligosacáridos por las α -manosidasas del retículo endoplásmico afecta fuertemente la glucosilación de glicoproteínas aún cuando la unidad de manosa a la cual se unen los residuos de glucosa se halle presente.

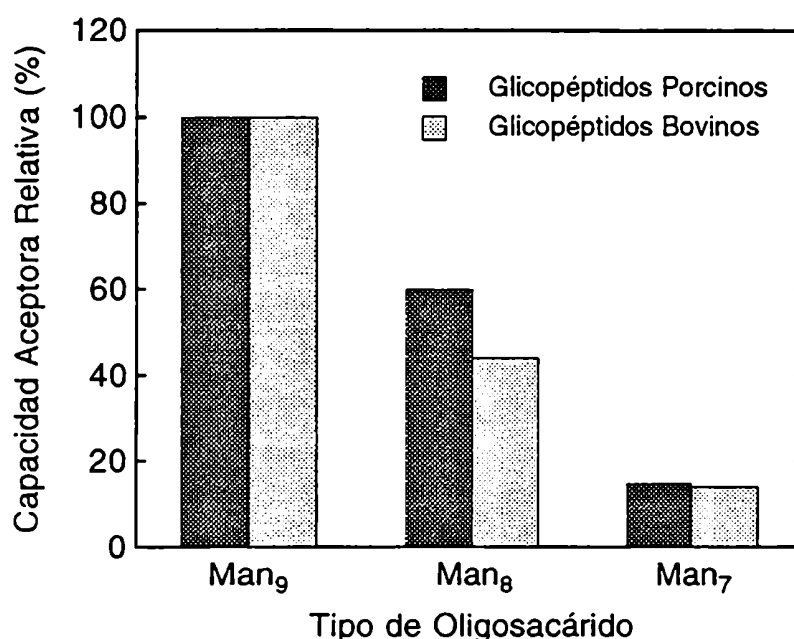


Figura 7. Capacidad aceptora relativa de glicopéptidos.

La capacidad aceptora de aquellos glicopéptidos que contienen el resto de manosa al cual el residuo de glucosa es agregado por la glucosiltransferasa, se calculó como se indica en el texto. La capacidad aceptora del $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Asn derivado de tiroglobulinas porcina o bovina fue tomada como 100 %.

Efecto de la desnaturalización en la capacidad aceptora de las glicoproteínas.

En trabajos anteriores se había utilizado tiroglobulina bovina como sustrato de la enzima en los ensayos *in vitro* (78). Durante estos ensayos, se hizo la interesante observación de que la forma nativa de esta glicoproteína no era glucosilada *in vitro*. Sin embargo la desnaturalización de esta misma glicoproteína por agentes químicos como 8 M urea, seguida por la remoción del desnaturalizante, generaba una especie que era eficientemente glucosilada por la glucosiltransferasa. Los productos que se formaban por la glucosilación *in vitro* de la tiroglobulina, fueron oligosacáridos monoglucosilados de estructura $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (78) en concordancia con los productos observados para la glucosilación *in vivo* (75, 76).

Con el objeto de ampliar el estudio de la especificidad de la glucosiltransferasa, también se ensayaron otras glicoproteínas de alta manosa como tiroglobulina (Tg) porcina, ribonucleasa B (RNAsa B) de páncreas bovino, aglutinina de porotos de soja (SBA) y fitohemoaglutinina (PHA) (una aglutinina de porotos comunes) como posibles sustratos para la reacción de glucosilación. En todos los casos las formas nativas de dichas glicoproteínas resultaron muy pobremente glucosiladas o no glucosiladas en absoluto. Sin embargo tratamientos de desnaturalización de las glicoproteínas (ver Materiales y Métodos) generaron formas capaces de ser glucosiladas (Tabla I). El cambio conformacional asociado al aumento de la capacidad aceptora fue monitoreado a través del corrimiento del máximo de emisión de fluorescencia (104). El triptofano es prácticamente el único fluoróforo de importancia en las proteínas y el máximo de fluorescencia que se observa para este aminoácido en la mayoría de las proteínas nativas corresponde a los 330 nm. El corrimiento observado en dicho máximo de fluorescencia hacia longitudes de onda mayores, provocado por el tratamiento de desnaturalización, indica que el triptofano se encuentra en un entorno más hidrofílico, típico de estadios no nativos. En el caso de la RNAsa B, que no contiene triptofano, el estado conformacional fue monitoreado por el corrimiento del máximo de absorción ultravioleta que corresponde a las tirosinas (105). Para incrementar la sensibilidad de la detección se evaluó la cuarta derivada del espectro de absorción UV y se siguió el corrimiento de los dos picos más prominentes en esta transformación. El corrimiento que se observa hacia longitudes de onda menores también corresponde a la transferencia de los residuos de tirosina a un entorno más hidrofílico que, como ya se mencionó, es típico de los estadios no nativos. En todos los casos, este tipo de cambios conformacionales fueron necesarios para la aparición de la capacidad aceptora de glucosa.

TABLA I.
EFECTO DE LA DESNATURALIZACIÓN EN LA CAPACIDAD ACEPTORA DE GLUCOSA.

Adiciones a la mezcla de incubación	cpm unida a glicoproteína	Longitud de onda ^b (nm)
ninguna	110	
PHA, nativa	535	332
PHA, desnaturalizada	2348	339
SBA, nativa	195	328
SBA, desnaturalizada	6275	340
Tg bovina, nativa	421	332
Tg bovina, desnaturalizada	4082	341
Tg porcina, nativa	262	332
Tg porcina, desnaturalizada	2969	340
ninguna	366	
RNAsa B, nativa	477	278.2; 286.5
RNAsa B, desnaturalizada	1748	277.6; 284.6

^aLa capacidad aceptora de glucosa se ensayó como se indica en Materiales y Métodos en un volumen total de 100 μ l, utilizando 250-400 μ g de las glicoproteínas sustrato y glucosiltransferasa soluble de hígado de rata (30-50 μ g de proteína). Se cuantificó la radioactividad unida a proteína por el método del ácido tricloroacético. ^bPara las primeras cuatro glicoproteínas la longitud de onda corresponde al máximo de fluorescencia intrínseca del triptofano (excitando a 280 nm), en el caso de la RNAsa B, los valores corresponden a dos picos de la cuarta derivada del espectro de absorción ultravioleta.

Capacidad aceptora de glicopéptidos obtenidos por digestión con Pronasa.

Como se demostró en trabajos anteriores y en los experimentos descritos en la sección anterior, solo las formas desnaturalizadas de las glicoproteínas son eficientemente glucosiladas por la glucosiltransferasa (78). Una de las hipótesis más sencillas para explicar este fenómeno sería especular que los oligosacáridos no se encuentran accesibles a la glucosiltransferasa en el estado nativo de las glicoproteínas, y que el tratamiento de desnaturalización hace accesibles los oligosacáridos y permite la glucosilación de los mismos. Una hipótesis más compleja involucraría el reconocimiento, por parte de la glucosiltransferasa, de elementos en la cadena polipeptídica,

que fueran necesarios para permitir la glucosilación, y que solo se encuentren expuestos en las formas no nativas de las glicoproteínas sustrato.

Con el objeto de ensayar la primera hipótesis, se estudió la glucosilación de glicopéptidos de alta manosa obtenidos por degradación exhaustiva de tiroglobulina bovina con una proteasa inespecífica (Pronasa). En la Fig. 8 se muestran las velocidades iniciales de glucosilación de éstos glicopéptidos y la de la misma cantidad de oligosacáridos de alta manosa pero unidos a la tiroglobulina desnaturalizada sin digerir. Se ha determinado que aproximadamente el 2 % del peso total de la tiroglobulina bovina es aportado por oligosacáridos de tipo alta manosa (86). En base a este dato se calculó la cantidad de tiroglobulina equivalente a los glicopéptidos para cada caso.

Como puede observarse en la Fig. 8, a pesar de la total exposición al solvente de los oligosacáridos en los glicopéptidos (están unidos a uno, o unos pocos aminoácidos), estos son glucosilados con una eficiencia por lo menos 100 veces menor que los mismos oligosacáridos unidos a la proteína desnaturalizada.

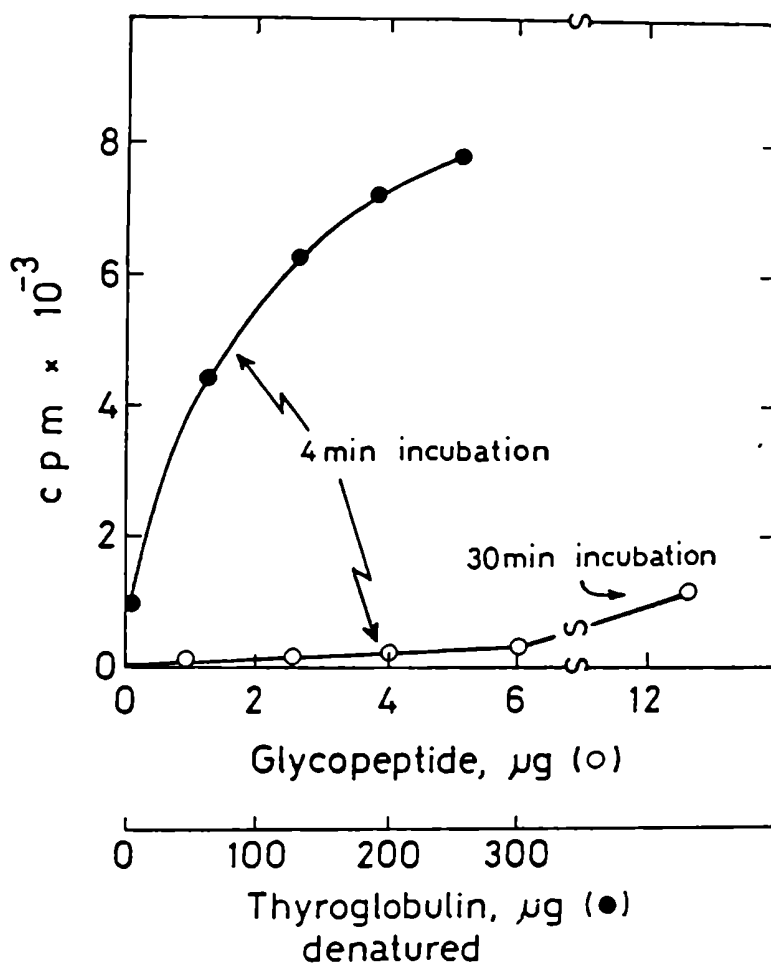


Figura 8. Velocidades iniciales de glucosilación de oligosacáridos unidos a tiroglobulina desnaturalizada o a residuos de asparagina.

Las cantidades indicadas de tiroglobulina bovina desnaturalizada o de glicopeptidos obtenidos por degradación de la misma glicoproteína, fueron incubados por 4 min (o 30 min donde se indica) a 37 °C con 0.7 % Triton X-100, 10 mM CaCl₂, 100 μM DNJ, 4 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.6 mg de proteínas de membrana microsomal de hígado de rata y 3 μM UDP-[¹⁴C]Glc en un volumen total de 100 μl. La incorporación de glucosa en la glicoproteína y en los glicopéptidos fue cuantificada por los métodos A y B respectivamente (ver Materiales y Métodos).

Glucosilación de glicopéptidos derivados de glicoproteínas tripsinizadas:

Como se muestra mas arriba, los glicopéptidos obtenidos por degradación de glicoproteínas con Pronasa, son muy pobremente glucosilados por la glucosiltransferasa. El tratamiento con Pronasa genera glicopéptidos con un solo aminoácido, es decir, el oligosacárido unido a la asparagina (103). Existe, por lo tanto, la posibilidad de que estos glicopéptidos no sean eficientemente glucosilados debido a que la enzima requiera sustituciones aminoacídicas en la asparagina para poder utilizar un glicopéptido como sustrato. Para ensayar esta posibilidad, se prepararon glicopéptidos por tratamiento de las glicoproteínas con tripsina libre de quimotripsina y éstos fueron utilizados como sustratos de la reacción de glucosilación como se muestra en la Tabla II.

TABLA II.
EFFECTO DE LA TRIPSINA EN LA GLUCOSILACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

Experimento	Glicoproteína agregada	cpm incorporadas
1	ninguna	843
	PHA (desnaturalizada)	4039
	PHA (desnaturalizada + tripsina)	363
2	SBA (desnaturalizada)	6244
	SBA (desnaturalizada + tripsina)	358
3	ninguna	0
	Tg (desnaturalizada)	1594
	Tg (desnaturalizada + tripsina)	1536
	Tg (desnaturalizada y reducida)	1425
	Tg (desnaturalizada y reducida + tripsina)	0
	Tg (desnaturalizada + tripsina; luego reducida)	0

^aLa capacidad aceptora de glucosa se ensayo como se indica en Materiales y Métodos en un volumen total de 100 μ l, utilizando 500 μ g de las glicoproteínas sustrato y glucosiltransferasa soluble de hígado de rata (30-50 μ g de proteína) en los experimentos 1 y 2, y glucosiltransferasa pura de hígado de rata (5 μ g) en el experimento 3. Se cuantificó la radioactividad unida a proteína por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Tanto con la SBA como con la fitohemoaglutinina se obtuvieron resultados similares: los glicopéptidos trípticos no son glucosilados eficientemente por la glucosiltransferasa. Los resultados no variaron cuando la digestión con tripsina y la reacción con glucosiltransferasa se llevaron a cabo en presencia de 0.15 % de Triton X-100, sugiriendo que la falta de capacidad aceptora no se debe a insolubilidad de los glicopéptidos. Un resultado diferente parecía obtenerse con la tiroglobulina, ya que el tratamiento con tripsina de la proteína desnaturalizada, no abolía su capacidad aceptora. A diferencia de las aglutininas que no contienen cisteínas, la tiroglobulina está formada por dos monómeros de 330 kDa que contienen varios puentes disulfuro intra e intercatenarios. La digestión con tripsina de la proteína desnaturalizada con urea genera péptidos y glicopéptidos que quedan unidos entre sí por puentes disulfuro. Esta estructura es capaz de funcionar como sustrato de la glucosiltransferasa. La digestión de tiroglobulina desnaturalizada y reducida produce péptidos libres que no son capaces de aceptar glucosa en la reacción de glucosilación. La noción de que los péptidos y glicopéptidos deben estar unidos y formando parte de algún tipo de estructura para ser sustratos de la reacción de glucosilación, queda confirmada en el experimento mostrado en la última línea de la Tabla II. Allí se muestra que los mismos glicopéptidos que funcionan como sustrato cuando se encuentran unidos por puentes disulfuro (Tabla II, experimento 3, línea 3) pierden su capacidad aceptora cuando se los separa por reducción de los mencionados puentes disulfuro (Tabla II, experimento 3, línea 6)

Los resultados que se muestran en la tabla II refuerzan los que se obtuvieron anteriormente con los glicopéptidos derivados de las digestiones con Pronasa. En ambos casos se demuestra que, a pesar de que los oligosacáridos se encuentran totalmente expuestos, los glicopéptidos no funcionan como sustratos de la glucosiltransferasa.

Tanto la fitohemoaglutinina como la SBA contienen un solo oligosacárido de tipo alta manosa por molécula. La digestión con tripsina de la SBA genera, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos conocida (106), un glicopéptido de 22 aminoácidos que contiene el oligosacárido en la posición 13 de dicho péptido. En el caso de la fitohemoaglutinina, el glicopéptido generado es de 10 aminoácidos y el oligosacárido se encuentra en la posición 2 (106). Ninguno de estos dos glicopéptidos fue eficientemente glucosilado. Esto descarta la posibilidad de que la pobre glucosilación observada con los glicopéptidos derivados de las digestiones con Pronasa, se deba a que la enzima requiriera de sustituciones aminoacídicas en la asparagina que tiene el oligosacárido unido para que la reacción de glucosilación tenga lugar.

Accesibilidad de oligosacáridos tipo alta manosa en glicoproteínas nativas:

Los experimentos en la tabla III muestran que si bien solo las formas desnaturalizadas de la tiroglobulina, fitohemoaglutinina y SBA son glucosiladas por la glucosiltransferasa, tanto la forma nativa como la desnaturalizada de las glicoproteínas son reconocidas por la Con A-Sepharosa (que une oligosacáridos tipo alta manosa) sugiriendo que los oligosacáridos son accesibles en ambas conformaciones.

TABLA III.
ACCESIBILIDAD DE OLIGOSACÁRIDOS DE GLICOPROTEÍNAS NATIVAS A CON A-SEPHAROSA

Glicoproteína agregada	cpm incorporadas en los productos de reacción ^a	Porcentaje de la glicoproteína unida a la lectina ^b
ninguna	375	--
PHA (nativa)	482	100
PHA (desnaturalizada)	4012	100
ninguna	201	--
SBA (nativa)	205	100
SBA (desnaturalizada)	5631	100
ninguna	912	--
Tg (nativa)	921	100
Tg (desnaturalizada)	5842	100

^aLas capacidadesceptoras de glucosa se ensayaron en un medio de reacción que contenía en un volumen total de 100 μ l, 5 mM CaCl₂, buffer 7 mM Tris-HCl pH 8.0, 370 μ M castanospermina, 8 μ M UDP-[¹⁴C]Glc, 0.5 mg de las glicoproteínas indicadas en la Tabla, glucosiltransferasa soluble de hígado de rata (30-50 μ g de proteína). Luego de 5 minutos a 37 °C las muestras se procesaron de acuerdo al método A (ver Materiales y Métodos). ^bTubos paralelos conteniendo solo las glicoproteínas se diluyeron con 0.5 ml de 0.15 M NaCl, buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂. Se agregó a los tubos la misma cantidad de Con A-Sepharosa suspendida en la misma solución. Luego de 10 min a 37° C se cuantificó la cantidad de proteína en el sobrenadante de una centrifugación a baja velocidad.

Con el objeto de complementar los experimentos realizados con Con A que se muestran en la tabla III, se utilizaron otras dos macromoléculas para ensayar el grado de exposición de los oligosacáridos en las estructuras nativas de las glicoproteínas. Fitoheмоaglutinina y tiroglobulina bovina nativas, fueron incubadas con Endo H, luego sujetas a tratamientos desnaturizantes y ensayadas como sustratos de la reacción de glucosilación (se verificó la inactivación de la Endo H durante el proceso de desnaturización).

TABLA IV.

ACCESIBILIDAD DE OLIGOSACÁRIDOS A ENDO H Y α -MANOSIDASA EN GLICOPROTEÍNAS NATIVAS.

Glicoproteína agregada	cpm incorporadas
ninguna	0
PHA (desnaturizada)	13206
PHA (nativa)	468
PHA (nativa + Endo H, luego desnaturizada)	2037
ninguna	0
Tg (desnaturizada)	3628
Tg (nativa)	0
Tg (nativa + Endo H; luego desnaturizada)	38
ninguna	0
Tg (desnaturizada)	4791
Tg (nativa)	0
Tg (nativa + α -manosidasa; luego desnaturizada)	842

Las capacidadesceptoras de glucosa fueron medidas en un volumen total de 100 μ l conteniendo 8 mM CaCl₂, 1.3 mM castanospermina, glucosiltransferasa de hígado de rata, buffer 20 mM acetato de trietilamina pH 7.0, 4 μ M UDP-[¹⁴C]Glc y 0.8 mg de las glicoproteínas indicadas. Luego de 5 min de incubación a 37 °C se cuantificó la cantidad de glucosa transferida por el método del ácido tricloroacético. Las especies deglicosiladas fueron preparadas como se explica en Materiales y Métodos.

Como se muestra en la tabla IV, tanto la capacidad aceptora de la tiroglobulina como la de la fitohemoaglutinina se ven fuertemente disminuídas por el tratamiento de las glicoproteínas nativas con Endo H. Un efecto similar fue observado cuando la tiroglobulina bovina nativa se trató con α -manosidasa de porotos y, luego de desnaturalizarla, se utilizó como sustrato aceptor de glucosa. Los resultados indican que los oligosacáridos de éstas glicoproteínas nativas se encuentran al menos parcialmente accesibles a las glicosidasas. La accesibilidad parcial de los oligosacáridos de tipo alta manosa en tiroglobulina nativa ha sido comunicada previamente por Trimble and Maley (107). Por otro lado, los oligosacáridos de la RNAsa B se encuentran totalmente expuestos en la glicoproteína nativa ya que pueden ser removidos por la Endo H a igual velocidad que en la proteína desnaturalizada (81). Estos datos coinciden con los reportados anteriormente por Tarentino et al. (108) y se encuentran, además, respaldados por la estructura cristalográfica de la RNAsa B en la que se observa una completa exposición al solvente del oligosacárido (109). A pesar de ello, la RNAsa nativa no resultó ser un buen aceptor de glucosa, contrastando con la capacidad aceptora observada con la misma glicoproteína desnaturalizada.

Como se mencionó anteriormente solo las formas desnaturalizadas de las glicoproteínas con oligosacáridos de tipo alta manosa son capaces de ser glucosiladas, *in vitro*, por la glucosiltransferasa. Los experimentos mostrados en las tablas I, II, III y IV se realizaron para ensayar la hipótesis de que las formas nativas de estas glicoproteínas no pueden ser glucosiladas porque sus oligosacáridos no se encuentran accesibles. Sin embargo los datos obtenidos descartan esta posibilidad ya que en los glicopéptidos los oligosacáridos están totalmente accesibles y éstos no son glucosilados. Además, los oligosacáridos de las formas nativas de las glicoproteínas, que no pueden ser glucosilados, son accesibles a sondas macromoleculares como la Con A, la Endo H y la α -manosidasa.

Las evidencias experimentales favorecen la hipótesis de que algún elemento de la parte proteica de la glicoproteína sustrato es reconocido por la glucosiltransferasa. Sin embargo este elemento no se encuentra disponible ni en las formas nativas de las glicoproteínas ni en los glicopéptidos trípticos ensayados.

Efecto de azúcares y glicoproteínas deglicosiladas en la reacción de glucosilación:

La Endo H es una endoglicosidasa que hidroliza la unión β entre los dos residuos de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos de tipo alta manosa (se sugiere ver como referencia la Fig. 4)

Como se muestra en la Fig. 9, las glicoproteínas desnaturalizadas y luego deglicosiladas con Endo H inhibieron la glucosilación de las especies desnaturalizadas. Tanto la tiroglobulina, como la fitohemoaglutinina y la SBA, cuando se desnaturalizaron y trataron con Endo H, fueron capaces de inhibir la glucosilación de las mismas glicoproteínas desnaturalizadas (Fig. 9 A, B y C). El efecto inhibitorio no solo se observó entre las especies glicosiladas y deglicosiladas de una misma proteína ya que como puede verse en la Fig. 9 D, la fitohemoaglutinina desnaturalizada y tratada con Endo H fue capaz de inhibir la glucosilación de tiroglobulina desnaturalizada. Esta inhibición no se debe a un efecto proteico inespecífico dado que, la seroalbúmina bovina nativa no fue capaz de inhibir la reacción de glucosilación (Fig. 9 A-C).

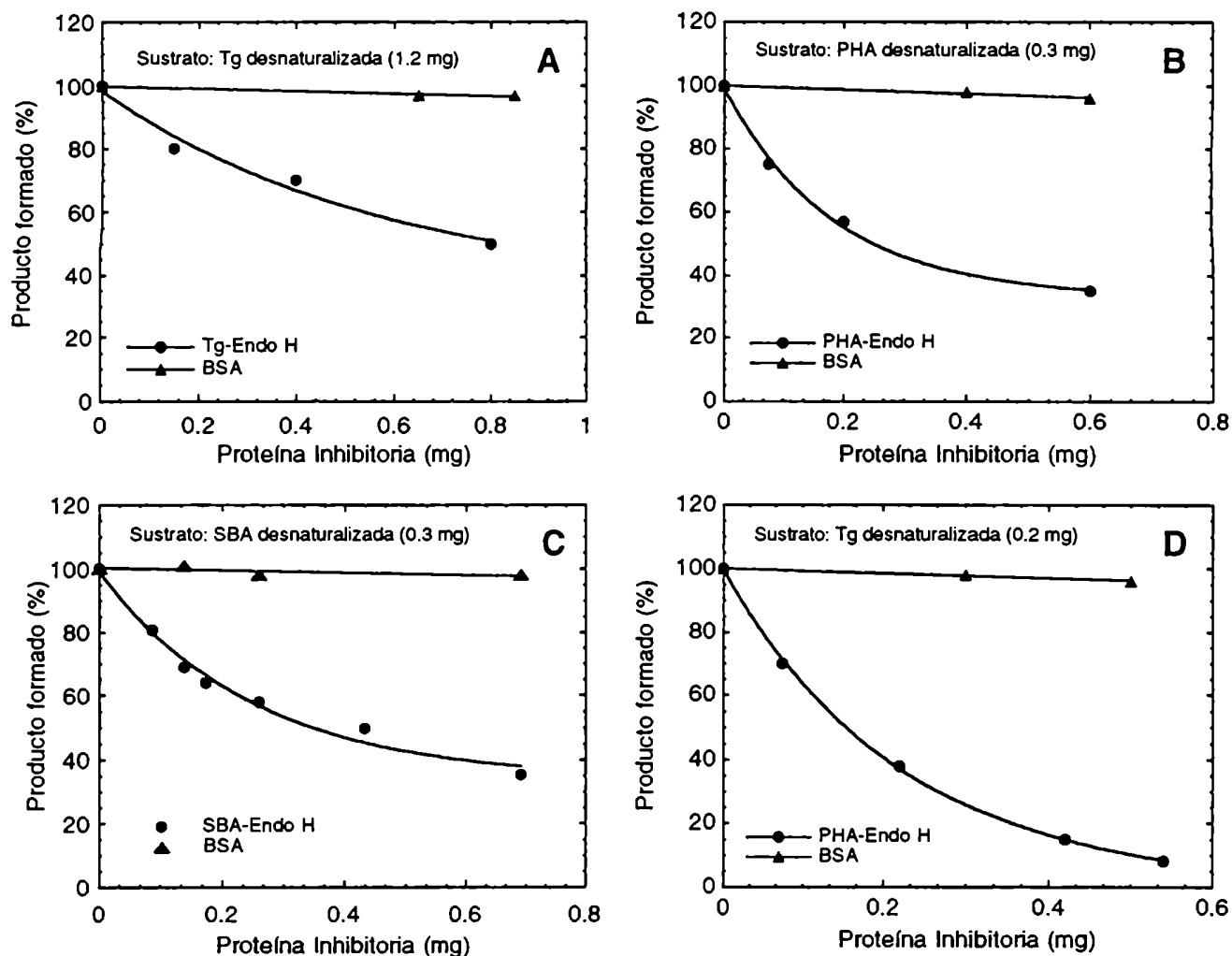


Figura 9. Inhibición de la glucosilación por glicoproteínas desnaturalizadas y deglicosiladas

Las cantidades indicadas de tiroglobulina bovina (A y D, Tg), fitohemoaglutinina (B, PHA) y aglutinina de soja (C, SBA) fueron incubadas con glucosiltransferasa de hígado de rata en un volumen total de 100 μ l conteniendo 8 μ M UDP-[14 C]Glc, 5 mM CaCl₂, 400 mM castanospermina, 35 mM buffer acetato de trietilamina pH 7.0, y cantidades crecientes de las especies deglicosiladas con Endo H o seroalbúmina bovina (BSA). Luego de 5 min a 37 °C la cantidad de glucosa incorporada fue cuantificada por el método del ácido tricloroacético. Las especies deglicosiladas fueron preparadas como se indica en Materiales y Métodos.

Estos resultados refuerzan la hipótesis enunciada mas arriba en cuanto sugieren la existencia, en el esqueleto proteico de las glicoproteínas, de algún elemento reconocido por la glucosiltransferasa. Esto se evidencia en el hecho de que glicoproteínas desnaturalizadas que no pueden funcionar como sustrato porque su oligosacárido fue removido por tratamiento con Endo H, son capaces de interactuar con la enzima produciendo una inhibición de la misma.

Por otra parte y en contraste con la inhibición producida por las glicoproteínas deglicosiladas, no se observó inhibición alguna por un exceso molar de 60 o 120 veces de α -metilmanósido, ni tampoco por un exceso molar de 4 veces de oligosacáridos tipo alta manosa unidos a asparagina (Fig. 10).

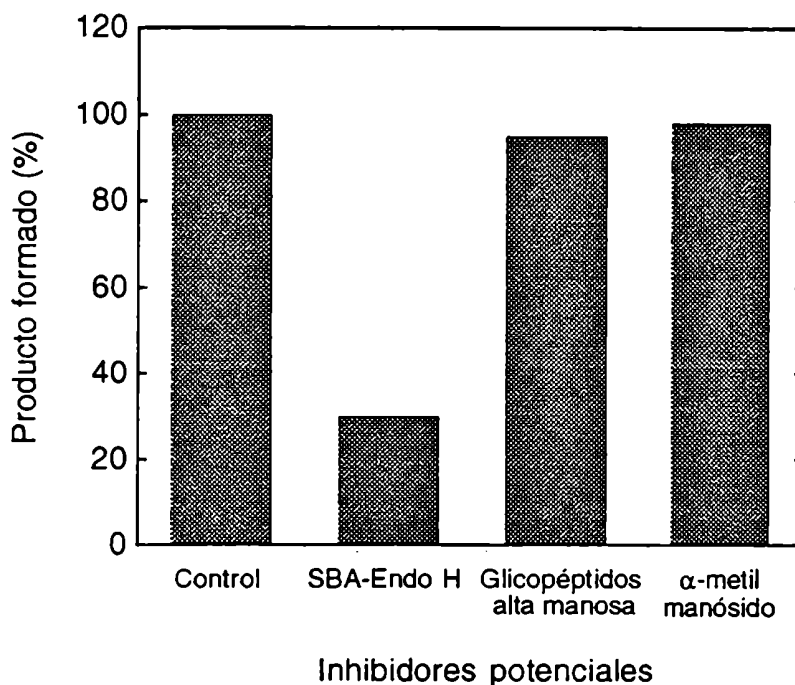


Figura 10. Efecto de azúcares y oligosacáridos sobre la reacción de glucosilación.

Glicopéptidos de alta manosa (0.2 mM) o α -metilmanósido (6 mM) fueron incubados con 10 μ g de glucosiltransferasa en un volúmen de 100 μ l conteniendo 5 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl_2 , 150 μ g de SBA desnaturalizada y 5 μ M de UDP- ^{14}C Glc. Luego de 5 min a 37 ° C la cantidad de glucosa incorporada fue cuantificada por el método del ácido tricloroacético.

La glucosiltransferasa es inhibida por glicoproteínas desnaturalizadas y deglicosiladas con Endo H, pero no por proteínas desnaturalizadas.

El hecho de que glicoproteínas desnaturalizadas y deglicosiladas con Endo H inhiban la reacción de glucosilación, respalda fuertemente la idea de que la glucosiltransferasa interactúa con determinantes presentes en el esqueleto proteico de las glicoproteínas. Podría predecirse en base a esta noción, que cualquier proteína desnaturalizada sería capaz de interactuar con la enzima del mismo modo produciendo su inhibición.

En la Fig. 11 se muestra el efecto de varias proteínas (no glicosiladas) desnaturalizadas sobre la reacción de glucosilación utilizando SBA como sustrato aceptor. Con fines comparativos, también se muestra el efecto de la SBA desnaturalizada y deglicosilada con Endo H sobre la misma reacción. Contrariamente a lo esperado, la inhibición observada con la SBA desnaturalizada y deglicosilada no pudo reproducirse con ninguna de las proteínas desnaturalizadas ensayadas.

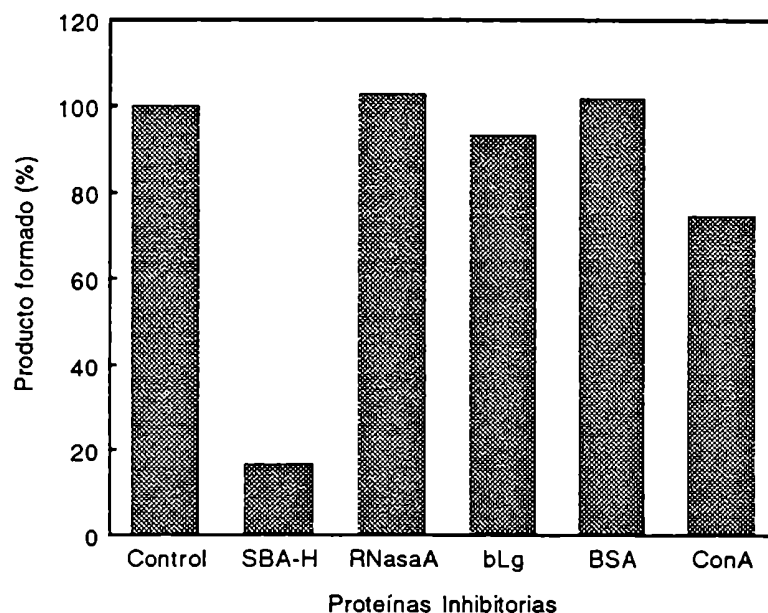


Figura 11. Efecto de proteínas desnaturalizadas sobre la reacción de glucosilación

El efecto inhibitorio de seroalbúmina bovina desnaturalizada (BSA), b-lactoglobulina desnaturalizada (bLg), concanavalina A desnaturalizada (Con A) y SBA desnaturalizada y deglicosilada con Endo H (SBA-Endo H) (90 μ g de cada una) sobre la reacción de glucosilación, utilizando SBA desnaturalizada como sustrato (45 μ g) se ensayó en un volumen total de 50 μ l de una mezcla de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl_2 , 4 μ M UDP-[^{14}C]Glc y 0.3 μ M glucosiltransferasa. Luego de 5 min a 37 °C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa interactúa con el residuo mas interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos.

Como fue mencionado anteriormente, la Endo H hidroliza la unión entre los dos residuos de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos tipo alta manosa, dejando uno de ellos unido al residuo de asparagina de la proteína (ver como referencia la Fig. 4). Por lo tanto pueden postularse dos posibles explicaciones para el hecho, ilustrado mas arriba, de que las glicoproteínas desnaturalizadas y deglicosiladas con Endo H inhiben la reacción de glucosilación mientras que las proteínas desnaturalizadas no tienen efecto alguno: a) para que la reacción de glucosilación tenga lugar, la glucosiltransferasa debe reconocer determinantes proteicos expuestos solo en conformaciones desnaturalizadas y el residuo mas interno de N-acetilglucosamina presente en el oligosacárido (es decir el residuo que queda unido a la proteína por el tratamiento con Endo H); o alternativamente, b) la enzima reconoce elementos proteicos (secuencias o estructuras) expuestas en glicoproteínas desnaturalizadas pero no en proteínas desnaturalizadas.

Con el objeto de ensayar la primera posibilidad se sometió SBA desnaturalizada a tratamiento con N-glicanasa. Esta endoglicosidasa hidroliza la unión entre el residuo de asparagina de la proteína y la N-acetilglucosamina del oligosacárido, dejando de este modo a la proteína libre de todo azúcar. En la Fig. 12 se compara la capacidad inhibitoria de esta preparación y la de SBA desnaturalizada y deglicosilada con Endo H.

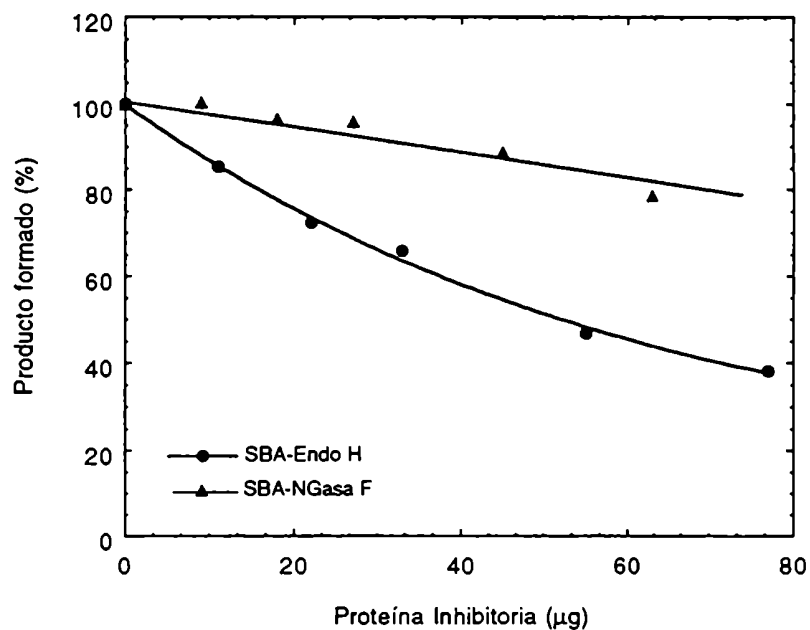


Figura 12. Efecto inhibitorio de SBA desnaturalizada y deglicosilada con N-Glicanasa/Endo F

El efecto inhibitorio de SBA desnaturalizada y tratada con Endo H (SBA-Endo H) y el de SBA desnaturalizada y tratada con N-Glicanasa/Endo F (SBA-F) sobre la glucosilación de SBA desnaturalizada (45 µg) se ensayó en un volumen total de 50 µl de una mezcla de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 4 µM UDP-[¹⁴C]Glc y 0.3 µM glucosiltransferasa. Luego de 5 min a 37 ° C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Como puede verse en la Fig. 12 la aglutinina deglicosilada con N-glicanasa mostró un efecto inhibitorio que, si bien fue menor que el de la aglutinina tratada con Endo H, fue significativo. Esto puede deberse a que la preparación comercial de N-glicanasa es, en realidad, una mezcla de la mencionada enzima y endo-β-N-acetilglucosaminidasa F (Endo F), una endoglicosidasa que al igual que la Endo H hidroliza la unión entre los dos residuos de N-acetilglucosamina del oligosacárido. Si bien el tratamiento se realizó en condiciones que favorecen la actividad de la N-glicanasa por sobre la de Endo F, es factible que el débil pero significativo efecto inhibitorio observado con la aglutinina deglicosilada por este método, se deba a la presencia de proteínas con el resto de N-acetilglucosamina unido a la asparagina producidas por la acción de la Endo F.

Para evitar este problema se recurrió a las formas A y B de la RNAsa de páncreas bovino para el estudio de los efectos inhibitorios. Estas dos formas de RNAsa poseen idéntica secuencia de aminoácidos y la única diferencia entre ellas es la presencia, en la forma B, de un oligosacárido ocupando el sitio putativo de glicosilación que existe en la proteína (109).

El efecto de la RNAsa B desnaturalizada y tratada con Endo H sobre la reacción de glucosilación, utilizando RNAsa B desnaturalizada como sustrato aceptor, se comparó con el efecto de la RNAsa A desnaturalizada. Como puede observarse en la Fig. 13 A, la especie tratada con Endo H inhibió la reacción mientras que la RNAsa A no tuvo efecto.

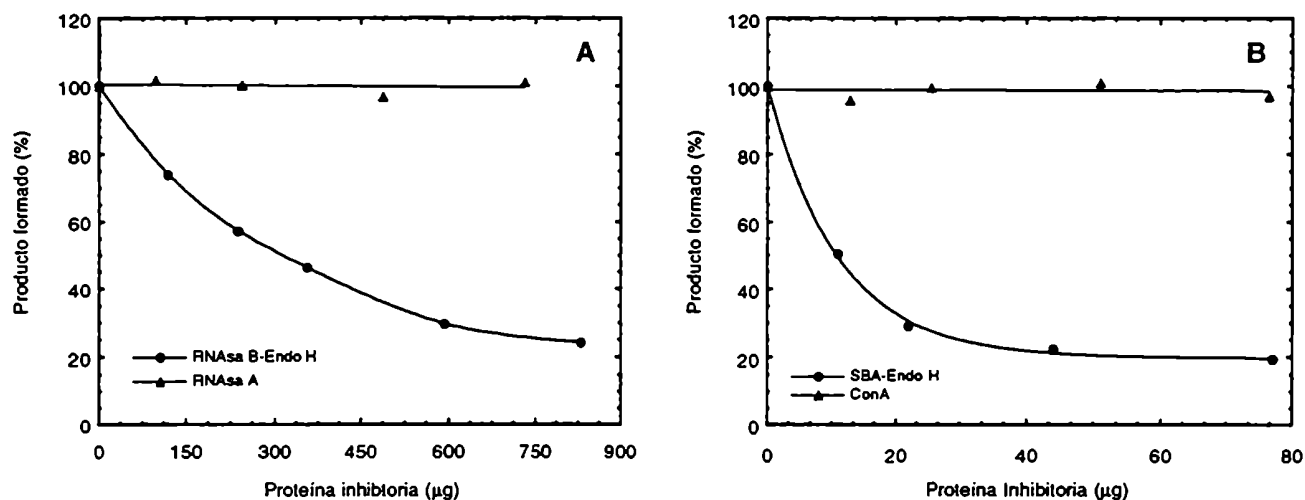


Figura 13. La glucosiltransferasa interactúa con el residuo mas interno de N-acetil-glucosamina.

Las siguientes proteínas fueron ensayadas como potenciales inhibidores de la reacción de glucosilación: A, RNAsa B desnaturalizada y deglicosilada con Endo H (RNAsa B-Endo H,), RNAsa A desnaturalizada (RNAsa A,); B, SBA desnaturalizada y deglicosilada con Endo H (SBA-Endo H,), Con A desnaturalizada (Con A,). Las mezclas de incubación contenían en un volumen total de 50 µl: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 4 µM UDP-[¹⁴C]Glc, 0.3 µM glucosiltransferasa y las siguientes cantidades de RNAsa B desnaturalizada como sustrato aceptor: A, 200 µg por ensayo y B, 80 µg por ensayo. Luego de 5 min a 37 ° C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Un resultado similar fue obtenido cuando el efecto de SBA desnaturalizada y tratada con Endo H sobre la reacción de glucosilación utilizando RNAsa B desnaturalizada como sustrato aceptor, se comparó con el efecto de Con A desnaturalizada. Esta última es una proteína no glicosilada que posee un alto grado de identidad con la SBA ya que ambas son aglutininas de plantas leguminosas. Como se muestra en la Fig. 13 B, solo la SBA desnaturalizada y deglicosilada con Endo H mostró efecto inhibitorio. Estos resultados sugieren fuertemente que la glucosiltransferasa interactúa con el residuo más interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas sustrato.

El efecto inhibitorio de las glicoproteínas tratadas con Endo H depende de su estructura

Como se mencionó anteriormente los oligosacáridos de la RNAsa B nativa se encuentran totalmente accesibles a la Endo H. Esto permitió obtener RNAsa conteniendo solo un residuo de N-acetilglucosamina unido a asparagina, tanto en su forma nativa como desnaturalizada. El efecto inhibitorio de estas especies sobre la reacción de glucosilación se evaluó utilizando RNAsa B desnaturalizada como sustrato aceptor. Como puede observarse en la Fig. 14, la RNAsa B desnaturalizada y deglicosilada con Endo H tuvo efecto inhibitorio mientras que la RNAsa B nativa y deglicosilada con Endo H no mostró efecto alguno. Es importante mencionar que la deglicosilación de ambas especies fue constatada por SDS-PAGE.

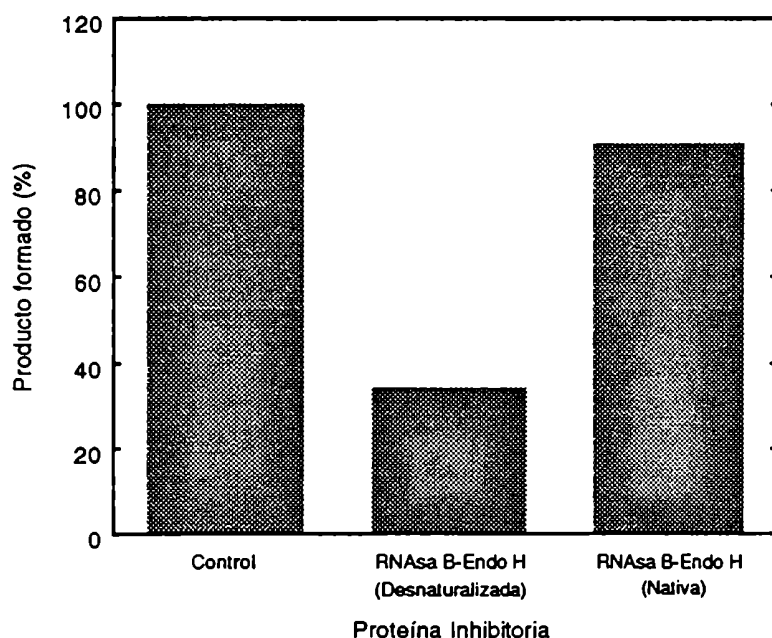


Figura 14. El efecto inhibitorio depende de la conformación.

RNAsa B desnaturalizada y deglicosilada con Endo H y RNAsa A desnaturalizada y deglicosilada con Endo H (800 μg de cada una), fueron ensayadas como potenciales inhibidores de la reacción de glucosilación en un volumen total de 50 μl de una mezcla de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl_2 , 4 μM UDP- ^{14}C Glc, 200 μg de RNAsa B desnaturalizada como sustrato aceptor y 0.3 μM glucosiltransferasa. Luego de 5 min a 37 °C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Los elementos proteicos reconocidos por la glucosiltransferasa también se encuentran presentes en las proteínas desnaturalizadas.

Con el objeto de descartar la posibilidad de que las proteínas desnaturalizadas no puedan inhibir la glucosilación de glicoproteínas debido a que no posean los elementos proteicos reconocidos por la glucosiltransferasa, una "neoglicoproteína" formada por acoplamiento químico de una proteína desnaturalizada a glicopéptidos de tipo alta manosa, fue ensayada como sustrato aceptor en la reacción de glucosilación. Como se muestra en la tabla V, los glicopéptidos obtenidos por degradación exhaustiva de tiroglobulina con Pronasa, no fueron glucosilados por la glucosiltransferasa ni en forma aislada, ni cuando se incubaron en presencia de β -lactoglobulina desnaturalizada. Sin embargo, la neoglicoproteína formada uniendo ambos elementos con glutaraldehído, resultó ser un eficiente aceptor de glucosa.

TABLA V
UNA NEOGLICOPROTEÍNA COMO SUSTRATO ACEPTOR DE GLUCOSA

Aceptor de glucosa agregado	Capacidad aceptora (cpm)
β -Lg	309
Glicopéptidos	139
Glicopéptidos + β -Lg	610
Glicopéptidos + β -Lg (acoplados)	20823

Las siguientes sustancias fueron ensayadas por su capacidad aceptora de glucosa: ensayo 1, 350 μ g de β -lactoglobulina (β Lg) desnaturalizada; ensayo 2, 15 μ g de glicopéptidos de alta manosa; ensayo 3, 15 μ g de glicopéptidos mas 350 μ g de β -lactoglobulina desnaturalizada y ensayo 4, 42 μ g de β -lactoglobulina desnaturalizada acoplada a glicopéptidos. Las mezclas de incubación contenían en un volumen total de 50 μ l: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 4 μ M UDP-[¹⁴C]Glc y 0.3 μ M glucosiltransferasa. Luego de 5 min a 37 ° C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético (método A) en los ensayos 1 y 4 y por el método B en los otros ensayos. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

El tratamiento con Endo H de la neoglicoproteína sintetizada, permitió realizar experimentos de inhibición de la reacción de glucosilación. Como se muestra en la Fig. 15, la neoglicoproteína desnaturalizada y tratada con Endo H resultó ser un potente inhibidor de la glucosilación mientras que la β -lactoglobulina desnaturalizada, es decir el mismo esqueleto proteico pero sin los glicopéptidos, no mostró ningún efecto.

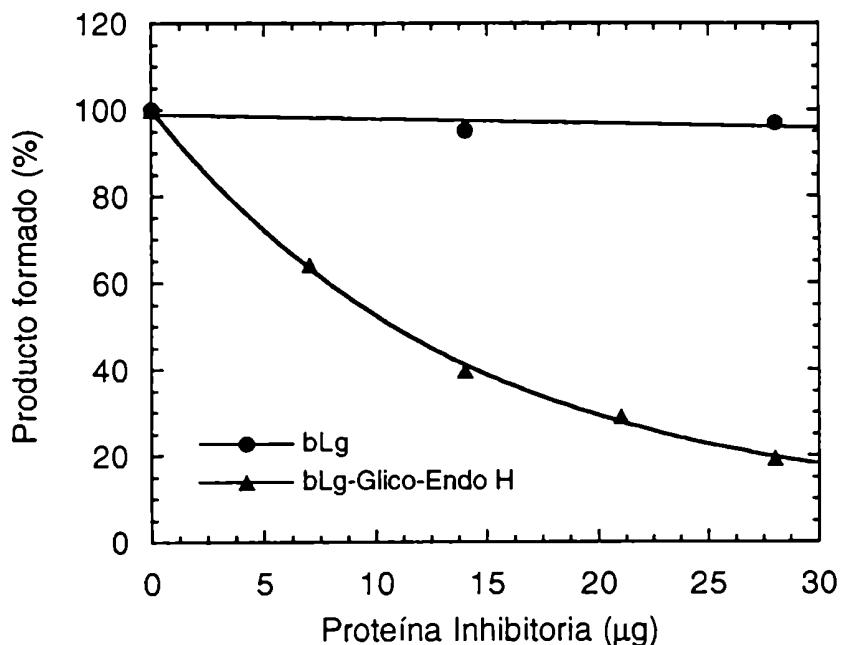


Figura 15. La interacción de la glucosiltransferasa con el residuo más interno de N-acetilglucosamina

Las cantidades indicadas de β -lactoglobulina desnaturalizada (β Lg,) y de la neoglicoproteína β -lactoglobulina desnaturalizada-glicopéptidos tratada con Endo H (β Lg-Glico-Endo H,) fueron ensayadas como potenciales inhibidores de la reacción de glucosilación en un volumen total de 50 μ l de una mezcla de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl_2 , 6 μ M UDP- ^{14}C Glc, 0.3 μ M glucosiltransferasa y 20 μ g de la neoglicoproteína β -lactoglobulina desnaturalizada-glicopéptidos como sustrato aceptor. Luego de 5 min a 37 ° C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Estos datos en conjunto demuestran que la inhibición observada con las glicoproteínas desnaturalizadas y tratadas con Endo H se debe a la interacción de la glucosiltransferasa con elementos proteicos expuestos en las conformaciones desnaturalizadas de las proteínas, pero no en las estructuras nativas, y con el residuo más interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos que queda unido a las proteínas luego del tratamiento con Endo H.

Los resultados que se muestran en la tabla V también establecen un importante principio: ambos elementos reconocidos por la glucosiltransferasa, es decir, los determinantes proteicos y los oligosacáridos, deben estar covalentemente unidos para que una eficiente glucosilación tenga lugar.

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa es un sensor sensible de diferencias en la estructura terciaria de glicoproteínas.

La nucleasa de *Staphylococcus aureus* es una proteína relativamente pequeña (149 aminoácidos) que no contiene residuos de cisteína. Uno de estos residuos se introdujo en la posición 70 reemplazando una lisina con técnicas de mutagénesis dirigida (mutante K70C) (110). Un glicopéptido de tipo alta manosa obtenido por digestión de tiroglobulina con Pronasa, fue acoplado al residuo de cisteína de la nucleasa mutante mediante el reactivo bifuncional N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato, un compuesto que reacciona con grupos amino por un extremo y con grupos sulfhidrilo por el otro. La "neoglicoproteína" formada de esta manera (K70C-Glico) es diferente de la que se obtuvo por acoplamiento de glicopéptidos a β -lactoglobulina con glutaraldehído (ver Tabla V), ya que esta última tenía un número no definido de glicopéptidos unidos a cada molécula de β -lactoglobulina y además las cadenas polipeptídicas también se entrecruzaban con el glutaraldehído formando polímeros de estructura heterogénea e indeterminada. Contrastando con esta, la neoglicoproteína K70C-Glico, posee un solo glicopéptido por molécula de nucleasa, que además se encuentra en una sola posición de la cadena polipeptídica. Esta neoglicoproteína mostró la misma actividad específica de nucleasa (4000 U/mg) (110, 111) que la proteína salvaje, lo que sugiere que ambas tienen la misma estructura terciaria, es decir, la nativa. Cuando esta neoglicoproteína fue utilizada como sustrato potencial de la reacción de glucosilación mostró una muy baja capacidad aceptora de glucosa (Tabla VI). La adición de 3',5' difosfotimidina (pdTp), un nucleótido análogo al sustrato que estabiliza la estructura nativa de la nucleasa, disminuyó aún más su capacidad aceptora. La neoglicoproteína fue, sin embargo, eficientemente glucosilada si previamente se desnaturalizaba por tratamiento con 8 M urea. Se descartó, usando SBA como sustrato aceptor, que el pdTp tuviera algún efecto inhibitorio sobre la reacción de glucosilación.

Ha sido comunicado que una forma truncada de la nucleasa, a la que le faltan los últimos 14 aminoácidos del extremo C-terminal, se encuentra *per se* (es decir sin necesidad de ningún tratamiento desnaturalizante) en una conformación compacta pero desordenada. Sin embargo, el correcto plegamiento de este fragmento puede inducirse por incubación en presencia de Ca^{2+} y pdTp, como se comprobó por estudios de dicroísmo circular en el UV lejano y por resonancia magnética nuclear (111, 112). Estos fragmentos mostraron la misma actividad específica de nucleasa que la enzima completa (la presencia de Ca^{2+} y del sustrato también inducen el plegamiento).

Dos neoglicoproteínas truncadas fueron sintetizadas utilizando estos fragmentos, con un esquema de acoplamiento similar al utilizado para la proteína completa. Una con un glicopéptido unido a una cisteína introducida en la posición 70 (1-135 K70C-Glico), es decir en la misma posición que en la proteína completa. En la otra, el glicopéptido se acopló a una cisteína introducida en la posición 124 (1-135 H135C-Glico). En este último caso la cisteína se introdujo reemplazando una histidina.

Como se muestra en la Tabla VI, ambas neoglicoproteínas truncadas fueron eficientemente glucosiladas por la glucosiltransferasa cuando permanecían con una estructura desordenada, en ausencia de pdTp. Esto sugiere que la posición del oligosacárido dentro de la cadena polipeptídica no es un factor determinante en la glucosilación. La adición de pdTp al medio de incubación redujo la capacidad aceptora de ambas neoglicoproteínas truncadas alrededor del 60 %, sin embargo no alcanzaron el valor basal mostrado por la "neoglicoproteína nativa". Es importante aclarar que el Ca^{2+} , el otro elemento necesario para inducir el plegamiento de los fragmentos, está siempre presente en el medio de incubación ya que es requerido para la actividad de la glucosiltransferasa. Incubaciones en presencia de mayores concentraciones de Ca^{2+} y pdTp no disminuyeron la capacidad aceptora.

TABLA VI
 INFLUENCIA DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIA Y TERCIARIA SOBRE LA CAPACIDAD
 ACEPTORA DE GLUCOSA

Aceptor de glucosa agregado	pdTp	Capacidad Aceptora de glucosa cpm	%	Actividad de nucleasa (unidades/mg)
ninguno		205	0	
K70C-Glico (nativo)	---	717	13	4000
K70C-Glico (nativo)	+	275	2	---
K70C-Glico (desnaturalizado)	---	4064	100	---
1-135 K70C-Glico	---	3964	98	1000
1-135 K70C-Glico	+	1728	43	---
1-135 H124C-Glico	---	3163	77	1480
1-135 H124C-Glico	+	1451	32	---

Las sustancias indicadas (45 µg) fueron ensayadas como potenciales sustratos de la reacción de glucosilación en un volumen total de 50 µl de una mezcla de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 4.5 µM UDP-[¹⁴C]Glc, 0.3 µM glucosiltransferasa y, donde se indica, 1 mM pdTp. Luego de 5 min a 37 °C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Este resultado, es decir, la actividad aceptora residual de los fragmentos de la nucleasa en presencia de pdTp y Ca²⁺, podía deberse a una transición incompleta hacia el estado nativo, tal vez producida por un efecto desestabilizante del oligosacárido unido a los fragmentos.

Para ensayar esta posibilidad, el espectro de CD en el UV lejano de la neoglicoproteína truncada 1-135 K70C-Glico se comparó con el de la nucleasa salvaje y completa. Como se muestra en la Fig. 16, la neoglicoproteína truncada dio un espectro significativamente distinto del de la nucleasa salvaje. Sin embargo ambos espectros fueron superponibles cuando Ca²⁺ y pdTp se agregaron al medio. Esto indicó que tanto la neoglicoproteína truncada como la nucleasa salvaje tenían la misma estructura secundaria cuando el Ca²⁺ y el pdTp estaban presentes.

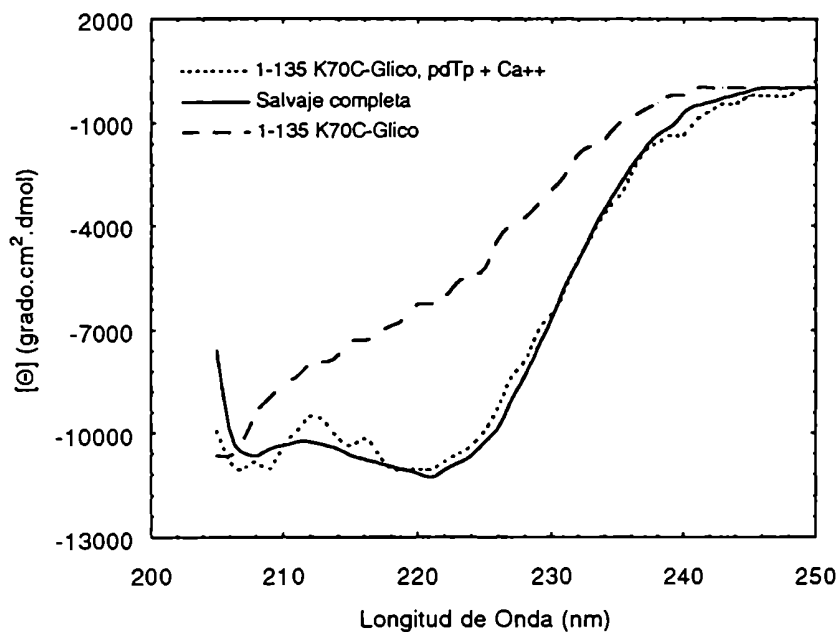


Figura 16. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de variantes de la nucleasa de *Staphylococcus*.

Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Como se muestra en la Tabla VI, la actividad específica de nucleasa de los fragmentos acoplados a glicopéptidos fueron mucho menores que la de la nucleasa salvaje o de la "neoglicoproteína nativa" K70C-Glico. Si bien esto podía deberse a un efecto estérico negativo del oligosacárido sobre la unión del sustrato a la enzima, existía también la posibilidad de que la estructura terciaria del fragmento plegado por Ca^{2+} y pdTp fuera levemente diferente o no tan bien consolidada como la estructura terciaria de la neoglicoproteína nativa.

Para ensayar esta posibilidad, la neoglicoproteína completa K70C-Glico y la neoglicoproteína truncada 1-135 K70C-Glico fueron sometidas a proteólisis limitada con tripsina en presencia de 10 mM Ca^{2+} y 1 mM pdTp. Como se muestra en la Fig. 17, mientras la K70C-Glico fue pobremente clivada por la tripsina en las condiciones empleadas aun luego de 60 min de incubación (Fig. 17 A); la neoglicoproteína truncada 1-135 K70C-Glico fue rápidamente digerida (Fig. 17 B). Estos resultados indican que la estructura terciaria de la neoglicoproteína truncada en presencia de Ca^{2+} y pdTp era mas laxa o menos consolidada que la estructura de la neoglicoproteína completa, lo que explica su capacidad aceptora residual.

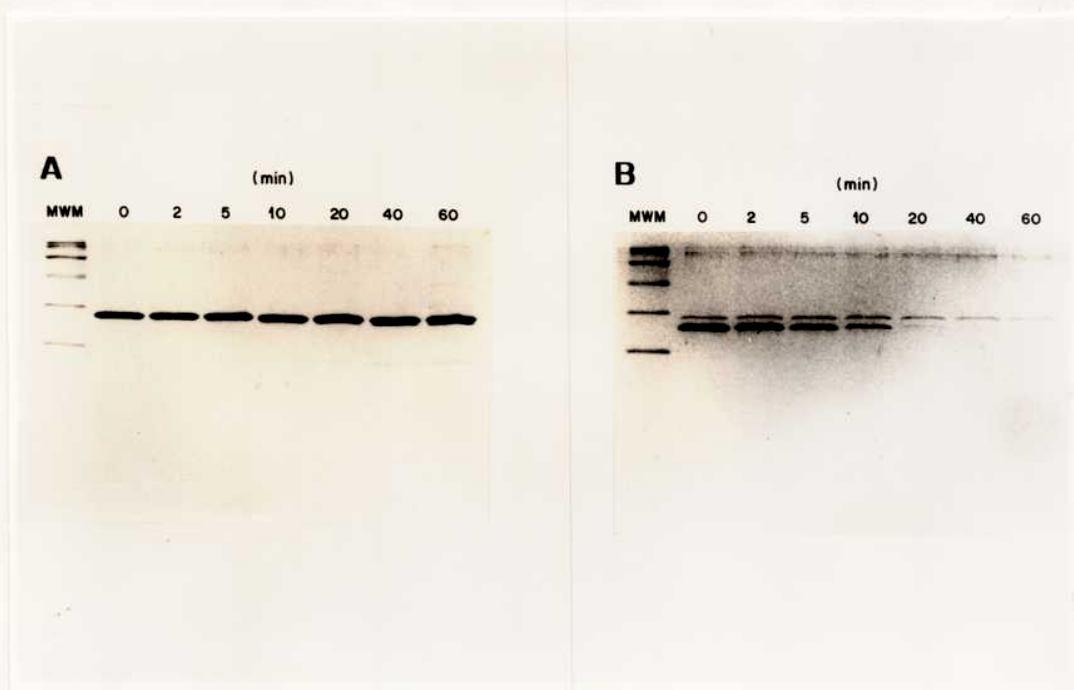


Figura 17. Proteólisis limitada de variantes de la nucleasa de *Staphylococcus*.

A: K70C-Glico, pdTp, Ca^{2+} ; B: fragmento 1-135 K70C-Glico, pdTp, Ca^{2+} . MWM: marcadores de peso molecular. Los números sobre las calles indican el tiempo de incubación (en min) con tripsina. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos.

Paralelo entre la capacidad aceptora de una glicoproteína y su estado de plegamiento.

Los resultados presentados mas arriba sugieren que glicoproteínas con estructuras muy cercanas a la nativa tienen capacidades aceptoras de glucosa significativamente menores que aquellas con estructuras mas desordenadas. Con el objeto de confirmar esta hipótesis que podría dar datos importantes sobre la naturaleza de los determinantes proteicos reconocidos por la glucosiltransferasa, la SBA fue desnaturalizada por tratamiento con clorhidrato de guanidina 6 M, diluída e incubada en condiciones controladas para permitir su renaturalización (93, 94). Esta renaturalización fue monitoreada midiendo la disminución de la emisión de fluorescencia del triptofano a 350 nm excitando a 280 nm. Los máximos de emisión de triptofano en la SBA son 328 y 350 nm para las conformaciones nativas y extendidas respectivamente. La disminución de la intensidad de fluorescencia observada a 350 nm se debe al corrimiento del máximo de fluorescencia hacia longitudes de onda menores que acompaña la renaturalización. Como se ilustra en la Fig. 18, la disminución de capacidad aceptora observada en función del tiempo, se correlaciona muy bien con la renaturalización, confirmando la hipótesis enunciada mas arriba.

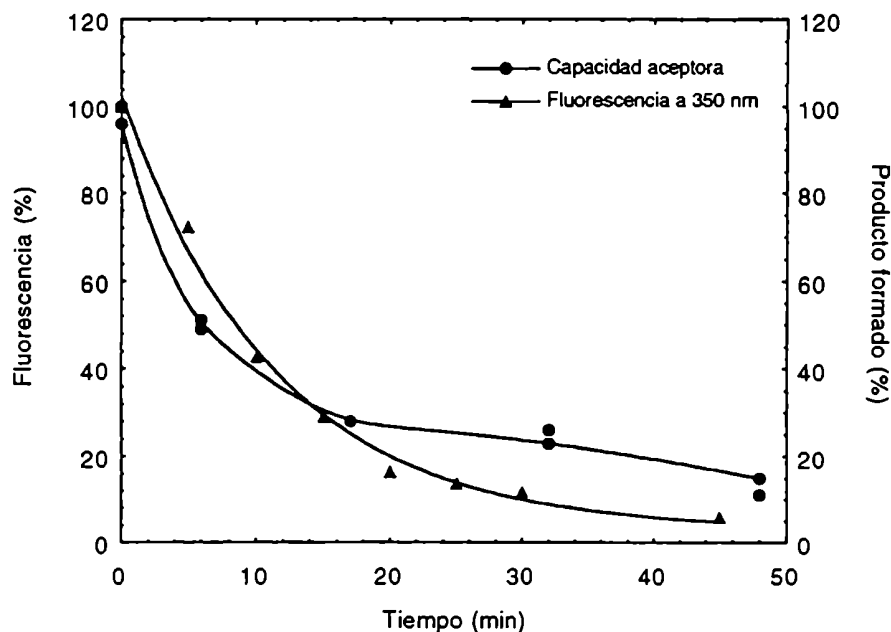


Figura 18. Capacidad aceptora de glucosa y estado de plegamiento de glicoproteínas.

SBA fue desnaturalizada en 6 M clorhidrato de guanidina, diluida e incubada para su renaturalización. La fluorescencia intrínseca a 350 nm y la capacidad aceptora de glucosa fueron medidas a los tiempos indicados. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos

En las condiciones normales de ensayo de glucosiltransferasa que se habían utilizado hasta este momento, las glicoproteínas desnaturalizadas utilizadas como sustratos se encontraban formando parte de grandes agregados como pudo observarse en experimentos de filtración por tamices moleculares (no mostrados). Sin embargo estos agregados no se forman en las condiciones utilizadas en este experimento, lo cual permite la renaturalización. Por lo tanto puede concluirse que la información necesaria para que la reacción de glucosilación tenga lugar reside en las moléculas de glicoproteínas aisladas y no necesariamente formando parte de agregados.

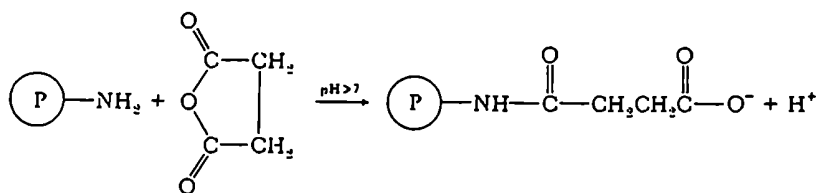
Glucosilación de glicoproteínas conteniendo aminoácidos químicamente modificados.

Para determinar si algún aminoácido o grupo funcional en particular era reconocido por la glucosiltransferasa se utilizaron distintos derivados de la SBA como sustratos modelo. Estos derivados se obtuvieron por modificación química exhaustiva de la SBA con reactivos para: 1) grupos amino, 2) anillos aromáticos y 3) histidinas.

Las condiciones de reacción se eligieron de modo de obtener un alto porcentaje de grupos modificados ya que en estos experimentos no se pretendía modificar un residuo en particular sino, por el contrario, modificar la mayor cantidad posible. La importancia del efecto conformacional de las modificaciones se ve minimizado por el hecho de que luego de cada tratamiento, los distintos derivados se sometieron a desnaturalización con urea 8M, para luego ser analizados por su capacidad aceptora de glucosa.

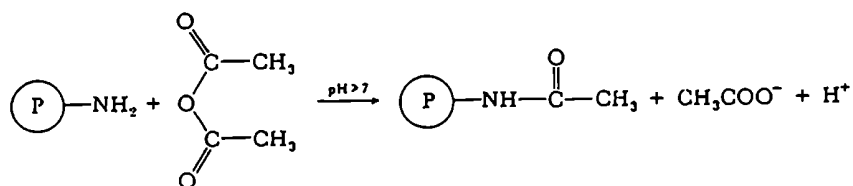
1) Modificación de grupos amino:

1.a. Succinilación: La modificación con anhídrido succínico (A. Succínico) se realizó según el método descrito por Chu y colaboradores (96).



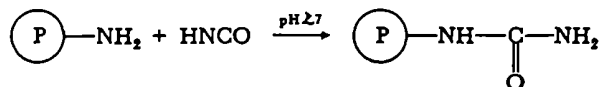
Este tratamiento transforma los grupos amino que pueden adquirir carga positiva a pH neutro, en un residuo que puede adquirir carga negativa a pH neutro.

1.b. Acetilación: Esta modificación se realizó con anhídrido acético (A. Acético) según lo descrito por Fraenkel-Conrat (95).



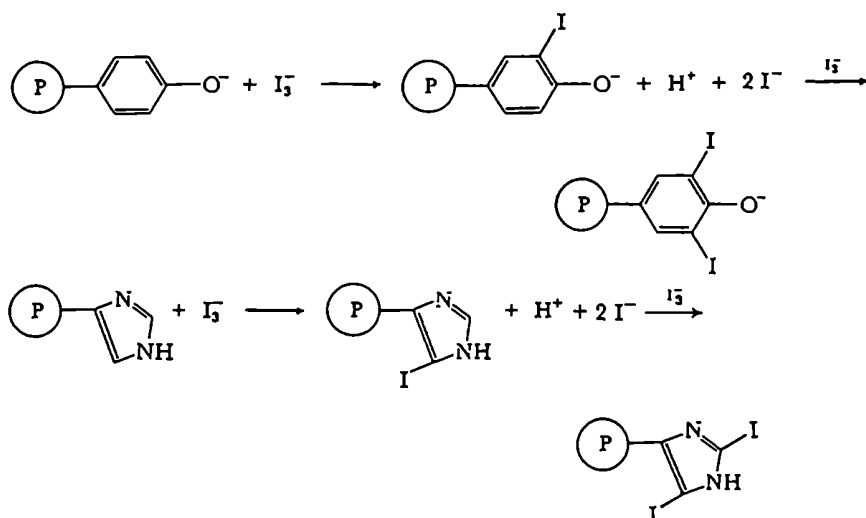
Este tratamiento produce un grupo con carga neutra. De este modo se bloquea con un reactivo neutro los grupos capaces de cargarse positivamente.

1.c. Carbamilación: el tratamiento con cianato de potasio (Cianato) se llevó a cabo del modo descrito por Chen y colaboradores (97).

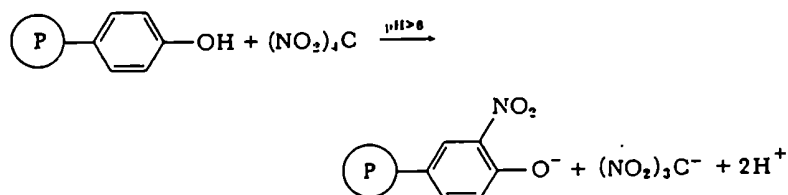


2) Modificación de grupos tirosina

2.a. Iodinación: Se llevó a cabo con solución I₂/IK (Iodo) según el protocolo descrito por Azari y Feeney (98).

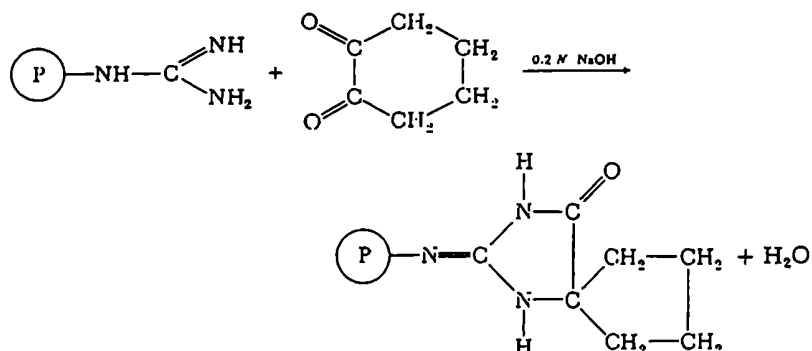


2.b. Nitración: se llevó a cabo con tetranitrometano (TNM) según lo descrito por Sokolovsky y colaboradores (99).



3) Modificación de histidinas:

Se realizo con ciclohexanodiona (CHD) de acuerdo a lo descrito por Toi y colaboradores (100).



Este tratamiento agrega un grupo muy voluminoso sobre las histidinas reaccionantes.

Cada una de las mezclas de reacción de SBA con estos reactivos químicos fueron dializadas para eliminar el exceso de reactivo, llevadas a sequedad y redisueltas en 8 M urea para su total desnaturalización. Una vez redializados para eliminar la urea, los distintos derivados fueron evaluados como posibles sustratos aceptores en la reacción de glucosilación. Como se muestra en la Fig. 19, la modificación de los mencionados aminoácidos o grupos funcionales, no tuvo efecto significativo sobre la capacidad aceptora de los distintos derivados. Esto indica que la presencia de los grupos funcionales que se modificaron en este ensayo, no son importantes para la reacción de glucosilación ni para el reconocimiento del sustrato por parte de la glucosiltransferasa.

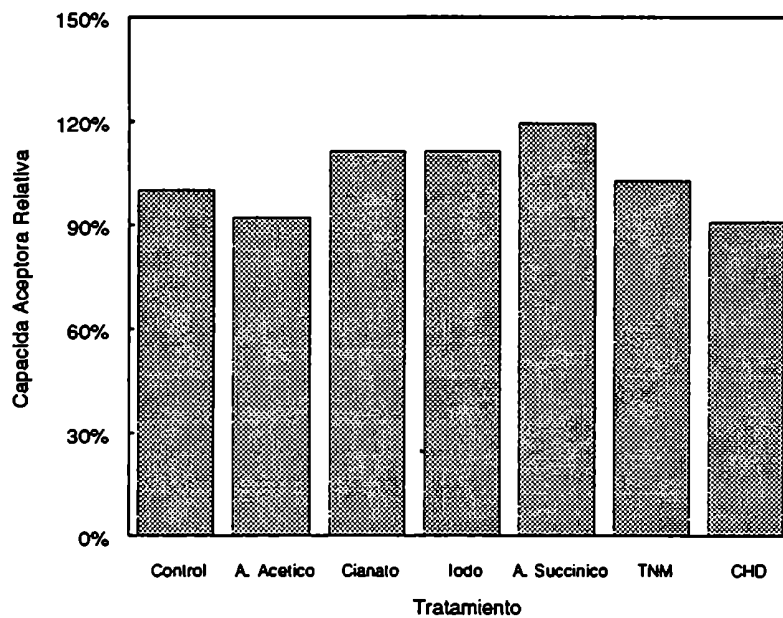


Figura 19. SBA químicamente modificada como sustrato aceptor.

Los distintos derivados de SBA (200 μ g) fueron ensayados como potenciales sustratos de la reacción de glucosilación en un volumen total de 50 μ l de una mezcla de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 4 μ M UDP-[¹⁴C]Glc y 0.3 μ M glucosiltransferasa. Luego de 5 min a 37 °C la cantidad de glucosa incorporada se determinó por el método del ácido tricloroacético. Para mayores detalles ver Materiales y Métodos. TNM: tetranitrometano, CHD: ciclohexanodiona.

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa interactúa con aminoácidos hidrofóbicos.

Una de las reconocidas diferencias entre los estados nativo y desnaturalizado de las proteínas, es la exposición en este último de grupos de aminoácidos hidrofóbicos que normalmente se encuentran en el interior en las conformaciones nativas. Por lo tanto se decidió estudiar la posibilidad de que la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa interactúe con estos aminoácidos hidrofóbicos como parte del mecanismo de reconocimiento de un sustrato desnaturalizado.

Un péptido formado por 5 aminoácidos hidrofóbicos y 4 hidrofílicos (HISFYVTMS), fue mezclado con la glucosiltransferasa. Dado que se observó agregación en la mezcla, la misma fue sometida a centrifugación (15.000 x g durante 10 min). A continuación la mitad superior de la solución fue removida, la mitad inferior conteniendo los agregados vigorosamente agitada en Vortex y la actividad de glucosiltransferasa ensayada en ambas mitades. Como se muestra en el experimento 1 de la Tabla VII, se obtuvo una distribución prácticamente homogénea de la enzima entre las dos mitades cuando el péptido no estaba presente en la mezcla, sin embargo, el agregado del péptido removió completamente la enzima de la mitad superior. La agregación de la enzima y su posterior sedimentación parece deberse a la hidrofobicidad del péptido agregado ya que se obtuvieron resultados similares con otro péptido hidrofóbico (HISLIMTAN) pero no se logró sedimentar la enzima con un péptido hidrofílico (HTSQHNTQS) (Tabla VII experimentos 2 y 3).

TABLA VII
LA GLUCOSILTRANSFERASA INTERACTÚA CON PÉPTIDOS HIDROFÓBICOS

Experimento	Péptido agregado	Actividad enzimática (cpm)	
		Mitad superior	Mitad inferior
1	Ninguno	16637	14850
	HISFYVTMS	25	15628
2	Ninguno	15826	13367
	HISLIMTAN	58	14564
3	Ninguno	17277	15421
	HTSQHNTQS	13618	17437

Los procedimientos experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

Ambos péptidos hidrofóbicos parecen estar *per se* formando agregados de 10-20 moléculas, de acuerdo a lo observado mediante experimentos de filtración por tamices moleculares (no mostrados). La explicación mas plausible para explicar los resultados de la Tabla VII, sería que la glucosiltransferasa se une a estos péptidos hidrofóbicos formando grandes agregados capaces de ser sedimentados por centrifugación a velocidades relativamente bajas. Esto solo permite detectar la actividad enzimática en la mitad inferior.

Con el objeto de confirmar la hipótesis enunciada mas arriba, se realizaron experimentos con un esquema idéntico al detallado para la Tabla VII pero utilizando el mismo péptido marcado radioactivamente con [¹²⁵I]NaI. Como se observa en el experimento 1 de la Tabla VIII, el péptido se distribuye homogéneamente entre las dos mitades cuando la glucosiltransferasa no está presente pero la mitad inferior se enriquece con péptido cuando se incluye glucosiltransferasa en la mezcla.

La adición a la mezcla de incubación de SBA desnaturalizada impidió la sedimentación de la glucosiltransferasa (Tabla VIII, experimento 2). Sin embargo este efecto protector no pudo observarse con iguales cantidades de SBA nativa (Tabla VIII, experimento 3). La inhibición de la sedimentación de la enzima se debió a que la SBA desnaturalizada precipita ella misma cuando se la mezcla con el péptido, de acuerdo a las mediciones de concentración de proteína realizadas en las mitades superior e inferior de los tubos conteniendo enzima, péptido y SBA desnaturalizada (Tabla VIII, experimento 4; las cantidades de péptido y de glucosiltransferasa son despreciables con respecto a la de SBA desnaturalizada). Al igual que la SBA nativa, el péptido hidrofílico mencionado en el apartado anterior (HTSQHNTQS) tampoco pudo prevenir la formación del complejo entre la glucosiltransferasa y el péptido hidrofóbico (Tabla VIII, experimento 5).

TABLA VIII
LA INTERACCIÓN DE LA GLUCOSILTRANSFERASA CON PÉPTIDOS HIDROFÓBICOS

Exp.	Adiciones a la muestra ^b				Mitad Superior	Mitad Inferior
	Péptido	Enzima	SBA _d	SBA _n		
1					[¹²⁵ I] Péptido (cpm)	
	+	---			26708	27031
	+	+			18792	31023
2					Actividad enzimática (cpm)	
	---	+	+		21373	21680
	+	+	---		28	16049
	+	+	+		19266	19623
3					Actividad enzimática (cpm)	
	+	+	+	---	10240	10591
	+	+	---	+	51	6719
4					Proteína (mg/ml)	
	---	+	+		0.37	0.38
	+	+	+		0.33	0.57
5					Actividad enzimática (cpm)	
	+	+	---	---	75	16168
	+	+	HTSQHNTQS		91	16521

Los procedimientos experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

También se demostró que la SBA puede rescatar, al menos parcialmente, a la glucosiltransferasa que ha formado un complejo sedimentable con el péptido hidrofóbico. La enzima y el péptido fueron mezclados y centrifugados. Como era de esperarse no se encontró actividad en la mitad superior de la mezcla (Tabla IX, experimento 1). SBA desnaturalizada fue agregada a la mitad inferior conteniendo el complejo péptido-enzima, y la suspensión se centrifugó nuevamente. Como se muestra en la Tabla IX experimento 2, un 30 % de la actividad total fue rescatada del complejo y apareció en la mitad superior. El hecho de que no pueda rescatarse la totalidad de la enzima del complejo sugiere que algo similar podría ocurrir en los experimentos 2 y 3 de la Tabla VIII, donde las mitades inferiores de las muestras conteniendo péptido y enzima no mostraron el doble de actividad que las mitades inferiores de las muestras que solo contenían enzima.

TABLA IX
LA UNIÓN DE LA GLUCOSILTRANSFERASA A PÉPTIDOS HIDROFÓBICOS ES REVERSIBLE

Experimento	Adiciones a la mezcla	Actividad Enzimática (cpm)	
		Mitad Superior	Mitad Inferior
1	Enzima + Péptido	17	ND
2	Mitad inferior del Experimento 1 + SBA desnat.	2806	6721

Los procedimientos experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

Los experimentos mostrados en las Tablas VII-IX indican que los mismos elementos reconocidos por la glucosiltransferasa en la SBA desnaturalizada pero no en la nativa estaban presentes en los péptidos hidrofóbicos y no en el hidrofílico.

Con el objeto de confirmar esta hipótesis de que la glucosiltransferasa sea capaz de unir péptidos hidrofóbicos y no hidrofílicos, el nonapéptido hidrofílico (HTSQHNTQS) y un nonapéptido hidrofóbico (HISLIMTAN) fueron covalentemente unidos a una columna de Sepharosa 4B a través de su extremo amino terminal. Se sembró glucosiltransferasa en las columnas y la actividad enzimática fue medida en el eluído y en porciones de resina extraídas de las columnas luego de un exhaustivo lavado. Como se muestra en la Tabla X, tanto la columna control (es decir la que no tuvo ningún péptido acoplado) como la columna conteniendo el péptido hidrofílico dieron resultados similares ya que toda la actividad fue eluída de las columnas, y nada permaneció unido. Contrastando con esto, la columna conteniendo el péptido hidrofóbico retuvo una cantidad significativa de enzima.

TABLA X
UNIÓN DE LA GLUCOSILTRANSFERASA A PÉPTIDOS ACOPLADOS A SEPHAROSA.

Péptido unido a Sepharosa 4B	Actividad en fracciones eluídas (cpm)	Actividad remanente en resina luego de lavado exhaustivo (cpm)
Ninguno	74 499 16991 14856 5489	161
Hidrofílico (HTSQHNTQS)	58 1828 18163 15087 6234	179
Hidrofóbico (HISLIMTAN)	145 66 548 5640 2188	7726

Los procedimientos experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN

La glucosa no es un componente normal de las N-glicoproteínas maduras, interviniendo sólo transitoriamente en su biosíntesis. En primer término la presencia de los tres restos de glucosa en el intermediario $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ parece servir como señal para su transferencia a la proteína. Inmediatamente después de la transferencia, los residuos de glucosa son removidos por las glucosidasas I y II (42, 47). A continuación operaría el mecanismo de reglucosilación de los oligosacáridos deglucosilados unidos a proteína. La formación de $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2\text{-Proteína}$ a partir de los correspondientes compuestos deglucosilados es transitoria *in vivo* y excepto en unos pocos casos extraordinarios (113, 114, 115), no se han detectado glicoproteínas maduras con oligosacáridos de estructura $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$.

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, la enzima responsable de la glucosilación transitoria, es una proteína soluble del interior del retículo endoplásmico (83). Tendría entonces la misma localización subcelular que la otra enzima del ciclo de glucosilación-deglucosilación, la glucosidasa II (116). Probablemente ambas enzimas sean retenidas en el RE por el mecanismo que involucra la secuencia C-terminal KDEL o similares (117, 118). Resulta interesante que todas las glicosiltransferasas y glucosidasas involucradas en la síntesis y procesamiento de N-glicoproteínas estudiadas hasta el momento son proteínas de membrana (119), excepto las involucradas en la glucosilación transitoria; la UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa y la glucosidasa II. Ambas enzimas pueden compartir la misma ubicación dentro del RE, lo que tal vez contribuya a la rápida desaparición de los compuestos glucosilados, o tal vez se sitúen en distintos compartimientos del RE (120, 121, 122, 123, 124). La disponibilidad de anticuerpos contra la glucosiltransferasa y la glucosidasa II permitirá resolver esto por colocalización al microscopio electrónico.

Estudios realizados con células de *T. cruzi* y *C. fasciculata* permitieron demostrar que más del 50 % de las glicoproteínas totales son glucosiladas transitoriamente *in vivo* (125). El uso de estos microorganismos tiene como ventaja para estudios *in vivo* que, a diferencia de otros eucariotes, la glucosilación de proteínas no involucra oligosacáridos glucosilados, por lo tanto la aparición de glucosa en los oligosacáridos depende exclusivamente de la actividad de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. El hecho de que no todos los oligosacáridos sean glucosilados sugiere algún tipo de mecanismo de modulación de la actividad glucosiltransferasa. Resultados aquí presentados demuestran que el procesamiento de glicoproteínas por α -manosidasas afecta fuertemente la velocidad de glucosilación. Los isómeros de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y

$\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ conteniendo el residuo de manosa al que se adiciona el resto glucosa, fueron glucosilados a velocidades del 50 y 15 % respectivamente de la velocidad con se glucosiló el $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. El hecho de esos pequeños cambios en la estructura del oligosacárido afectan tan fuertemente la velocidad de glucosilación puede estar relacionado con los dramáticos cambios conformacionales que puede sufrir el oligosacárido por remoción de un residuo de manosa distinto de aquel al que se une el resto de glucosa (ver residuos "i" y "k" Fig. 4) (126, 127). La unión $\text{Man}\alpha(1,6)\text{Man}\beta$ muestra una gran flexibilidad en el isómero de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ producido por las α -manosidasas del RE. La flexibilidad de esta unión es mucho menor en el $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, por lo tanto ambos oligosacáridos pueden adoptar estructuras muy diferentes. De un modo similar la remoción de la otra manosa terminal incrementa la flexibilidad de la unión $\text{Man}\alpha(1,6)\text{Man}\alpha$ mientras que la remoción del resto de manosa al cual el residuo de glucosa es agregado por la glucosiltransferasa, tiene poca influencia en la estructura del oligosacárido. Se ha reportado un efecto parecido de la secuencia primaria de los oligosacáridos sobre la actividad de la glucosidasa II de hígado de rata (la otra enzima del ciclo de glucosilación reglucosilación). En este caso se encontró que los $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ se deglucosilaban a velocidades que fueron el 21 y el 9 % respectivamente de la velocidad con que se deglucosilaba el $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (128).

La característica mas saliente mostrada por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa ha sido la absoluta selectividad por glicoproteínas desnaturalizadas. El efecto de la desnaturalización no fue el de hacer accesibles a los oligosacáridos que pudieran estar escondidos en las estructuras nativas ya que: (a) los glicopéptidos generados por tratamiento de glicoproteínas con Pronasa o con tripsina fueron pobremente glucosilados a pesar de que los oligosacáridos se encuentran totalmente expuestos al medio en estas especies; y (b) los oligosacáridos en las glicoproteínas nativas que tampoco fueron glucosilados fueron, sin embargo, accesibles a sondas macromoleculares como Con A-Sepharosa, Endo H y α -manosidasa; la total exposición del oligosacárido en la estructura nativa de la RNAsa B está confirmada por datos cristalográficos (109).

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de determinantes proteicos cuya interacción con la glucosiltransferasa es requerida para que la reacción de transferencia tenga lugar. Estos determinantes se encuentran expuestos en las formas desnaturalizadas de las glicoproteínas pero no en las nativas. Evidencia en favor de esta hipótesis fue obtenida por el efecto inhibitorio de la glucosilación mostrado por glicoproteínas desnaturalizadas y deglicosiladas con Endo H. Inhibiciones del orden del 50 % fueron obtenidas cuando cantidades equimoleculares de especies glucosiladas y deglicosila-

das se encontraban presentes en el medio de reacción. Este efecto inhibitorio fue específico ya que no fue obtenido con seroalbúmina bovina. Tampoco se encontró efecto inhibitorio con una glicoproteína nativa (RNAsa B) tratada con Endo H, ni con oligosacáridos de tipo alta manosa unidos a asparagina o con α -metilmanosido, a pesar de que estos dos últimos se encontraban en concentraciones 4 veces y 120 veces mayores respectivamente, que la del oligosacárido unido a la glicoproteína. Estos resultados refuerzan la conclusión de que hay un determinante proteico reconocido por la glucosiltransferasa que solo se encuentra expuesto en las formas desnaturalizadas de las glicoproteínas.

En experimentos orientados a develar las bases moleculares del reconocimiento de glicoproteínas desnaturalizadas por parte de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, se obtuvo evidencia de que uno de los elementos del sistema de reconocimiento es el residuo más interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos. El reconocimiento de este residuo explica el efecto inhibitorio mostrado por glicoproteínas desnaturalizadas y deglicosiladas con Endo H y la falta de efecto inhibitorio mostrado por proteínas desnaturalizadas. Esta característica de la glucosiltransferasa es muy importante para su actividad *in vivo*. Existe en el RE, el compartimiento donde reside la enzima, un gran número de proteínas no glicosiladas en proceso de plegamiento. Si la enzima no fuera capaz de discriminar entre una glicoproteína desnaturalizada y una proteína desnaturalizada, se uniría indistintamente a cualquier estructura proteica no nativa reduciendo significativamente la eficiencia del sistema. Por otro lado, el residuo más interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos no es completamente accesible a una sonda macromolecular como la Endo H en muchas glicoproteínas nativas (107) (la RNAsa B bovina es una clara excepción). En estos casos el clivaje de los oligosacáridos por la endoglicosidasa requiere la desnaturalización de la glicoproteína. Podría entonces especularse que el correcto plegamiento de una glicoproteína impediría el reconocimiento del residuo de N-acetilglucosamina por parte de la glucosiltransferasa evitando de este modo la glucosilación. Esto podría, por lo tanto, formar parte del mecanismo de selección de glicoproteínas desnaturalizadas como sustrato.

Es evidente que, de acuerdo a los resultados aquí presentados, la interacción de la glucosiltransferasa con determinantes proteicos presentes en glicoproteínas desnaturalizadas pero no en las nativas, es también estrictamente necesario para que se produzca la reacción de transferencia. La necesidad del reconocimiento no solo del residuo más interno de N-acetilglucosamina, sino también de determinantes proteicos está claramente evidenciada por la falta de efecto inhibitorio de la RNAsa B tratada

con Endo H y por el hecho de que los glicopéptidos obtenidos por digestión con Pronasa o con tripsina son muy pobremente glucosilados. También es importante destacar que la RNAsa B nativa cuyo oligosacárido, incluido el residuo más interno de N-acetilglucosamina, es completamente accesible (81, 109) tampoco fue sustrato de la glucosiltransferasa.

Los determinantes proteicos y el oligosacárido deben estar covalentemente unidos para que la reacción de glucosilación tenga lugar. Esta es una restricción importante dado el gran número de proteínas y glicoproteínas desplegadas, parcialmente plegadas o mal plegadas que existen en el lumen del RE. Si no fuera necesario que los elementos proteicos y el oligosacárido a ser glucosilado estén covalentemente unidos, podría suponerse que los determinantes proteicos de especies no plegadas inducirían la glucosilación de oligosacáridos pertenecientes a moléculas correctamente plegadas, siempre y cuando estas últimas tengan el residuo más interno de N-acetilglucosamina accesible a la glucosiltransferasa.

Al menos el 50 % de todas las glicoproteínas (tal vez todas ellas) son glucosiladas *in vivo* por la glucosiltransferasa (125). Además todas las glicoproteínas heterólogas ensayadas como sustrato *in vitro* fueron buenos aceptores de glucosa. Por lo tanto es difícil pensar que una determinada secuencia consenso de aminoácidos, o una estructura particular sea expuesta solo en los estados desnaturalizados de todas las glicoproteínas. La inexistencia de una secuencia consenso de aminoácidos que determine la actividad queda claramente demostrada por el hecho de que una "neoglicoproteína", como la formada por acoplamiento químico de glicopéptidos tipo alta manosa a β -lactoglobulina (una proteína no glucosilada), funciona eficientemente como sustrato aceptor. Ni siquiera la secuencia consenso de glucosilación NxS/T (donde x puede ser cualquier aminoácido excepto prolina) parece ser reconocida por la glucosiltransferasa ya que dicha secuencia no se encuentra presente en la β -lactoglobulina. El único elemento hasta ahora reconocido como común a las conformaciones desnaturalizadas de todas las proteínas y glicoproteínas, es la exposición al medio de grandes agrupaciones de aminoácidos hidrofóbicos.

Se ha demostrado en este trabajo de Tesis que la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa interactúa con péptidos hidrofóbicos. Por otra parte, no se encontró interacción alguna con péptidos hidrofílicos. Dado que la interacción con péptidos hidrofóbicos pudo evitarse con SBA desnaturalizada pero no con la glicoproteína nativa, podría concluirse que la enzima reconoce péptidos hidrofóbicos expuestos en las conformaciones desnaturalizadas. Sin embargo debe establecerse claramente que no se obtuvo una evidencia definitiva de que los residuos hidrofóbicos expuestos en las conforma-

ciones no nativas sean el elemento reconocido por la glucosiltransferasa como determinante de la reacción de glucosilación. De todos modos, concordando con la sugerencia de que los aminoácidos hidrofóbicos forman parte del sistema de reconocimiento, está el hecho de que conformaciones más desordenadas, es decir aquellas que tienen más expuestos los aminoácidos hidrofóbicos, son aquellas con mayor poder aceptor de glucosa.

La UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa demostró ser un sensor muy sensible de conformaciones no nativas. La capacidad aceptor de glucosa de la SBA desnaturalizada fue disminuyendo paralelamente a la adquisición de estructura nativa como se demostró en el experimento de renaturalización *in vitro* realizado. La glucosiltransferasa fue además capaz de discriminar entre dos "neoglicoproteínas" con similar estructura secundaria pero distinta estructura terciaria. La forma truncada y glicosilada de la nucleasa de *Staphylococcus* mostró, aún en presencia de Ca^{2+} y el nucleótido pdTp, una actividad aceptor residual que no se observó en la nucleasa glicosilada completa cuya estructura terciaria se encontraba más consolidada. Inclusive ésta "neoglicoproteína" completa mostró diferentes capacidades aceptoras en presencia o ausencia del nucleótido pdTp, que no solo induce el plegamiento de la forma truncada sino que también estabiliza la estructura de la forma nativa. Esto indica que pequeñas variaciones en la estructura de una glicoproteína son detectadas por la glucosiltransferasa, permitiendo el marcado con glucosa de aquellas formas que se alejan de la conformación nativa. Es importante destacar la consistencia mostrada por la glucosiltransferasa en lo que a su especificidad se refiere ya que mantuvo una estricta selectividad por las formas desnaturalizadas de su sustrato aceptor, aún cuando este sustrato fue una quimera que nunca se encontraría *in vivo* como las neoglicoproteínas aquí descritas.

Es conocido que la conformación de los oligosacáridos en las glicoproteínas puede ser influenciada por la interacción de ciertas unidades de monosacáridos con residuos de aminoácidos específicos (129, 130). Podría especularse, por lo tanto, que lo que la glucosiltransferasa realmente reconoce es la estructura particular adoptada por los oligosacáridos en el ambiente hidrofóbico de una glicoproteína desnaturalizada, y no estructuras proteicas expuestas en este estado. Sin embargo esta posibilidad es altamente improbable ya que se ha demostrado claramente que las glicoproteínas tratadas con Endo H interactúan con la glucosiltransferasa y no es razonable pensar que la conformación de un solo residuo de N-acetilglucosamina (el que queda unido a la proteína luego del tratamiento con Endo H) pueda simular la conformación

adoptada por oligosacáridos completos con composiciones $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

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

La proteína G normal tiene dos sitios de glicosilación ocupados con oligosacáridos complejos y adopta su estructura terciaria nativa y se ensambla en trímeros antes de ser transportada fuera del RE (131). La proteína G de la mutante termosensible ts045 (132) lleva una mutación puntual Ser 204 → Phe que hace que a 41 °C (temperatura no permisiva) no sea capaz de adoptar su estructura terciaria nativa y no se trimerice, formando agregados que son retenidos en el RE. Al volver a 32 °C (temperatura permisiva) la proteína G recupera la capacidad de adoptar su estructura terciaria nativa, se trimeriza y es transportada fuera del RE recuperando el fenotipo normal (133, 134). Se encontró que la proteína G de la mutante ts045 conserva oligosacáridos monoglucosilados $\text{Glc}_1\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2$ a la temperatura no permisiva (84). La TM12, una variante que tiene una delección de 8 amino ácidos (472-479) en el sector transmembrana de la proteína G (135) tiene el mismo fenotipo termosensible que ts045 y sus oligosacáridos también permanecieron monoglucosilados a 41 °C (84). En los dos casos la adición de los residuos de glucosa fue post-traduccional. A la temperatura no permisiva hubo un pasaje entre las formas no glucosiladas y monoglucosiladas, indicando que los restos de glucosa fueron transferidos por la acción de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. Es muy poco probable que a la temperatura no permisiva las dos proteínas G mutantes adopten conformaciones no nativas que permitan en los dos casos la acción de la glucosidasa I y II sobre los dos restos de glucosa más externos pero no sobre el más interno. Tampoco resulta muy factible que las proteínas G mutantes sean retenidas a la temperatura no permisiva en un compartimiento del RE desprovisto de glucosidasa II y que luego a la temperatura permisiva retomen el proceso de ensamblado y secreción desde el RE ya que la proteína G de ts045 se inmunolocalizó al microscopio electrónico distribuida uniformemente en el RE a 32 y 41 °C (133, 136) al igual que la glucosidasa II (116). Un modelo posible para interpretar la persistencia de oligosacáridos monoglucosilados es que las proteínas G mutantes son completamente deglucosiladas a ambas temperaturas por las glucosidasas I y II pero a la temperatura no permisiva son incapaces de adoptar la estructura nativa formando agregados que quedan retenidos en el RE.

Estos son reconocidos como sustratos por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa comenzando un ciclo de glucosilación-deglucosilación. Al volver a 32 °C son capaces de adoptar su estructura nativa y dejan de ser reconocidas como sustrato por la glucosiltransferasa pasando al Golgi y continuando con el procesamiento normal.

Un caso similar se ha descrito para una quimera entre un fragmento de la hemaglutinina del virus influenza (HA) y la zona C-terminal de la hormona de crecimiento de rata (124). Esta construcción tiene un sitio de N-glicosilación ocupado en la secuencia correspondiente a la HA en la que normalmente es procesado al estadio de complejo cuando pasa por el aparato de Golgi. Cuando esta quimera se expresa por transfección en células COS forma agregados que quedan retenidos en el RE sin llegar al aparato de Golgi (122) y conserva sus oligosacáridos monoglucosilados (124).

La caracterización de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa como una proteína soluble del lumen del RE, coincide con la localización de sus sustratos *in vivo*; las glicoproteínas, el UDP-Glc y el Ca^{2+} . Las glicoproteínas aceptoras en su faz inicial de glucosilación, procesamiento y ensamblado residen en el interior del RE donde adoptan su estructura nativa antes de seguir el camino de secreción o alcanzar su localización subcelular definitiva (34, 66, 137, 138). De acuerdo a la especificidad encontrada *in vitro* e *in vivo* la glucosiltransferasa reconocería como sustratos a las glicoproteínas que aún no adoptaron su estructura definitiva y hace que conserven sus oligosacáridos monoglucosilados.

En 1983 se describió por primera vez la glucosilación transitoria de oligosacáridos unidos a proteína y se propuso que el residuo de glucosa agregado por la glucosiltransferasa a los oligosacáridos tipo alta manosa podría ser una señal de reconocimiento molecular en el procesamiento de glicoproteínas (75). Posteriormente la selectividad mostrada por la enzima para glucosilar glicoproteínas desnaturalizadas y los resultados explicados mas arriba relacionados con la retención en el RE de las formas no plegadas de la proteína G y el estado monoglucosilado de sus oligosacáridos, permitió refinar la idea de la función *in vivo* de la glucosiltransferasa proponiéndose un rol para la misma en el mecanismo mediante el cual la célula detecta y eventualmente retiene y degrada las glicoproteínas incorrectamente plegadas (139).

Se ha descrito recientemente que la calnexina, una proteína de membrana del RE, tendría una actividad tipo chaperón molecular ya que se la aisló formando parte de complejos con varias proteínas en proceso de plegamiento (140, 141, 142). Estudios posteriores mostraron que la calnexina interactuaba solo con glicoproteínas no totalmente plegadas y que la inhibición de la glucosilación de esas proteínas con tunicamicina abolía la interacción con la calnexina (67, 69). Trabajos realizados muy

recientemente fundamentaron la idea de que la calnexina tendría además, una actividad tipo lectina, es decir reconociendo oligosacáridos, y que tendría especificidad por oligosacáridos monoglucosilados (69). Estos resultados en conjunto permitieron a A. Helenius proponer un modelo en el cual la calnexina, la glucosidasa II y la UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa forman parte del mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE (Fig. 20) (143).

De acuerdo al mencionado modelo, las glicoproteínas en proceso de plegamiento sufrirían, dentro del RE, ciclos de deglucosilación y reglucosilación catalizados por la glucosidasa II y la glucosiltransferasa respectivamente. Las glicoproteínas no plegadas serían entonces unidas por la calnexina siendo retenidas dentro del RE dado que la calnexina es una proteína de membrana. Este ciclo continuaría hasta que la glicoproteína adquiere su estructura terciaria nativa. En estas condiciones dejarían de ser sustrato de la glucosiltransferasa y solo serían sustrato de la glucosidasa II que las liberaría del residuo de glucosa y por lo tanto de la interacción con la calnexina permitiendo su salida del RE.

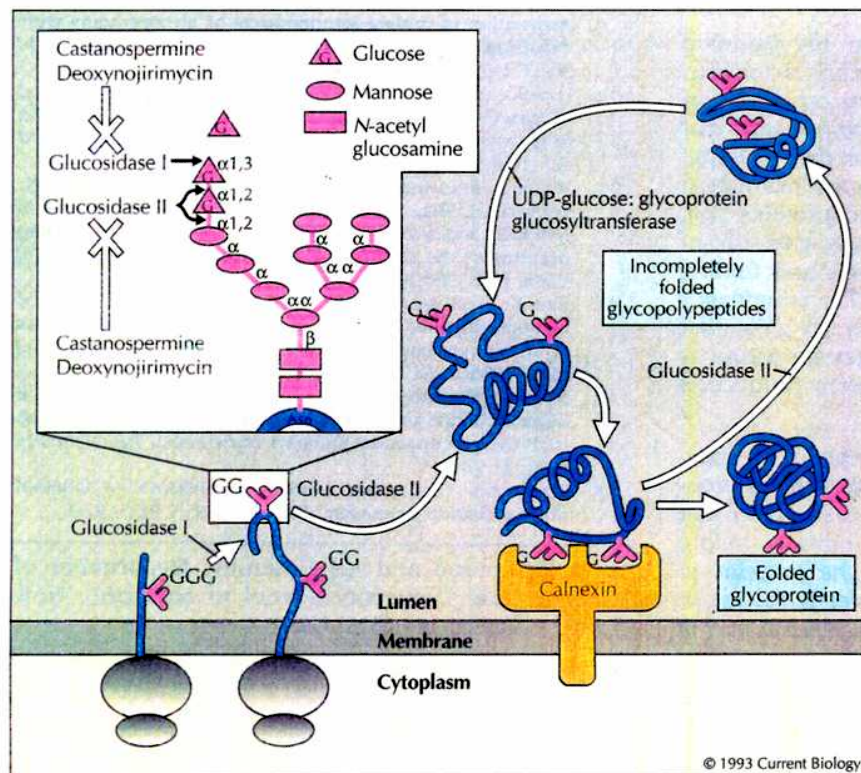


Figura 20. Modelo de mecanismo de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE

Tomado de referencia (68)

La glucosiltransferasa tendría un rol fundamental dentro de este modelo ya que sería el sensor de la estructura de las glicoproteínas, marcándolas o no con el residuo de glucosa que determinará su unión a la calnexina.

Como era de esperar para un enzima que glucosila una amplia gama de glicoproteínas, siempre y cuando éstas se encuentren en un estadio distinto del nativo, la glucosiltransferasa mostró ser un catalizador extremadamente versátil, no requiriendo que el oligosacárido se encuentre en una determinada posición en la cadena polipeptídica y glucosilando inclusive, estructuras que nunca se encuentran en la naturaleza como las neoglicoproteínas utilizadas en este trabajo de Tesis, pero respetando siempre el requisito de la desnaturalización. Por otro lado la glucosilación requirió la accesibilidad, por parte de la glucosiltransferasa, a elementos expuestos en las glicoproteínas no correctamente plegadas, es decir, el residuo más interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos y segmentos hidrofóbicos del esqueleto proteico de las glicoproteínas.

La característica única de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de detectar y marcar específicamente glicoproteínas con conformaciones distintas de la nativa se adecúa perfectamente a su rol propuesto en el mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE.

REFERENCIAS

1. Suzuki, C. K., Bonifacino, J. S., Lin, A. Y., Davis, M. M., and Klausner, R. D. (1991) *J. Cell Biol.* **114**, 189-205
2. Lodish, H. F., and Kong, N. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10803-10899
3. Gilbert, H. F. (1990) *Adv. Enzymol.* **63**, 69-172
4. Hwang, C., Sinskey, A. J., and Lodish, H. F. (1992) *Science* **257**, 1496-1502
5. Braakman, I., Helenius, J., and Helenius, A. (1992) *EMBO J.* **11**, 1717-1722
6. Clairmont, C. A., De Maio, A., and Hirschberg, C. B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3983-3990
7. Rothman, J. E. (1989) *Cell* **59**, 591-601
8. Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry* **30**, 3147-3161
9. Creighton, T. E. (1986) *Meth. Enzymol.* **131**, 83-106
10. Anfinsen, C. B., and Scheraga, H. A. (1975) *Adv. Protein. Chem.* **29**, 205-300
11. Ellis, J., and Van Der Vies, S. M. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347
12. Braakman, I., Helenius, J., and Helenius, A. (1992) *Nature* **356**, 260-262
13. Gething, M.-J., and Sambrook, J. (1992) *Nature* **355**, 33-45
14. Pelham, H. R. B. (1986) *Cell* **46**, 959-961
15. Bole, D. G., Hendershot, L. M., and Kearney, J. M. (1986) *J Cell Biol* **102**, 1558-1566
16. Pouyssegur, J., Shiu, R. P. C., and Pastan, I. (1977) *Cell* **11**, 941-947
17. Lee, A. S. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 20-23
18. Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.-J., and Sambrook, J. (1988) *Nature* **332**, 462-464
19. Gething, M.-J., McCammon, K., and Sambrook, J. (1986) *Cell* **46**, 939-950
20. Munro, S., and Pelham, H. R. B. (1986) *Cell* **46**, 291-300
21. Normington, K., Kohono, K., Kozutsumi, Y., Gething, M. J., and Sambrook, J. (1989) *Cell* **57**, 1223-1236
22. Hendershot, L. M., Bole, D., and Kearney, J. M. (1987) *Immunol.Today* **8**, 111-114
23. Stamnes, M. A., B-H., S., Chuman, L., Harris, G. L., and Zuker, C. S. (1991) *Cell* **65**, 219-227
24. Fisher, G., and Schmid, F. X. (1990) *Biochemistry* **29**, 2205-2212
25. Schreiber, S. L. (1991) *Science* **251**, 283-287
26. Bachinger, H. P., and Compton, L. A. (1991) *J. Cell. Biochem. suppl.* **15G**, 188
27. Freedman, R. B. (1989) *Cell* **57**, 1069-1072

28. Noiva, R., and Lennarz, W. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3553-3556
29. Bulleid, N. J., and Freedman, R. B. (1988) *Nature* **335**, 649-651
30. Lamantia, M. L., Miura, T., Tachikawa, H., Kaplan, H. A., Lennarz, W. J., and Mizunaga, T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4453-4457
31. Mazzearella, R. A., Srinivasan, M., Haugejorden, S. M., and Green, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1094-1101
32. Paulson, J. C. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 272-276
33. Marquardt, T., and Helenius, A. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 505-513
34. Hurtley, S. M., and Helenius, A. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 277-308
35. Fitting, T., and Kabat, D. (1982) *J. Cell Biol.* **257**, 14011-14017
36. Olden, K., Parent, B. J., and White, S. L. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* **650**, 209-232
37. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 217-237
38. Montreuil, J. (1980) *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **37**, 157-223
39. Behrens, N. H., and Leloir, L. F. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**, 153-159
40. Parodi, A. J., and Leloir, L. F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 1-37
41. Hubbard, S. C., and Ivatt, R. I. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 555-583
42. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
43. Keller, K. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 443-445
44. Chojnacki, T., and Dallner, G. (1988) *Biochem. J.* **251**, 1-9
45. Hirschberg, C. B., and Snider, M. D. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 63-87
46. Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (1992) *TIBS* **17**, 32-36
47. Kaplan, H. A., Welply, J. K., and Lennarz, W. J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **906**, 161-173
48. Kelleher, D. J., Kreibich, G., and Gilmore, R. (1992) *Cell* **69**, 55-65
49. Rademacher, T. W., Parekh, B. B., and Dwek, R. A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 785-838
50. Gallagher, P. J., Henneberry, J. M., Sambrook, J. F., and Gething, M.-J. (1992) *J. Virol.* **66**, 7136-7145
51. Gibson, R., Leavitt, R., Kornfeld, S., and Schlesinger, S. (1978) *Cell* **13**, 671-679
52. Leavitt, R., Schlesinger, S., and Kornfeld, S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 9018-9023
53. Machamer, C. E., and Rose, J. K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5948-5954
54. Morrison, T. G., McQuain, C. O., and Simpson, D. (1978) *J. Virol.* **254**, 3600-3607
55. Klausner, R. D. (1989) *New Biol.* **1**, 3-8
56. Hickman, J., and Kornfeld, S. (1978) *J. Immunol.* **121**, 990-996
57. Miyazaki, J.-I., Appella, E. H. Z., J., F., and Ozato, K. (1986) *J. Exp. Med.* **163**, 856-871

58. Olden, K., Pratt, R. M., and Yamada, K. M. (1978) *Cell* **13**, 461-473
59. Roberts, P. C., Garten, W., and Klenk, H.-D. (1993) *J. Virol.* **67**, 3048-3060
60. Machamer, C. E., and Rose, J. K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5955-5960
61. Lodish, H. F., and Kong, N. (1984) *J. Cell Biol.* **98**, 1720-1729
62. Robbins, P. W., Hubbard, S. C., Turco, S. J., and Wirth, D. F. (1977) *Cell* **12**, 893-900
63. Datema, R., Romero, P. A., Legler, G., and Schwartz, R. T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 6787-6791
64. Peyrieras, N., Bause, E., Legler, G., Vasilov, R., Claesson, L., Peterson, P., and Ploegh, H. (1983) *EMBO J.* **2**, 823-832
65. Sidman, C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9374-9376
66. Pfeffer, S. R., and Rothman, J. E. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 829-852
67. Ou, W. J., Cameron, P. H., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. (1993) *Nature* **364**, 771-776
68. Hammond, C., and Helenius, A. (1993) *Curr. Biol.* **3**, 884-886
69. Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 913-917
70. Bosch, J. V., Tlsty, A., McDowell, W., Legler, G., and Schwarz, R. T. (1985) *Virology* **143**, 342-346
71. Su, K., Stoller, T., Rocco, J., Zemsky, J., and Green, R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14301-1409
72. Moore, S. E. H., and Spiro, R. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3800-3812
73. Parodi, A. J., and Quesada-Allué, L. A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7637-7640
74. Parodi, A. J., and Cazzulo, J. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7641-7645
75. Parodi, A. J., Mendelzon, D. H., and Lederkremer, G. H. (1983) *J. Biol. Chem* **258**, 8260-8265
76. Parodi, A. J., Mendelzon, D. H., Lederkremer, G. H., and Martin-Barrientos, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6351-6357
77. Parodi, A. J., Lederkremer, G. Z., and Mendelzon, D. H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 5589-5595
78. Trombetta, S. E., Bosch, M., and Parodi, A. J. (1989) *Biochemistry* **28**, 8108-8116.
79. Pérez, M., and Hirschberg, C. B. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6822-6830
80. Pérez, M., and Hirschberg, C. B. (1987) *Meth. Enzymol.* **138**, 709-714
81. Trombetta, S. E., and Parodi, A. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9236-9240
82. Fernandez, F. S., Trombetta, S. E., Hellman, U., and Parodi, A. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 30701-30706

83. Trombetta, S. E., Gañán, S., and Parodi, A. J. (1991) *Glycobiology* **1**, 155-161
84. Suh, K., Bergmann, J. E., and Gabel, C. A. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 811-819
85. Wright, A., and Robbins, P. W. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 594-595
86. Arima, T., Spiro, M. J., and Spiro, R. G. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1825-1835
87. Gordon, J. A., Blumberg, S., Lis, H., and Sharon, N. (1972) *FEBS Lett.* **24**, 193-196
88. Felsted, R. L., Leavitt, R. D., and Bachur, N. R. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **405**, 72-81
89. Engel, J. C., and Parodi, A. J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10105-10110
90. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
91. Du Bois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* **28**, 350-356
92. Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**, 368-379
93. Nagai, K., and Yamaguchi, H. (1993) *J. Biochem.* **113**, 123-125
94. Nagai, K., Shibata, K., and Yamaguchi, H. (1993) *J. Biochem.* **114**, 830-834
95. Fraenkel-Conrat, H. (1957) *Meth. Enzymol.* **4**, 247
96. Chu, F. S., Crary, E., and Bergdoll, M. S. (1969) *Biochemistry* **8**, 2890
97. Chen, C. C., Grossberg, A. L., and Pressman, D. (1962) *Biochemistry* **1**, 1025
98. Azari, P. R., and Feeney, R. E. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* **92**, 44
99. Sokolovsky, M., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1966) *Biochemistry* **5**, 3582
100. Toi, K., Bynum, E., Norris, E., and Itano, H. A. (1967) *J. Biol. Chem.* **236**, 1036
101. Salacinski, P. R. P., McLellan, C., Sykes, J. E., Clement-Jones, V. V., and Lowry, P. J. (1981) *Anal. Biochem.* **117**, 136-146
102. Cuatrecasas, P., Fuchs, S., and Anfinsen, C. B. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1541-1547
103. Yamashita, K., Tachibana, Y., and Kobata, A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 3862-3869
104. Teale, F. W. J. (1960) *Biochem. J.* **76**, 381-388
105. Padros, E., Morros, A., Mañosa, J., and Duñach, M. (1982) *Eur. J. Biochem.* **117**-122
106. Adar, R., Richardson, M., Lis, H., and Sharon, N. (1989) *FEBS Lett.* **257**, 81-85
107. Trimble, R. B., and Maley, F. (1984) *Anal. Biochem.* **141**, 515-522
108. Tarentino, A. L., Plummer, T. H. J., and Maley, F. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 818-824
109. Richards, F. M., and Wickoff, W. W. (1971). *The Enzymes*. **IV** 647-806.
110. Ermacora, M. R., Ledman, D. W., Hellinga, H. W., Hsu, G. W., and Fox, R. O. (1994) *Biochemistry* **33**, 13625-13641
111. Shortle, D. a., and Meeker, A. (1989) *Biochemistry* **28**, 936-944

112. Flanagan, J. M., Kataoka, M., Shortle, D., and Engenman, D. M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 748-752
113. Strous, G. J., Van Kerkhof, P., Brok, R., Roth, J., and Brada, D. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3620-3625
114. Kaushal, G. P., Pastuszak, I., Hatanaka, K., and Elbein, A. D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16271-16279
115. Ohta, M., Hamako, J., Yamamoto, S., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., Oka, S., Mizuochi, T., and Matsuura, F. (1992) *Glycoconj. J.* **8**, 400-413
116. Lucocq, J. M., Brada, D., and Roth, J. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 2137-2146
117. Pelham, H. R. B. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 483-486
118. Pelham, H. R. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 1-23
119. Paulson, J. C., and Colley, K. J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618
120. Kabcenell, A. K., and Atkinson, P. H. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 1270-1280
121. Pathak, R. K., Merkle, R. K., Cummings, R. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Anderson, R. G. W. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1831-1841
122. Rizzolo, L. J., Finidori, J., Gonzalez, A., Arpin, M., Ivanov, I. E., Adesnik, M., and Sabatini, D. D. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 1351-1362
123. Pryme, I. F. (1989) *Mol. Cell. Biochem.* **87**, 93-103
124. Rizzolo, L. J., and Kornfeld, R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9520-9525
125. Gañan, S., Cazzulo, J. J., and Parodi, A. J. (1991) *Biochemistry* **30**, 3098-3104
126. Bischoff, J., and Kornfeld, R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 7907-7910
127. Wooten, E. W., Bazzo, R., Edge, C. J., Zamze, S., Dwek, R. A., and Rademacher, T. W. (1990) *Eur. Biophys. J.* **18**, 139-148
128. Grinna, L. S., and Robbins, P. W. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2255-2258
129. Sutton, B. J., and Phillips, D. C. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 130-132
130. Savvidou, G., Klein, M., Grey, A. A., Dorrington, A. J., and Carver, J. P. (1984) *Biochemistry* **23**, 3736-3740
131. Doms, R. W., Keller, D. S., Helenius, A., and Balch, W. E. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 1957-1969
132. Gallione, C. J., and Rose, J. K. (1985) *J. Virol.* **54**, 374-382
133. Bergman, J. E., Tokusayu, K. T., and Singer, S. J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 1746-1750
134. Knipe, D. M., Baltimore, D., and Lodish, H. F. (1977) *J. Virol.* **21**, 1149-1158
135. Adams, G. A., and Rose, J. K. (1985) *Cell* **41**, 1007-1015
136. Bergman, J. E., and Singer, S. J. (1983) *J. Cell Biol.* **97**, 1777-1787
137. Rose, J. K., and Doms, R. W. (1988) *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 258-289

138. Lodish, H. F. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2107-2110
139. Sousa, M., Ferrero García, M. A., and Parodi, A. J. (1992) *Biochemistry* **31**, 97-105
140. Degen, E., and Williams, D. B. (1991) *J. Cell Biol.* **112**, 1099-1115
141. Degen, E., Cohen-Doyle, M. F., and Williams, D. B. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 1653-1661
142. Hochstenbach, F., David, V., Watkins, S., and Brenner, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4734-4738
143. Helenius, A. (1994) *Mol. Biol. Cell* **5**, 253-265

