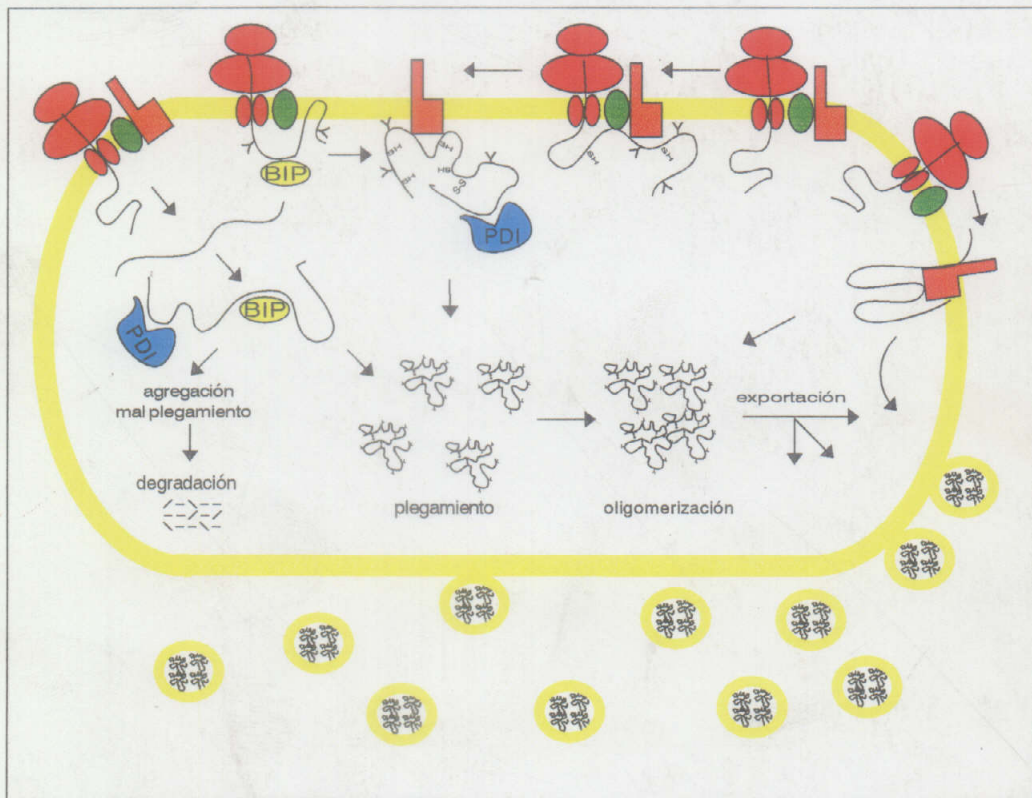




UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



CARACTERIZACIÓN DE UN SUBCOMPARTIMENTO PROTEOLÍTICO EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DE CONDROCITOS

Manuel Alonso

Tesis Doctoral

1996

TD-394



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral "Caracterización de un Subcomponente proteolítico en el retículo endoplásmico de *Conocortos*" sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

F. a. [Signature]

Sevilla, a 13 de Septiembre de 1996

Manuel APARSA

R. 13864



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
16 de mayo de 1996
29 MAYO 1996
El día de Recepción de Tesis
Alonso Alfonso

**CARACTERIZACIÓN DE UN SUBCOMPARTIMENTO
PROTEOLÍTICO EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO
DE CONDROCITOS**

Manuel Alonso

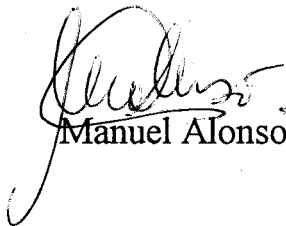
Tesis Doctoral

1996

TD-346

CARACTERIZACIÓN DE UN SUBCOMPARTIMENTO PROTEOLÍTICO EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DE CONDROCITOS

*Trabajo realizado en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología por el Licenciado*



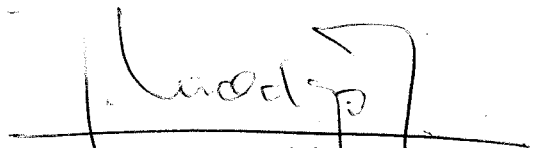
Manuel Alonso

Sevilla, 1996

Directores



*Dr. Ángel Velasco
Prof. Titular de Biología Celular
Universidad de Sevilla*



*Dra. Josefina Hidalgo
Prof. Titular de Biología Celular
Universidad de Sevilla*

*A la memoria de mi padre,
quien nunca imaginó que sus
“genes” regresaran a la
tierra donde nació.*

A tu memoria, mamá.

*“Hay hombres que de su
cencia tienen la cabeza
llena, hay sabios de todas
menas, mas digo sin ser muy
ducho: es mejor que saber
mucho el aprender cosas
buenas”*

Martín Fierro

(José Hernández)

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha contado con el apoyo de muchas personas. Sus consejos y ánimos han sido importantísimos durante estos casi cuatro años y no quisiera dejar de expresarles mi agradecimiento:

Al *Dr. Ángel Velasco*, mi director de tesis.

A la *Dra. Josefina Hidalgo*, mi directora de tesis, por sus consejos, comprensión y apoyo.

A *Remedios García (Reme)*, por darme siempre ánimos para seguir adelante.

A *Mari Ángeles Ledesma*, por tantos vasos de precipitado que le pedí y no le devolví, y por su gran compañerismo.

A *María José Flores (Pepa)*, *Francisco Castrejón (Paco)* y *Mari Paz Romero (Mari Peace)*, por ayudarme en la confección y corrección del manuscrito, por brindarme su sincera amistad a lo largo de todos estos años y por los sábados de campo y de la venta "Chiquitín".

Al *Dr. Eduardo Tello Porras*, por su disposición permanente para resolver tantos problemas que se presentaron.

Al *Dr. Gregorio García Herdugo*, gracias a quien pude terminar mi tesis en esta Universidad.

A *Emilia Osona Sánchez (Emi)*, secretaria del departamento, por su amistad y preocupación por mi trabajo y también a *Beatriz* por haber cuidado tan bien a Otón.

A la empresa "Avimarsa" por suministrarnos gratuitamente los huevos de pollo incubados.

A la *Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI)-Instituto de Cooperación Iberoamericana (ICI)* por otorgarme la beca para realizar el doctorado en esta Universidad.

A todos los demás compañeros del Dpto. de Biología Celular y de la Facultad de Biología de esta Universidad que de una forma u otra tuvieron algo que ver con este trabajo y me hicieron sentir como si estuviera en mi tierra.

ABREVIATURAS

ALLM, N-acetil-leucil-leucil-metioninal

ALLN, N-acetil-leucil-leucil-norleucinal

BSA, seroalbúmina bovina

CG, complejo de Golgi

DTT, ditioneitol

EDTA, ácido etilén-diamino-tetra-acético

PBS, tampón fosfato salino

PMSF, fenil-metil-sulfonil-fluoruro

PVDF, di-fluoruro de polivinilideno

RE, retículo endoplásmico

SDS-PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio.

TLCK, N-tosil-L-lisina clorometil cetona

TPCK, N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
LA RUTA SECRETORA	2
ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO	5
Reticulo endoplásmico rugoso	5
Reticulo endoplásmico liso	6
Envoltura nuclear	6
Reticulo endoplásmico de transición	7
Otras subregiones funcionales	7
SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS EN EL RE	10
Síntesis	10
Modificaciones covalentes	10
Plegamiento	11
Oligomerización	12
RETENCIÓN DE PROTEÍNAS ENDÓGENAS DEL RE	13
CONTROL DE CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS SINTETIZADAS EN EL RE	15
Retención de proteínas aberrantes	15
Degradación de proteínas retenidas en el RE	15
II. MATERIAL Y MÉTODOS	21
Anticuerpos y reactivos	23
Cultivo primario de condrocitos	24
Purificación del proteoglicano agregán	25
Obtención y purificación del anticuerpo anti agregán	26
Marcaje metabólico	27
Inmunoprecipitación de moléculas relacionadas con agregán	27
Análisis de los inmunoprecipitados	28
Detección de proteínas electrotransferidas a membranas de PVDF	30
Fraccionamiento subcelular	30
Inmunofluorescencia	32
III. RESULTADOS	33
El proteoglicano agregán	35
Purificación de agregán	41
Obtención y purificación de un anticuerpo contra agregán	41



Cultivo de condrocitos	42
Secreción de agregán	49
Detección intracelular de agregán	49
Procesamiento biosintético de agregán	50
Otras formas moleculares reconocidas por el anticuerpo anti-agregán	58
Relación inmunológica de la proteína de 190 kDa con el precursor de 370 kDa	58
Sensibilidad de la forma de 190 kDa al tratamiento con endoglicosidasa H	59
Detección de formas moleculares relacionadas con agregán en fracciones subcelulares	60
Concentración de la forma de 190 kDa en una subregión del RE	67
Caracterización de las vesículas fluorescentes teñidas con el anticuerpo anti-agregán	68
Identificación de las subregiones del retículo que contienen gp190	75
Degradación del precursor de agregán de 370 kDa	81
La forma de 190 kDa es un producto de degradación del precursor de 370 kDa	82
La degradación del precursor de agregán de 370 kDa tiene lugar en el RE	87
Características del proceso degradativo	93
La degradación del precursor de 370 kDa ocurre en el subcompartimento del RE	94
IV. DISCUSIÓN	107
La degradación de los precursores de agregán ocurre en el RE	112
La degradación de precursores de agregán se efectúa en un subcompartimento especializado del RE	114
IMPLICACIONES DE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS EN UN SUBCOMPARTIMENTO DEL RE	116
V. CONCLUSIONES	121
VI. BIBLIOGRAFÍA	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Modelo de la maquinaria del RE encargada del “control de calidad de proteínas”	17
Figura 2.- Monómero de agregán	37
Figura 3.- Organización macromolecular de los proteoglicanos de agregán	39
Figura 4.- Caracterización del proteoglicano agregán	43
Figura 5.- Especificidad del anticuerpo contra el centro proteico de agregán	45
Figura 6.- Monocapa de condrocitos en cultivo	47
Figura 7.- Secreción de agregán al medio extracelular	51
Figura 8.- Detección intracelular de las moléculas de agregán.	53
Figura 9.- Procesamiento biosintético de agregán	55
Figura 10.- Inmunoprecipitación de moléculas relacionadas con agregán a partir de células tratadas con tunicamicina	61
Figura 11.- Relación inmunológica de p190 con el precursor de agregán de 370 kDa	63
Figura 12.- Sensibilidad de las moléculas relacionadas con agregán al tratamiento con endoglicosidasas	65
Figura 13.- Localización de moléculas relacionadas con agregán por fraccionamiento subcelular	69
Figura 14.- Detección de las formas moleculares relacionadas con agregán en fracciones microsomales tratadas previamente con EDTA	71
Figura 15.- Caracterización de las vesículas fluorescentes teñidas con el anticuerpo anti agregán	73
Figura 16.- Efecto del tratamiento con cicloheximida sobre la localización intracelular de moléculas relacionadas con agregán	77
Figura 17.- Detección de p190 en fracciones microsomales de condrocitos tratados con cicloheximida	79
Figura 18.- Efectos de inhibidores de proteasas sobre la degradación intracelular del precursor de agregán	83
Figura 19.- Influencia de agentes lisosomotrópicos sobre la degradación intracelular del precursor de agregán	89
Figura 20.- Influencia de la temperatura, ATP y síntesis de proteínas sobre la degradación del precursor de agregán	95
Figura 21.- Efecto de la disminución de los niveles de calcio en el RE sobre la degradación de los precursores de agregán	99
Figura 22.- Efecto del estado redox del RE sobre la degradación de los precursores de agregán	101
Figura 23.- Efectos de diferentes tratamientos sobre la localización intracelular de las moléculas de agregán	103
Figura 24.- Modelo de la degradación de los precursores de agregán en un sucompartimento del RE	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.- Efecto de diferentes inhibidores de proteasa sobre la secreción y degradación de los precursores de agrecán	85
Tabla II.- Efecto de distintos tratamientos sobre la degradación de precursores de agrecán en el RE	91
Tabla III.- Cuantificación del efecto de la temperatura, inhibición de la síntesis de ATP y de proteínas sobre la degradación de precursores de agrecán en el RE	97

I. INTRODUCCIÓN

LA RUTA SECRETORA

La ruta secretora de las células eucariotas es el camino intracelular que siguen las proteínas extracelulares desde su lugar de síntesis en el retículo endoplásmico hasta que son vertidas al exterior por exocitosis (1). Esta vía es compartida también por las proteínas endógenas de endosomas, lisosomas y membrana plasmática, así como por aquellas que residen en los orgánulos que componen la ruta. Precisamente las proteínas residentes son las determinantes de las diferencias funcionales entre orgánulos secretores (2).

El retículo endoplásmico (RE) es el puerto de acceso a la ruta. La “secuencia señal” portada por las proteínas que siguen este camino determina su entrada a este primer compartimento (3). Después se dirigen hacia el complejo de Golgi (CG) en vesículas de transporte, evaginadas a partir de una región especializada del RE denominada *RE de transición*. Antes de alcanzar el CG las proteínas atraviesan el *compartimento intermedio*, un conjunto de vesículas y túbulos que, según estudios recientes, constituye un lugar de procesamiento y/o verificación de la conformación de las moléculas transportadas (4, 5). Una vez en el Golgi pasan secuencialmente por las cisternas *cis*, *medias* y *trans*, mediante ciclos de evaginación y fusión de vesículas. Al alcanzar la red *trans*-Golgi o TGN, las proteínas son incluidas en vesículas y transportadas hasta la membrana plasmática, siendo incorporadas a ella o vertidas al exterior. De esta ruta general se apartan en algún punto aquellas proteínas que, al ser constituyentes de orgánulos, poseen señales específicas de retención que hacen posible su reconocimiento y selección (2).

A lo largo de este recorrido las proteínas son modificadas. En el RE se pliegan y oligomerizan, adquieren oligosacáridos unidos a asparagina por enlaces N-glicosídicos y, en ciertos casos, se les incorporan cadenas de ácidos grasos. En el CG tiene lugar la maduración de los oligosacáridos N-unidos, la adquisición de oligosacáridos O-unidos a residuos de serina y treonina (6), sulfatación de residuos de tirosina y escisión de propéptidos (7). Algunas de estas modificaciones son importantes para dirigir la proteína a su destino final. Por ejemplo, la fosforilación de unidades de manosa de los oligosacáridos N-unidos pertenecientes a las enzimas lisosomales determina su selección específica y transferencia a lisosomas (8).

Finalmente, las proteínas secretoras como por ejemplo hormonas y enzimas digestivas son concentradas en gránulos de secreción a la espera de alguna señal

extracelular que desencadene su exocitosis. Otras, en cambio, son incorporadas en vesículas que funden constitutivamente con la membrana plasmática (9).

ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

El RE es un orgánulo membranoso único, constituido por una red continua de cisternas, sáculos y túbulos que ocupan el citoplasma periférico de la célula (2). No obstante, desde el punto de vista de su organización morfofuncional, se suelen distinguir varias regiones en el mismo.

Retículo endoplásmico rugoso

Generalmente se encuentra constituido por cisternas delgadas que a veces presentan terminaciones dilatadas de aspecto sacular. El rasgo estructural más característico es la presencia de ribosomas asociados a su superficie citosólica. La asociación de los ribosomas a la membrana del RE rugoso es transitoria y depende de una maquinaria molecular, aún no caracterizada totalmente, responsable del reconocimiento y anclaje de aquellos polipéptidos en síntesis que han de ingresar en la ruta secretora (10). El ribosoma permanece unido al RE rugoso durante el tiempo de elaboración de la proteína en cuestión. Una vez finalizada la síntesis, se desprende de la membrana y se disocia en sus subunidades, las cuales entran a formar parte del conjunto general de subunidades ribosómicas presentes en el citosol. Así pues, el RE rugoso es una región del orgánulo donde predomina la síntesis proteica a cargo de una población cambiante de ribosomas. Las proteínas que éstos producen permanecen ancladas a la membrana del RE o bien son liberadas al espacio luminal, dependiendo de las características particulares de la secuencia de aminoácidos. El lumen del RE rugoso

contiene, por tanto, una gran concentración de polipéptidos recién sintetizados en diversas etapas de plegamiento y modificación (11).

Retículo endoplásmico liso

El RE liso suele presentar una organización tubular ramificada. En la mayoría de los tipos celulares se halla poco representado, constituyendo sólo una pequeña zona dentro del RE. Sin embargo, abunda en aquellas células que elaboran hormonas lipídicas o que realizan funciones de detoxificación (12). En estos casos el RE liso presenta un aspecto de entramado, a base de finos túbulos interconectados. En sus membranas se localizan enzimas que participan en la síntesis de lípidos, incluyendo los de membrana, así como un citocromo (P450) encargado de llevar a cabo la modificación de compuestos tóxicos. La diferencia con el RE rugoso estriba, pues, en el tipo de reacciones metabólicas llevadas a cabo en cada caso, lo que da lugar a un tipo diferente de organización estructural. No obstante, ambas regiones son continuas entre sí y, de hecho, las proteínas integrales del RE liso son sintetizadas en la porción rugosa (13, 14).

Envoltura nuclear

De las dos membranas que constituyen la envoltura nuclear, la externa es continua con la membrana del RE rugoso. Al igual que esta última, presenta ribosomas adheridos a su superficie citosólica, los cuales son capaces de sintetizar proteínas (15). El lumen del RE es continuo con el espacio perinuclear existente entre las dos membranas nucleares. Por todo ello, se considera que la membrana nuclear externa es una parte especializada de la membrana del RE rugoso (16). Sin embargo, existen diferencias significativas entre ellas. Así, la membrana nuclear externa presenta lugares de inserción para las proteínas que constituyen el complejo de poro nuclear. Durante la mitosis tanto

el RE como la envoltura nuclear se vesicularizan, pero la reorganización de ambas estructuras en telofase ocurre de forma independiente (17). Finalmente, algunos estudios han señalado que ciertas proteínas serían sintetizadas preferentemente a nivel de los ribosomas asociados a la membrana nuclear externa (18).

Retículo endoplásmico de transición

Se denomina retículo endoplásmico de transición a una porción del RE carente en parte de ribosomas, pero continua con cisternas típicas del RE rugoso (1). Se trata de los extremos, prácticamente desprovistos de ribosomas, de ciertas cisternas rugosas. En los estudios iniciales de caracterización de la ruta secretora esta región fue identificada como el lugar de exportación de las proteínas elaboradas en el RE. Se propuso que el RE de transición era el sitio de formación de las vesículas de transporte con destino al CG. Sin embargo, hasta el momento no ha sido demostrado de manera concluyente; incluso, si así fuera, aún cabe la posibilidad de que otras zonas del RE estén igualmente implicadas en el proceso.

Otras subregiones funcionales

En los últimos años, diversos estudios han mostrado la existencia de otros dominios en el RE (19). Se trata de subregiones que, debido a sus características morfológicas, podrían ser consideradas como parte del RE rugoso o del liso. No obstante, en ellas tienen lugar actividades concretas que no se llevan a cabo en el resto del orgánulo. Por ejemplo, si bien se reconoce desde hace tiempo que el RE constituye una importante reserva intracelular de Ca^{2+} , estudios recientes han mostrado que las proteínas que participan en su homeostasis están compartimentadas. Así, en tanto la ATPasa de Ca^{2+} , responsable de concentrar este ión en el lumen del RE, se halla

distribuida homogéneamente en las membranas del orgánulo, la proteína soluble de unión a Ca^{2+} , llamada *calsequestrina*, se localiza fundamentalmente en unas subregiones lisas denominadas *calciosomas* (20). En las células de Purkinje, el receptor de inositol trifosfato, cuya activación desencadena la liberación transitoria de Ca^{2+} al citosol, se localiza exclusivamente en una serie de cisternas lisas apiladas, de las cuales parece estar excluida la ATPasa de Ca^{2+} (21, 22).

En el interior de los subcompartimentos del retículo se realizan actividades que en otros tipos celulares o en determinadas condiciones funcionales tienen lugar en localizaciones diferentes. La iniciación de la O-glicosilación de proteínas ocurre en un subcompartimento especializado del RE rugoso en células tumorales (23, 24), condrocitos (24) y fibroblastos (25); en otros muchos tipos celulares esta modificación sucede en las cisternas cis del CG (26) o incluso en el compartimento intermedio (26). Asimismo, la mayoría de las escisiones proteolíticas tienen lugar en el TGN (27), aunque en el caso de la haptoglobina producida por hepatocitos ocurre en un subcompartimento del RE (28). Es posible, por tanto, que el número y características de los subcompartimentos presentes en el RE dependa del tipo celular, aunque también influirían su estado funcional y/o grado de diferenciación.

Ahora bien, la existencia de subregiones en el RE no es un hallazgo totalmente nuevo. Es conocida la capacidad que tienen ciertos tipos celulares para concentrar en el RE formas aberrantes de determinadas proteínas. Los cuerpos de Russell de las células productoras de inmunoglobulinas (29), así como los agregados de proteínas secretoras en las células acinares pancreáticas tratadas con CoCl_3 (30) o en las células tirotropas expuestas a tiroxina (31) son ejemplos establecidos de acúmulos proteicos confinados en determinados subcompartimentos del RE. Asimismo, se ha descrito la compartimentación en subregiones del RE de proteínas integrales de membrana (13). En

general se trata de proteínas mal plegadas o incapaces de oligomerizar y/o ensamblarse con otras moléculas (32). Sin embargo, también se conocen ejemplos de virus animales cuya evaginación se produce preferentemente a nivel de una determinada subregión del RE (33), debido quizás a las condiciones iónicas imperantes en esta localización. Aparte de su papel como reservorio de agregados proteicos, no es fácil imaginar la significación funcional de estos subcompartimentos. Además, cada uno de ellos presenta un tipo de organización estructural: red tubular ramificada (32), cisternas dilatadas (30) o apiladas (22), en forma de estrella (34), etc. Posiblemente, tanto la naturaleza como la cantidad del producto proteico acumulado determinen el tipo de estructura desarrollada.

En definitiva, un buen número de pruebas indican que, más allá de la mera distinción entre RE rugoso y liso, este orgánulo se halla subdividido en una serie de compartimentos funcionales diversos. Estos parecen estar especialmente desarrollados en ciertos tipos celulares o bajo determinadas circunstancias. Sin embargo, la idea más general es considerar que las subregiones están presentes en todas las células, si bien se hacen evidentes tras experimentar amplificación en ciertas condiciones. La importancia que la organización compartimentada supone para las actividades desarrolladas en el RE queda de manifiesto en un trabajo reciente de Li y cols. (35). Las células del endosperma de arroz presentan dos tipos morfológicamente diferentes de RE rugoso: el cisternal y el que contiene cuerpos proteicos. A nivel de cada uno de ellos se sintetiza un tipo distinto de proteína debido a que los correspondientes ARNm se asocian específicamente con un tipo de compartimento, pero no con el otro.

SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS EN EL RE

Síntesis

Inicialmente la síntesis de las proteínas que ingresan en la ruta secretora no es diferente de la síntesis de proteínas citosólicas o nucleares. En todos los casos, ribosomas libres comienzan la traducción del ARNm correspondiente. Sin embargo, muy pronto tiene lugar una selección de aquellos ribosomas encargados de elaborar proteínas para la ruta exocítica (10). A pesar de la diversidad molecular existente entre proteínas de membrana y solubles pertenecientes a distintos orgánulos, todas ellas presentan una *secuencia señal* de aminoácidos hidrofóbicos que las identifica como clase común (10). La secuencia señal es reconocida por un complejo ribonucleoproteico llamado SRP (partícula reconocedora de la señal), el cual interacciona con un receptor situado en la membrana del RE. A este nivel se forma un complejo proteico que, por un lado, fija el ribosoma a la membrana y, por otro, permite la transferencia vectorial de la proteína al tiempo que va siendo sintetizada (36). La translocación es incompleta en el caso de las proteínas integrales de membrana las cuales, por presentar segmentos transmembrana hidrofóbicos, quedan insertadas en la membrana del RE. Las proteínas solubles, en cambio, atraviesan totalmente la membrana y son vertidas al interior del orgánulo.

Modificaciones covalentes

La mayoría de las proteínas sintetizadas en el RE experimentan una serie de modificaciones que hacen posible la adquisición de la conformación nativa. La más común de estas reacciones consiste en la incorporación cotraduccional de cadenas oligosacáridicas que son unidas a asparagina por enlaces N-glicosídicos (19). En el

mismo RE comienza el procesamiento de estos oligosacáridos con la escisión de residuos terminales de glucosa y manosa (37).

Otra modificación covalente consiste en la adición de ácidos grasos a la molécula proteica, que aumentan su hidrofobicidad. Los estudios cinéticos realizados en estos últimos años han confirmado la presencia de proteínas aciladas en el RE (38), pero aún no está descartada la posibilidad de que la reacción pueda llevarse a cabo también en el CG. Como se mencionó anteriormente, en algunos tipos celulares la adquisición de los oligosacáridos O-unidos parece iniciarse en el RE (24).

Plegamiento

Al tiempo que las proteínas en síntesis van siendo transferidas a través de la membrana del RE, comienzan a plegarse progresivamente y en forma ordenada hasta que consiguen adoptar una conformación estable (39, 40). Por lo general, este suele ser un proceso lento en relación a la propia síntesis proteica, puesto que cada uno de los dominios polipeptídicos experimenta su propia secuencia de estructuración y modelado. Por ello, las proteínas permanecen en el RE durante un tiempo prolongado, desde minutos hasta horas. Finalmente, alcanzan una estructura tridimensional adecuada, energéticamente estable, y son enviadas al CG. El ambiente intraluminal del RE proporciona las condiciones físico-químicas y enzimáticas que hacen posible el plegamiento (40). Así, una de las proteínas integrales del orgánulo, la enzima multifuncional *proteína disulfuro isomerasa*, cataliza la formación y reordenación de puentes disulfuro, evitando el plegamiento incontrolado de las cadenas polipeptídicas (41).

Sin duda la secuencia de aminoácidos o estructura primaria es el principal factor determinante de la conformación proteica. Sin embargo, el proceso es acelerado por la intervención de las *chaperonas*, proteínas que se unen transitoriamente a los polipéptidos que no han adquirido todavía su correcta conformación y facilitan su plegamiento (42). El RE posee una dotación de chaperonas específicas que participan en el plegamiento de las proteínas en él sintetizadas. En este sentido, han sido especialmente estudiadas la chaperona conocida como *BiP* o *GRP78* y la denominada *calnexina*. La primera de ellas es una molécula soluble que participa en el plegamiento de una amplia variedad de cadenas polipeptídicas, mediante ciclos de asociación/disociación acoplados a hidrólisis de ATP (43, 44, 45). Por su parte, *calnexina* es una proteína de membrana que colabora en el plegamiento de precursores glicoproteicos solubles y de membrana (46). En algunos casos ambas chaperonas actúan de forma concertada y secuencial sobre un mismo polipéptido (47). Si por alguna razón éste no logra alcanzar una conformación estable las chaperonas permanecen unidas a él y la proteína es retenida en el RE (48). Por el contrario, conforme progresa el proceso de plegamiento disminuye la afinidad de las chaperonas por las proteínas (49). Cuando éstas han adquirido la conformación adecuada se suele decir que han superado el "control de calidad" propio del RE y pueden, por tanto, abandonarlo.

Oligomerización

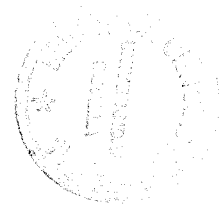
Las proteínas multiméricas experimentan un proceso de ensamblaje que está condicionado al propio plegamiento de las subunidades (39). La oligomerización es también un proceso secuencial que, en la mayoría de los casos, transcurre enteramente en el RE. Depende de la disponibilidad de cadenas polipeptídicas previamente sintetizadas y plegadas o prácticamente plegadas, capaces de reconocerse e interactuar entre sí de forma específica. La asociación entre subunidades se realiza ordenadamente, paso a paso,

siendo por ello un proceso con múltiples etapas (40). Las características de la superficie de las moléculas que interaccionan son las determinantes del reconocimiento. Por lo general, el proceso completo no requiere consumo de ATP (40).

Por otro lado, las subunidades no han de ser sintetizadas en cantidades estequiométricas (50). El número de complejos finalmente ensamblados está en relación con el número de copias disponibles de la subunidad menos abundante. Así pues, es frecuente que la producción de un determinado complejo proteico se halle regulada únicamente a nivel de la síntesis de una de sus subunidades. Ello determina, además, que las subunidades no utilizadas para el ensamblaje sean retenidas en el RE y consideradas como proteínas mal plegadas (50).

RETENCIÓN DE PROTEÍNAS ENDÓGENAS DEL RE

De lo mencionado hasta ahora se deduce que en el RE residen una serie de proteínas que son exclusivas de este orgánulo y, por tanto, están ausentes en otras localizaciones (2). Así, la chaperona *BiP* o la enzima *proteína disulfuro isomerasa* son proteínas residentes solubles, en tanto que *calnexina*, la transferasa de oligosacáridos N-unidos y el complejo de translocación de péptidos en síntesis son proteínas residentes de membrana. Para el desarrollo de las actividades funcionales que tienen lugar en el RE es necesario que las proteínas endógenas sean de alguna forma diferenciadas del conjunto de proteínas itinerantes que, siendo sintetizadas en este orgánulo, poseen un destino final distinto. Es decir, deben existir mecanismos específicos que aseguren la selección y retención de proteínas endógenas, evitándose su exportación junto con las moléculas que constantemente abandonan el RE para proseguir la ruta secretora (2).



La mayoría de las proteínas residentes del RE presentan señales de selección constituidas por determinadas secuencias de aminoácidos. Así, en mamíferos las proteínas solubles poseen la secuencia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) en el extremo carboxilo terminal (51). En levaduras se trata de la secuencia His-Asp-Glu-Leu (HDEL) (52). Las proteínas que presentan cambios en estas secuencias no son reconocidas como componentes endógenos del RE. En su lugar, abandonan el orgánulo y viajan a través de la ruta secretora hasta el medio extracelular (2). Por el contrario, la incorporación de una de estas secuencias a proteínas lisosomales o de secreción provoca su retención en el RE (53, 54). En el caso de las proteínas integrales de membrana la señal de retención consiste en la secuencia carboxilo-terminal Lys-Lys-X-X (KKXX) para las proteínas tipo I (aquellas cuyo extremo carboxilo está localizado en el lado citosólico de la membrana) o dos residuos de arginina en el extremo amino-terminal (lado citosólico de la membrana) de las proteínas tipo II (55).

De todas formas, a pesar de estar señalizadas, una pequeña fracción de las proteínas endógenas del RE abandona constantemente el orgánulo. En tal caso, son reconocidas por receptores específicos a nivel del compartimento intermedio y CG. Cuando esto sucede, los complejos ligando-receptor oligomerizan y son incorporados en vesículas de transporte retrógrado que devuelven al RE las proteínas escapadas (2). Este proceso de recuperación es vital, ya que de él depende que la célula mantenga segregados el RE de otros compartimentos de membrana. Los receptores involucrados son proteínas de membrana, altamente conservadas entre especies eucariotas, que continuamente viajan de forma cíclica entre el CG, compartimento intermedio y RE (2, 51).

CONTROL DE CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS SINTETIZADAS EN EL RE

Retención de proteínas aberrantes

El control de calidad operante en el RE evita que puedan abandonar este orgánulo aquellas proteínas que, tras ser sintetizadas, no alcanzan su conformación nativa. Ello puede deberse a que experimenten un proceso de plegamiento incompleto o defectuoso, o bien a que no logren ensamblarse con otras moléculas para formar complejos multiméricos. En cualquier caso, las proteínas afectadas permanecen retenidas en el RE, a veces en subcompartimentos especiales del mismo y, en muchos casos, en asociación permanente con chaperonas (56).

Se desconoce el mecanismo molecular responsable del reconocimiento de las proteínas mal plegadas. En un estudio reciente se ha demostrado que, al menos, algunas de ellas logran abandonar el RE y viajar hasta el compartimento intermedio y primeras cisternas del CG, pero luego retornan al RE mediante transporte retrógrado (5). Así pues, el recorrido intracelular que tales proteínas mal plegadas siguen sería semejante al descrito para las proteínas endógenas del RE.

Degradación de proteínas retenidas en el RE

Las proteínas defectuosas retenidas en el RE son selectivamente degradadas en este orgánulo (57). Este es uno de los aspectos funcionales más destacables y, a la vez, más desconocidos del RE, dado que tradicionalmente se ha relacionado exclusivamente con procesos de síntesis y modificación de proteínas. Constituye una prueba más sobre la existencia en este orgánulo de un control de calidad de las moléculas producidas. La degradación en el RE es un hecho demostrado a partir de estudios con células

permeabilizadas (58) y otras situaciones en las que el transporte RE-Golgi se encuentra bloqueado (4).

Las reacciones proteolíticas en el RE podrían estar catalizadas por proteasas específicas, diferentes a las que residen en otras localizaciones celulares. Así, los tratamientos con bases débiles que afectan a la degradación de biomoléculas en lisosomas y endosomas no tienen efecto sobre la degradación de precursores proteicos en el RE (50, 59). Las proteínas susceptibles de experimentar degradación varían según el tipo y estado funcional de las células. Por ello, se piensa que la dotación de proteasas presente en el RE también cambia de acuerdo con estos factores. Sólo así se explica que en algunos casos, pero no en otros, la degradación dependa del aporte de ATP (60), síntesis de proteínas (57, 61) o requiera Ca^{2+} (62). Por la misma razón, la sensibilidad a inhibidores de proteasas es variable. Algunos procesos degradativos son bloqueados por inhibidores de proteasas de cisteína (63, 64, 65), otros por inhibidores de proteasas de serina (61, 66) e incluso por inhibidores de metaloproteasas (67). Además, la eliminación de ciertas proteínas retenidas en el RE es un proceso lento, con una vida media de varias horas (68), si bien otras son degradadas en cuestión de minutos (68, 69).

La degradación afecta tanto a proteínas mal plegadas como aquellas que, presentando una conformación apropiada, se encuentran en exceso con respecto a las necesidades celulares. Por ello los procesos degradativos pueden ser experimentalmente inducidos e influenciados, por ejemplo, haciendo que las células sintetizen una determinada proteína aberrante (57) o modificando las necesidades de producción de una proteína en particular (66).

Por otro lado, existen dos cuestiones aún no aclaradas relacionadas con el mecanismo operante. En primer lugar, se trata de reacciones extremadamente selectivas,

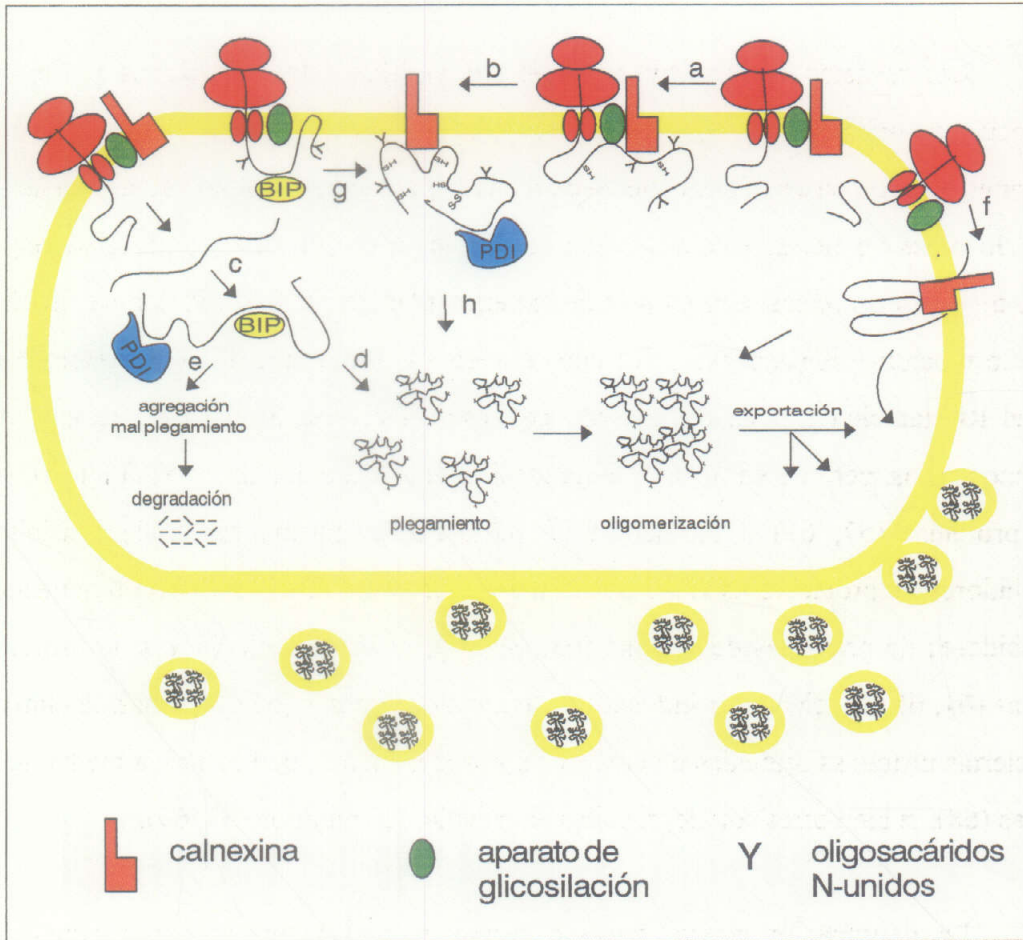


FIGURA 1.- Modelo de la maquinaria del RE encargada del "control de calidad de proteínas" . Durante o inmediatamente después de su translocación, las proteínas N-glicosiladas son presentadas a *calnexina* por algún componente del mismo aparato de glicosilación del orgánulo (a). El plegamiento catalizado por enzimas, como por ejemplo *PDI*, se podría realizar mientras la proteína está unida a *calnexina* o bien en los intervalos de tiempo en que se desprende de esta chaperona (b). Muchas proteínas solubles se unen directamente a *Bip* (c) en el lumen del RE donde las enzimas de plegamiento se encargan de que adquieran su conformación tridimensional (d). Puede ocurrir que las proteínas no se plieguen, se agreguen y finalmente sean degradadas (e). Ciertas proteínas de membrana no glicosiladas también se asocian con *calnexina* (f), lo que sugeriría que secuencias citosólicas o transmembranarias inducirían la unión con esta chaperona. En otros casos, proteínas de membrana N-glicosiladas se unen secuencialmente a *Bip* y *calnexina* (g) para finalmente adquirir su conformación tridimensional (h).

por cuanto en un momento dado únicamente son degradadas determinadas proteínas, en tanto que el resto de las especies moleculares que también están presentes en el RE no son afectadas. La maquinaria responsable de la degradación debe ser, por tanto, altamente específica y capaz de reconocer un cierto número de sustratos entre innumerables moléculas, incluyendo aquellas que todavía no han completado su plegamiento y oligomerización. Los factores (secuencias de aminoácidos, unión a chaperonas, etc.) determinantes de este reconocimiento específico sólo han sido analizados para algunas moléculas (70, 71) y no parecen ser aplicables al resto de las proteínas susceptibles de ser degradadas en el RE. En segundo lugar, es razonable plantearse la dificultad topológica que entraña la coexistencia, en un mismo orgánulo, de reacciones biosintéticas y degradativas. Cada una de ellas debe depender de unas condiciones óptimas para su realización y poseer sus propios requerimientos. Si bien las enzimas implicadas podrían tener una alta especificidad, sorprende que entre ambas actividades no se produzcan interferencias frecuentes y, como consecuencia, una merma en la eficiencia del RE como orgánulo biosintético. Una posibilidad alternativa consistiría en la separación espacial de estas dos funciones (58). En la Fig. 1 se esquematizan los principales pasos del *control de calidad* a que son sometidas las proteínas sintetizadas en el RE.

El **objetivo** del presente estudio es analizar la segregación de estas dos actividades del RE, la síntesis y la degradación de proteínas. Para ello, hemos examinado la producción de una molécula secretora, el proteoglicano agrecán, comprobando que parte de él es habitualmente degradado en un subcompartimento del RE distinto de aquel en el que se sintetiza.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Anticuerpos y reactivos

Además del anticuerpo anti-agrecán, en el presente estudio se emplearon los siguientes anticuerpos primarios:

- Monoclonal de ratón contra la secuencia KDEL (30)
- Monoclonal de ratón contra keratán sulfato (72)
- Monoclonal de ratón contra condroitín sulfato (73)
- Monoclonal de rata contra agrecán (74)

Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o ratón, marcados con fluoresceína o rodamina, fueron adquiridos de Tago (Burlingame, EE.UU.). El anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina fue de Vector (Burlingame, EE.UU.).

Los inhibidores de proteasas utilizados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EE.UU.) o de Boehringer Mannheim (Alemania). Brefeldina A se adquirió de Epicenter Technologies (Madison, EE.UU.). Los complejos ovoalbúmina-rodamina fueron de Molecular Probes (Eugene, EE.UU.). Tunicamicina, cloroquina, monensina, ionóforo A23187, cicloheximida, diamida, ditiotreitól (DTT) y albúmina de suero bovino (BSA) se adquirieron de Sigma.

Cultivo primario de condrocitos

Las células se obtuvieron a partir del esternón de embrión de pollo de 14-16 días de incubación. El tejido fue extraído en condiciones de esterilidad, lavado con PBS y disgregado a 37°C. Para ello fue incubado primero con 3 ml de una solución compuesta por 0.025% de tripsina y 0.02% de colagenasa tipo I (ambas de Sigma) en PBS (pH 7.2). Después de 15 minutos esta solución fue aspirada y reemplazada por otra similar suplementada con 0.22% de colagenasa tipo II (Sigma). Durante los 40 minutos siguientes de incubación, la solución fue pipeteada con suavidad hasta conseguir la disgregación completa del tejido. Tras añadir un volumen equivalente de medio de cultivo, la suspensión celular fue pasada a través de un filtro Nylon Nitex y centrifugada a 800 g durante 10 minutos.

Las células fueron cultivadas en medio Ham F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 µg/ml de estreptomomicina y 50 unidades/ml de

penicilina (todos de Gibco BRL, Gaithersburg, EE.UU.). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂. Para las determinaciones bioquímicas las células fueron cultivadas en suspensión (3×10^5 células/ml) en placas bacteriológicas. Para los experimentos de inmunofluorescencia fueron adheridas a cubreobjetos previamente cubiertos con gelatina y situados en placas de cultivo. Las células recibieron medio completo nuevo al segundo y al tercer día de iniciar el cultivo:

Purificación del proteoglicano agregán

El proteoglicano agregán fue purificado según el método descrito por Oike y cols. (75) a partir del esternón de embrión de pollo de 14-16 días de incubación. Los fragmentos de tejido fueron lavados con PBS y, posteriormente, transferidos a una solución 4 M de cloruro de guanidina en Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), con los inhibidores de proteasas EDTA 10 mM, N-etilmaleimida 10 mM, PMSF 1 mM y peptatina A 0.36 mM. Durante su permanencia en esta solución, las piezas fueron congeladas y descongeladas varias veces a fin de ocasionar la ruptura del tejido y la lisis de las células. La preparación fue incubada a 0°C durante 14-18 horas con agitación suave pero constante y centrifugada a 12000 g durante 30 minutos. El sobrenadante con los monómeros de agregán disociados fue transferido a un nuevo vial y combinado con el sobrenadante resultante de volver a extraer el material inicialmente precipitado. La solución fue diluida con un volumen igual de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) con inhibidores de proteasas. Los proteoglicanos agregán fueron precipitados con 3 volúmenes de acetato potásico al 1.3% en etanol al 95% y posteriormente centrifugados a 12000 g durante 30 minutos. Después fueron resuspendidos en 10 ml de medio de extracción con inhibidores de proteasas y N-etilmaleimida, siendo incubados durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad para permitir la alquilación total por la N-etilmaleimida de los grupos sulfhidrilo presentes en la molécula. Tras añadir 6.52 g de

CsCl la solución fue centrifugada a 10^5 g durante 48 horas a 20°C . Las fracciones de 1 ml fueron precipitadas con 3 ml de acetato de potasio al 1.3% en etanol al 95%. Los precipitados fueron resuspendidos en NH_4HCO_3 10 mM (pH 7.6), liofilizados y disueltos en PBS.

Obtención y purificación del anticuerpo anti-agrecán

Se resuspendieron 100 μg de agrecán purificado en 100 μl de PBS. Posteriormente esta suspensión fue mezclada con un volumen igual del adyuvante Hunter's Titer-Max (CytRx Corp., Atlanta, EE.UU.) e inyectada a un conejo de raza New Zealand. Las inyecciones se repitieron a intervalos de tres semanas, durante un período total de 6 meses, consistiendo en 50 μg de agrecán en 50 μl de PBS más un volumen igual de adyuvante.

El suero correspondiente fue sometido a precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%. Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en PBS y dializadas exhaustivamente contra este mismo tampón. La fracción IgG fue purificada por afinidad en una columna de proteína A-Sepharosa CL4B (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

En un paso más de purificación, el anticuerpo fue adsorbido a bandas proteicas previamente transferidas a una membrana de PVDF (Millipore, Bedford, EE.UU.) (76). Estas fueron incubadas a 4°C durante 16 horas con el anticuerpo a dilución 1:15 en tampón bloqueante (Tris 100 mM, NaCl 100 mM y 5% de leche sin materia grasa). La elución se realizó en hielo con glicina 200 mM, pH 2.8 y 0.1% de BSA y el eluido fue rápidamente neutralizado con un décimo del volumen de elución de Tris 1 M pH 8.0.

Marcaje metabólico

Las células fueron recolectadas por centrifugación (800 g, 10 minutos), lavadas con PBS e incubadas a 37°C durante 5 minutos con 0.25% de tripsina en PBS a fin de disociar los agregados celulares. Después fueron resuspendidas ($2.5-4 \times 10^6$ células/ml) en medio MEM carente de metionina y cisteína (Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino dializado (Gibco BRL). Las células fueron mantenidas en este medio durante 20 minutos a 37°C, añadiéndose entonces 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de Tran³⁵S-label (1000-1100 Ci/mmol, ICN Radiochemicals, Cleveland, EE.UU.) y continuando la incubación durante el tiempo indicado para cada experimento. Para detener la incorporación de aminoácidos radiactivos se añadieron 1.5 mg/ml de metionina y cisteína no radioactivas (un exceso de 100 veces con respecto a la concentración normal en el medio). La suspensión celular fue inmediatamente transferida a hielo y las células fueron lavadas dos veces con PBS frío. El medio de caza consistió en medio completo con el mismo exceso de metionina y cisteína no radiactivas. Las células se resuspendieron en el mismo a una densidad de 5×10^5 células/ml. En los experimentos en que se utilizaron otras condiciones de marcaje, éstas se indican en la leyenda de la figura correspondiente.

Inmunoprecipitación de moléculas relacionadas con agregán

Alícuotas de la suspensión celular fueron transferidas a hielo y centrifugadas (1000 g, 10 minutos) a 4°C, lo que permitió separar a las células del medio de cultivo. Las muestras de medio fueron directamente procesadas para inmunoprecipitación. Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y después lisadas con Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) con NaCl 400 mM, EDTA 5 mM, 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (benzamidina 5 mM, PMSF 1mM y 100 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor de la tripsina de

soja). Los lisados de células fueron centrifugados (10000 g, 10 minutos) a fin de descartar los núcleos y otros restos celulares.

Las muestras de medio y los sobrenadantes postnucleares derivados de los lisados celulares fueron inicialmente aclarados de proteínas susceptibles de precipitar inespecíficamente. Para ello, fueron incubados con 150 µg/ml de proteínas de suero preinmune de conejo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras añadir a cada tubo 10 mg de proteína A-Sepharosa CL4B (Sigma) e incubar durante 40 minutos, las soluciones fueron centrifugadas (3000 g, 30 segundos) y los sobrenadantes transferidos a tubos nuevos. A cada uno de ellos se añadieron 400 µg/ml del anticuerpo anti-agrecán. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas o bien durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, se incubaron con 10 mg por muestra de proteína A-Sepharosa CL4B durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunoprecipitados fueron lavados secuencialmente 3 veces con tampón de lisis, 2 veces con tampón de lisis con doble concentración de NaCl (800 mM) y 2 veces con Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM (pH 7.5).

Análisis de los inmunoprecipitados

Las proteínas inmunoprecipitadas procedentes de lisados de células fueron eluidas de la matriz de Sepharosa CL4B mediante desnaturalización. Los inmunoprecipitados fueron resuspendidos en tampón para muestras de electroforesis con DTT 10 mM y 4% de SDS, calentados durante 5 minutos a 90°C y las proteínas liberadas analizadas mediante electroforesis en SDS-PAGE según Laemmli (77). Habitualmente se utilizaron geles con una concentración de acrilamida del 5% los cuales, tras una fijación de 30 minutos a temperatura ambiente en una mezcla de isopropanol/agua/ácido acético (2.5/6.5/1), fueron procesados para fluorografía con Amplify (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Las bandas visualizadas en los

fluorogramas fueron cuantificadas en un densitómetro (Molecular Dynamics, modelo 300A, Sunnyvale, EE.UU.), usando para ello el programa Image Quant (versión 3.0, 1991; Molecular Dynamics). Por su parte, los inmunoprecipitados procedentes de alícuotas del medio extracelular fueron lavados como se describió anteriormente más un lavado adicional con 90% acetona/10% HCl, secados a 60°C y después cuantificados mediante centelleo líquido (contador Beckman RCC34) o, alternativamente, procesados para electroforesis en SDS-PAGE y fluorografía.

En algunos experimentos fue necesario relacionar la cantidad de radiactividad incorporada en el precursor de agregán durante el tiempo de pulso con la cantidad de monómeros radiactivos recolectados del medio de cultivo durante el período de caza. En estos casos, la posición en el gel del precursor de 370 kDa fue determinada mediante fluorografía. La proteína fue entonces extraída del gel seco, rehidratada, disuelta en $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_4$ y la radiactividad liberada cuantificada mediante centelleo líquido.

Asimismo, con el fin de analizar la naturaleza carbohidratada de agregán y las moléculas con él relacionadas, algunos inmunoprecipitados fueron sometidos a digestión con glicosidasas específicas con anterioridad a su resolución por SDS-PAGE y fluorografía. Las muestras fueron primero resuspendidas en 30 μl de NaCH_3COO 100 mM (pH 5.6), 0.2% de SDS y 0.02% de Tritón X-100 y posteriormente desnaturalizadas a 90°C durante 5 minutos. Las proteínas liberadas fueron transferidas a tubos nuevos, enfriadas e incubadas a 37°C durante 12 horas con 3 miliunidades de endoglicosidasa H o bien endoglicosidasa D (ambas de Boehringer Mannheim) en presencia de PMSF 1 mM y benzamidina 5 mM. Por otro lado, los inmunoprecipitados tratados con condroitinasa ABC (Seikagaku, Tokio, Japón) fueron resuspendidos en Tris-HCl 50 mM (pH 7.6) con EDTA 10 mM, N-etilmaleimida 5 mM, PMSF 2.5 mM y 1 unidad de enzima/ml.

Detección de proteínas electrotransferidas a membranas de PVDF

La transferencia de proteínas a membranas de PVDF se realizó según el método de Towbin (78) en tampón Tris 25 mM (pH 8.3) con glicina 192 mM y SDS 13 mM, activando previamente el PVDF con metanol. El sistema utilizado fue el de transferencia "semiseca" (Semi-Phor TE70, Hoeffler), a un amperaje constante de 2 mA/cm² de gel electrotransferido durante 70 minutos. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron incubadas durante al menos una hora con tampón bloqueante (Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 8.0 y 5% de leche en polvo sin materia grasa) y a continuación en una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-agrecán en el mismo bloqueante durante 2 horas a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C. Tras lavar varias veces con el mismo tampón a temperatura ambiente las muestras se incubaron 1 hora en una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. El revelado de la actividad fosfatasa alcalina se realizó a temperatura ambiente, en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 9.5) con NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, nitro azul de tetrazolium (NBT) al 0.33% (p/v) y bromocloroindoil fosfato (BICP) al 0.16% (p/v).

Fraccionamiento subcelular

Se utilizaron 4×10^7 células, las cuales fueron marcadas con 100 μ Ci/ml de Tran³⁵S-label durante 30 minutos a 37°C, lavadas dos veces con PBS frío y combinadas con 6×10^7 condrocitos no marcados. Estos últimos sirvieron como material de "arrastre", para reducir las pérdidas de membranas que contengan moléculas marcadas radiactivamente.

A partir de este punto todos los pasos se realizaron a 4°C. Las células fueron resuspendidas en 3-4 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) con KCl 10 mM, MgCl₂ 2.5 mM,

sacarosa 250 mM y benzamidina 5 mM. La suspensión de células fue homogeneizada haciéndola pasar 10-12 veces a través de un cilindro homogeneizador con una bola de acero en su interior (H & Y Enterprise, Redwood City, EE.UU.) (79). Los núcleos y las células intactas fueron recolectados por centrifugación (1000, g 10 minutos) y lavados con tampón de homogeneización. Tras combinar ambos sobrenadantes postnucleares, la suspensión fue centrifugada a 12000 g durante 15 minutos para descartar mitocondrias y lisosomas. En algunos experimentos el sobrenadante postmitocondrial fue incubado durante 1 hora con EDTA 25 mM a fin de disociar los ribosomas de los microsomas rugosos (80). En cualquier caso, la centrifugación a 10^5 g (rotor SW60; Beckman Instruments, Palo Alto, EE.UU.) de este sobrenadante permitió sedimentar todas las membranas microsomales. Estas fueron resuspendidas en 0.5 ml de sacarosa al 52% en agua destilada y colocadas sobre 0.5 ml de una solución de sacarosa al 61% situada en el fondo del tubo de ultracentrífuga. Sobre la muestra se depositaron, sucesivamente, las siguientes soluciones de sacarosa en agua destilada: 0.5 ml al 46%, 0.5 ml al 38%, 0.75 ml al 30%, 0.75 ml al 26% y 0.5 ml al 20%. El gradiente discontinuo así constituido fue centrifugado a 1.2×10^5 g durante 12 horas, recolectándose fracciones de 400 μ l por la parte inferior del tubo.

El análisis de las fracciones consistió en la determinación de su densidad específica (mediante medida del índice de refracción), contenido en ARN (absorbancia a 260 nm) y actividad p-nitrofenil- α -D-manosidasa a pH 5.5 (81). Las fracciones fueron diluidas con agua destilada y después centrifugadas a 1.2×10^5 g durante 1 hora en una ultracentrífuga TLA-100 (Beckman Instruments). Las membranas sedimentadas fueron resuspendidas en tampón de lisis y procesadas para inmunoprecipitación con anticuerpo anti-agrecán.

Inmunofluorescencia

Las monocapas de condrocitos adheridos a cubreobjetos fueron lavadas con PBS, tratadas a 37°C durante 10 minutos con 1 mg/ml de hialuronidasa (Sigma) y fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con 4% de formaldehído (preparado a partir de paraformaldehído) en PBS. Las células fueron permeabilizadas con 0.05% de saponina (Sigma) en PBS con 0.5% de albúmina de suero bovino (PBS/BSA/saponina). La incubación con anticuerpos primarios se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas en cámara húmeda. Los anticuerpos se diluyeron en PBS/BSA/saponina. Tras lavar el exceso de anticuerpos no unidos, las células fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios diluidos también en PBS/BSA/saponina. Después de varios lavados con PBS, las preparaciones fueron montadas con 50% de Glicerol en PBS.

III. RESULTADOS

El Proteoglicano Agrecán

Los proteoglicanos son macromoléculas formadas por un centro proteico al cual se unen covalentemente largas cadenas de glicosaminoglicanos, una familia de polímeros lineales constituidos por unidades repetitivas de disacáridos. Estos disacáridos están compuestos por un aminoazúcar (N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina) y un azúcar ácido, en general el ácido glucurónico. Algunos de estos azúcares tienen uno o más grupos hidroxilo esterificados con un grupo sulfato (82). En consecuencia, la mayor parte de los glicosaminoglicanos presentan una elevada concentración de cargas

negativas, lo que les obliga a adoptar una conformación extendida, con el fin de minimizar la repulsión electrostática entre cadenas (Fig. 2).

En la matriz extracelular del cartílago hialino los proteoglicanos constituyen agregados macromoleculares de gran tamaño que proporcionan al tejido características de gel hidratado (83). Las propiedades fisicoquímicas del cartílago, como son su elasticidad o capacidad para absorber las fuerzas de compresión así como la difusión de metabolitos en la matriz, dependen de la organización de los proteoglicanos en la misma.

El proteoglicano mayoritario del cartílago hialino se denomina agregán. Es una molécula compleja (M_r $1-4 \times 10^6$), formada por una proteína central o centro proteico con un M_r estimado en 250 kDa, al cual se hallan covalentemente unidos más de un centenar de glicosaminoglicanos y una decena de oligosacáridos (83). La biosíntesis de agregán es, por lo tanto, un proceso complejo en el que tienen lugar múltiples reacciones post-traduccionales y están implicados varios orgánulos. Después de la escisión de la secuencia señal, el centro proteico se N-glicosila en el RE con 10 a 15 oligosacáridos de alto contenido en manosa que le confieren un M_r de 370 kDa. Tras ser transportado al CG se le unen de 80 a 100 cadenas de condroitín sulfato, 30 a 60 de keratán sulfato y 60 de oligosacáridos O-unidos. En el CG tiene lugar también la modificación a formas más complejas de los oligosacáridos N-unidos.

El monómero de agregán es finalmente secretado a la matriz del cartílago donde forma asociaciones macromoleculares, no covalentes y altamente específicas con el ácido hialurónico (Fig. 3). Estas interacciones son estabilizadas por una pequeña proteína enlazante de 41 kDa, la glicoproteína de unión (83).

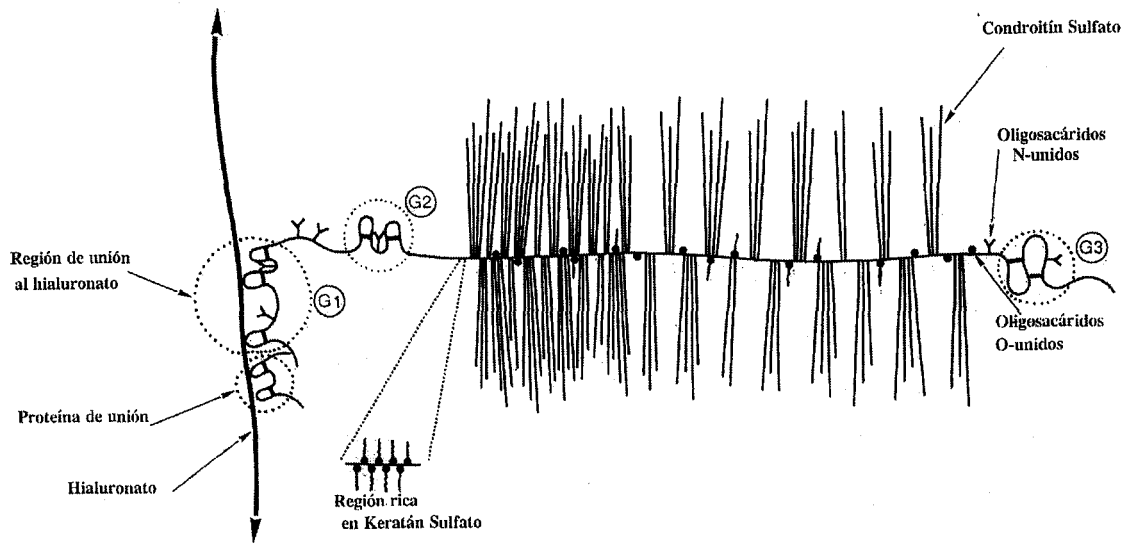


FIGURA 2.- Esquema representativo del monómero de agregación. G1 es el dominio N-terminal que interactúa con la glicoproteína de unión y el ácido hialurónico. Entre los dominios G2 y G3 se encuentra la región de unión de los glicosaminoglicanos condroitín sulfato (CS) y keratán sulfato (KS), así como también de los oligosacáridos O-unidos.

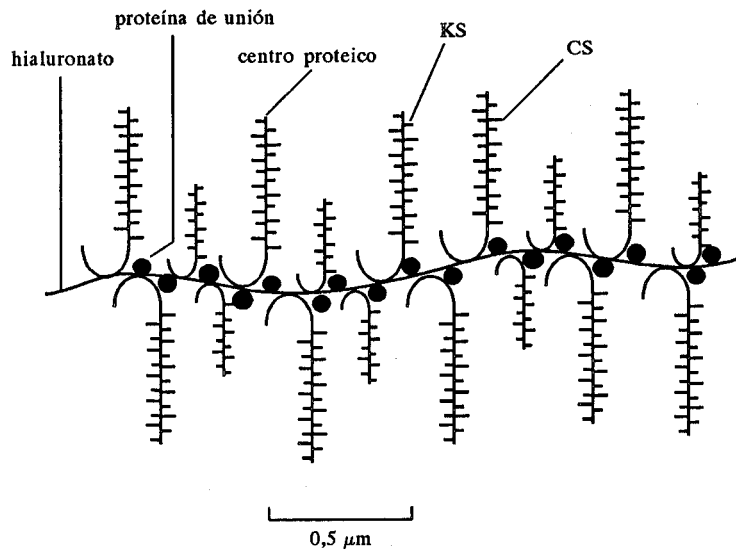


FIGURA 3.- Organización macromolecular de los proteoglicanos de agregación. KS, keratán sulfato; CS, condroitín sulfato.

Purificación de agrecán

El proteoglicano agrecán fue purificado a partir de esternón de pollo mediante extracción con cloruro de guanidina (75). Este tratamiento permite la disociación reversible de los agregados extracelulares de proteoglicanos y su separación de otras moléculas como glicoproteínas de unión y fibras de colágena. Tras someter esta solución a centrifugación isopícnica en gradiente de densidad de CsCl, las moléculas monoméricas de agrecán aparecieron concentradas en una región de alta densidad, siendo reconocidas por su alto contenido en ácido hexurónico en relación a proteína. El análisis electroforético (SDS-PAGE) reveló la existencia de una única banda proteica situada al comienzo del gel. Un ensayo inmunológico de "dot blot" demostró que esta proteína era reconocida por un anticuerpo monoclonal anti-agrecán y que era portadora de cadenas del glicosaminoglicano keratán sulfato (Fig. 4).

Obtención y purificación de un anticuerpo contra agrecán

Utilizamos las moléculas purificadas de agrecán en la producción de un anticuerpo policlonal para estudiar el metabolismo de este proteoglicano. Para ello inmunizamos un conejo de raza "New Zealand" con mezclas de agrecán y adyuvante. Purificamos la fracción IgG del suero inmune mediante precipitación con 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posterior cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-Sepharosa CL4B.

El anticuerpo así obtenido reconoció específicamente al proteoglicano agrecán en ensayos de inmunoprecipitación de proteínas totales, tanto intracelulares (Fig. 5 A, carril 3) como extracelulares (Fig. 5 B, carril 1), así como en membranas de PVDF que

contenían proteínas electrotransferidas. En particular, la única proteína extracelular inmunoprecipitada por el anticuerpo fue sensible al tratamiento con condroitinasa ABC (Fig. 5 B, carril 2), demostrándose así su identidad con el proteoglicano agregacán.

En estos ensayos el anticuerpo mostró escasa o nula reactividad hacia otras proteínas extracelulares como colágena tipo II, IX y X, glicoproteínas de unión, proteína de la matriz del cartílago, etc.

Asimismo, el anticuerpo reconoció el centro proteico de agregacán despojado de sus sustituyentes carbohidratados, tal como se demostró con la inmunoprecipitación de proteínas intracelulares procedentes de condrocitos tratados con tunicamicina (Fig. 5 C, carril 2). Dedujimos, por tanto, que la mayor parte de las inmunoglobulinas eran específicas para la porción proteica de la molécula de agregacán.

Cultivo de condrocitos

El sistema celular empleado para estudiar el metabolismo de agregacán fue el condrocito de pollo en cultivo. Se trata de células conjuntivas que, durante 4-6 días, crecen formando pequeñas colonias constituidas por 10-20 células rodeadas por auténticos fibroblastos (Fig. 6). Durante este tiempo los condrocitos cultivados se comportan como células cartilaginosas, de forma que sintetizan activamente componentes característicos de la matriz extracelular del cartílago como colágena tipo II y proteoglicano agregacán. Posteriormente, las células experimentan desdiferenciación progresiva hasta terminar mostrando propiedades de fibroblasto (84). Por este motivo, en nuestros experimentos utilizamos habitualmente condrocitos cultivados durante 4-5 días.

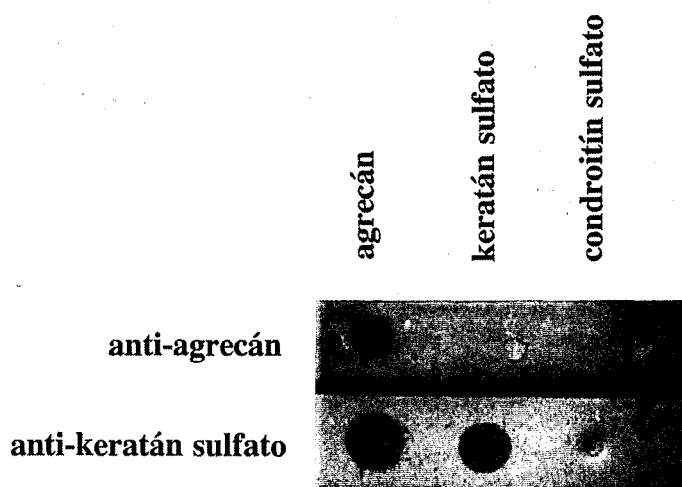


FIGURA 4.- Caracterización del proteoglicano *aggrecan*. *Aggrecan* purificado, *keratan* sulfato y *condroitin* sulfato fueron adsorbidos a membranas de PVDF e incubados con anticuerpos dirigidos contra *aggrecan* cedido por Bárbara Vertel (74) o contra *keratan* sulfato. La unión de estos anticuerpos a las muestras fue detectada mediante anticuerpos secundarios unidos a fosfatasa alcalina.

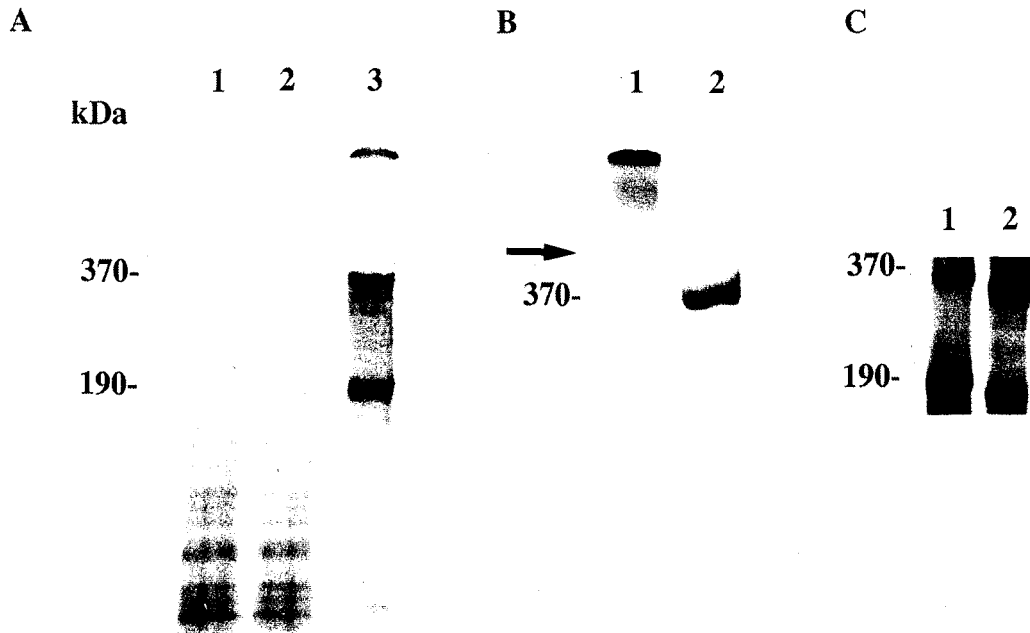


FIGURA 5.- Especificidad del anticuerpo contra el centro proteico de agrecan. (A) Condrocitos marcados radiactivamente con 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de Tran^{35}S -label durante 60 min fueron lisados, las moléculas de agrecan inmunoprecipitadas con el anticuerpo policlonal anti-agrecan (carril 3) y resueltas por electroforesis en SDS-PAGE. Los carriles 1 y 2 corresponden a muestras en las que el anticuerpo estuvo ausente o fue sustituido por suero preinmune respectivamente. (B) Condrocitos marcados radiactivamente durante cinco min con Tran^{35}S -label, fueron incubados en medio de caza durante 60 min. Los inmunoprecipitados del medio extracelular fueron tratados (carril 2) o no (carril 1) con condroitinasa ABC antes de ser sometidos a electroforesis en SDS-PAGE. La flecha indica el límite entre el gel concentrador y el gel separador. (C) Células tratadas (carril 2) o no (carril 1) durante 16 h con 5 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina fueron marcadas radiactivamente con Tran^{35}S -label durante 5 min, cazadas durante 60 min en presencia o ausencia de tunicamicina, y posteriormente lisadas. Los inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-agrecan se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE.

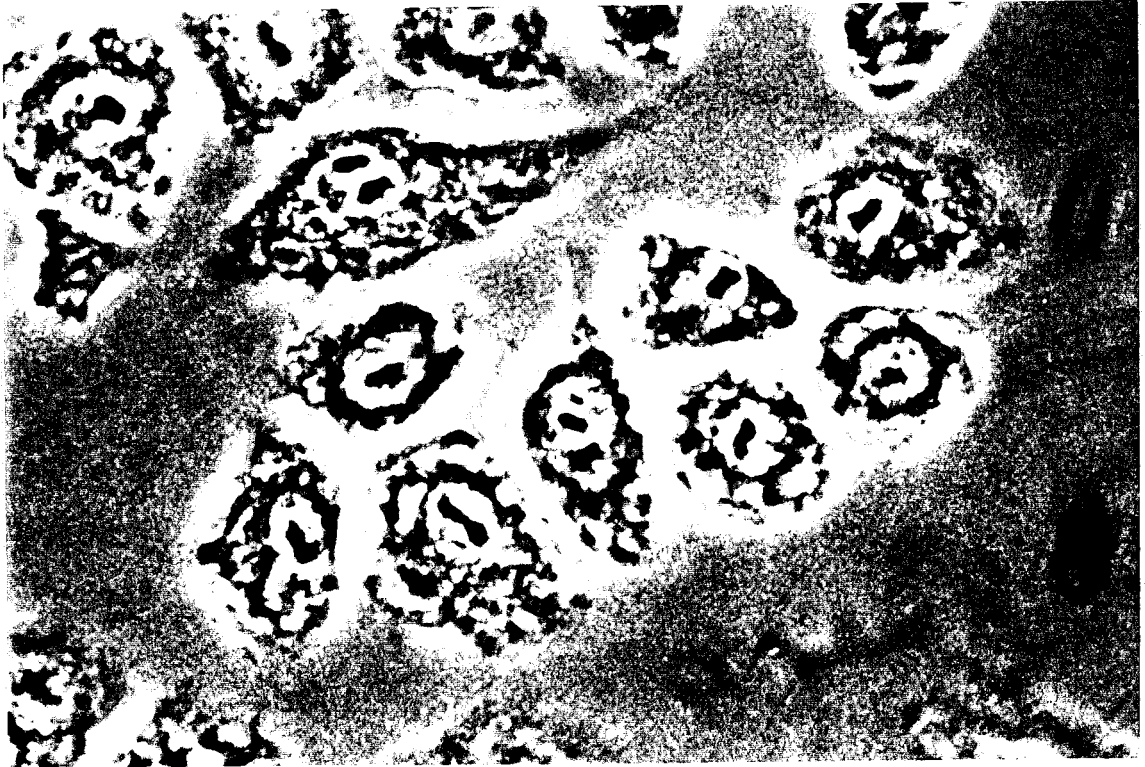


FIGURA 6.- Monocapa de condrocitos en cultivo. Células obtenidas a partir de la disgregación enzimática de esternones de pollo fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente tratados con una solución de gelatina (colágena) al 1%. La figura corresponde a un cultivo de 4 días. Aumento: X 400.

Empleamos dos variedades de cultivos primarios. Para los marcajes metabólicos utilizamos condrocitos mantenidos en suspensión. En estas condiciones, únicamente este tipo celular sobrevive en cultivo. En las tinciones inmunocitoquímicas, en cambio, usamos células adheridas a placas de cultivo previamente cubiertas con gelatina (colágena) para permitir el crecimiento en monocapa.

Secreción de agregán al medio extracelular

Con el fin de valorar la utilidad del sistema celular seleccionado examinamos la producción de agregán por parte de los condrocitos en cultivo. Marcamos las células radiactivamente con Tran³⁵S-label durante 5 minutos (pulso) y luego las incubamos en medio no radiactivo con un exceso de metionina y cisteína (caza). A los tiempos indicados separamos las células del medio de cultivo por centrifugación y, a partir de este último, inmunoprecipitamos las moléculas de agregán (Fig. 7). La radiactividad incorporada en los inmunoprecipitados, medida mediante centelleo líquido, mostró que los monómeros de agregán maduro comenzaron a aparecer en el medio extracelular casi inmediatamente después de su síntesis, alcanzándose el máximo de producto secretado a las 3 horas. Calculamos un tiempo medio de secreción de 30 minutos, lo que indica un procesamiento relativamente rápido para esta especie molecular, teniendo en cuenta la complejidad química de su elaboración.

Detección intracelular de agregán

Mediante inmunofluorescencia indirecta es posible estudiar la localización intracelular de los precursores biosintéticos de agregán. No obstante, la abundancia de

este proteoglicano en la matriz que las células elaboran en cultivo suele dificultar la observación de la tinción intracelular (Fig. 8, a). Por ello, antes de su procesamiento para inmunofluorescencia, las monocapas fueron tratadas con hialuronidasa, con el fin de disociar los agregados extracelulares de proteoglicanos y permitir su posterior extracción. Los cultivos así tratados carecían prácticamente de tinción extracelular, en tanto que la tinción intracelular pudo ser claramente apreciada (Fig. 8, b). Así, los precursores biosintéticos de agregán aparecieron localizados en la región perinuclear de las células y en 2-5 “vesículas” o áreas redondeadas situadas en el citoplasma periférico. La tinción perinuclear recordó a la observada en otros tipos celulares con anticuerpos dirigidos contra proteínas integrales del CG o en tránsito a través del mismo (32). En este orgánulo el centro proteico de agregán experimenta importantes modificaciones post-traduccionales y, por tanto, era de esperar que los precursores de agregán estuvieran concentrados en él. En cambio, la tinción a nivel de las zonas periféricas no se correspondía con el patrón de inmunotinción de un orgánulo en particular. Ello indicó la existencia de una fracción intracelular de precursores de agregán en una localización subcelular no determinada.

Procesamiento biosintético de agregán

Estudiamos la biosíntesis de agregán mediante experimentos de marcaje metabólico. Los condrocitos fueron incubados con Tran³⁵S-label durante 5 minutos y después en medio no radiactivo con un exceso de metionina y cisteína. A los tiempos indicados, las células fueron lavadas y lisadas. Los precursores de agregán fueron purificados mediante inmunoprecipitación y analizados mediante electroforesis en SDS-PAGE (Fig. 9 A).

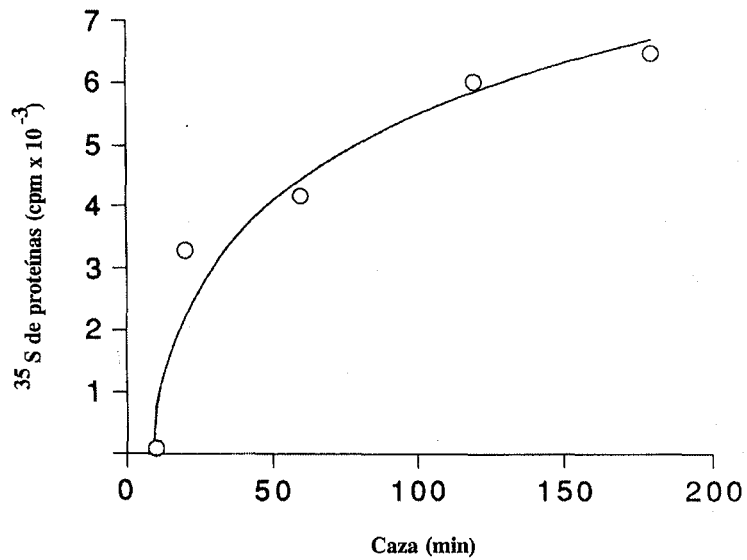


FIGURA 7.- Secreción de agregón al medio extracelular. Células marcadas radiactivamente durante 5 min fueron incubadas en medio de caza durante los tiempos indicados. En cada punto, los monómeros de agregón secretados al medio extracelular se inmunoprecipitaron y cuantificaron por centelleo líquido.

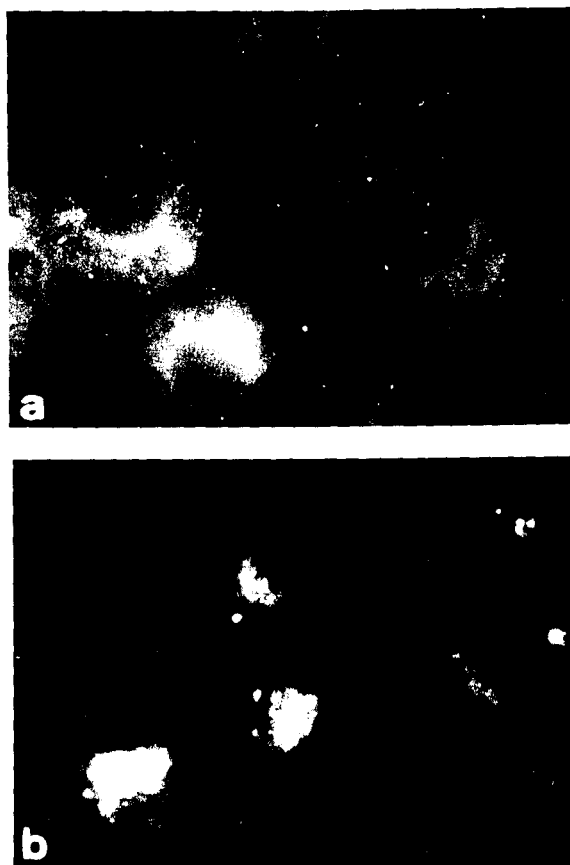


FIGURA 8.- Detección intracelular de las moléculas de agregcán. Monocapas de condrocitos cultivados durante 4 días fueron tratadas (b) o no (a) con 1 mg/ml de hialuronidasa durante 15 min, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-agrecán. Nótese en (b) la ausencia de tinción extracelular. Aumento: X 400.

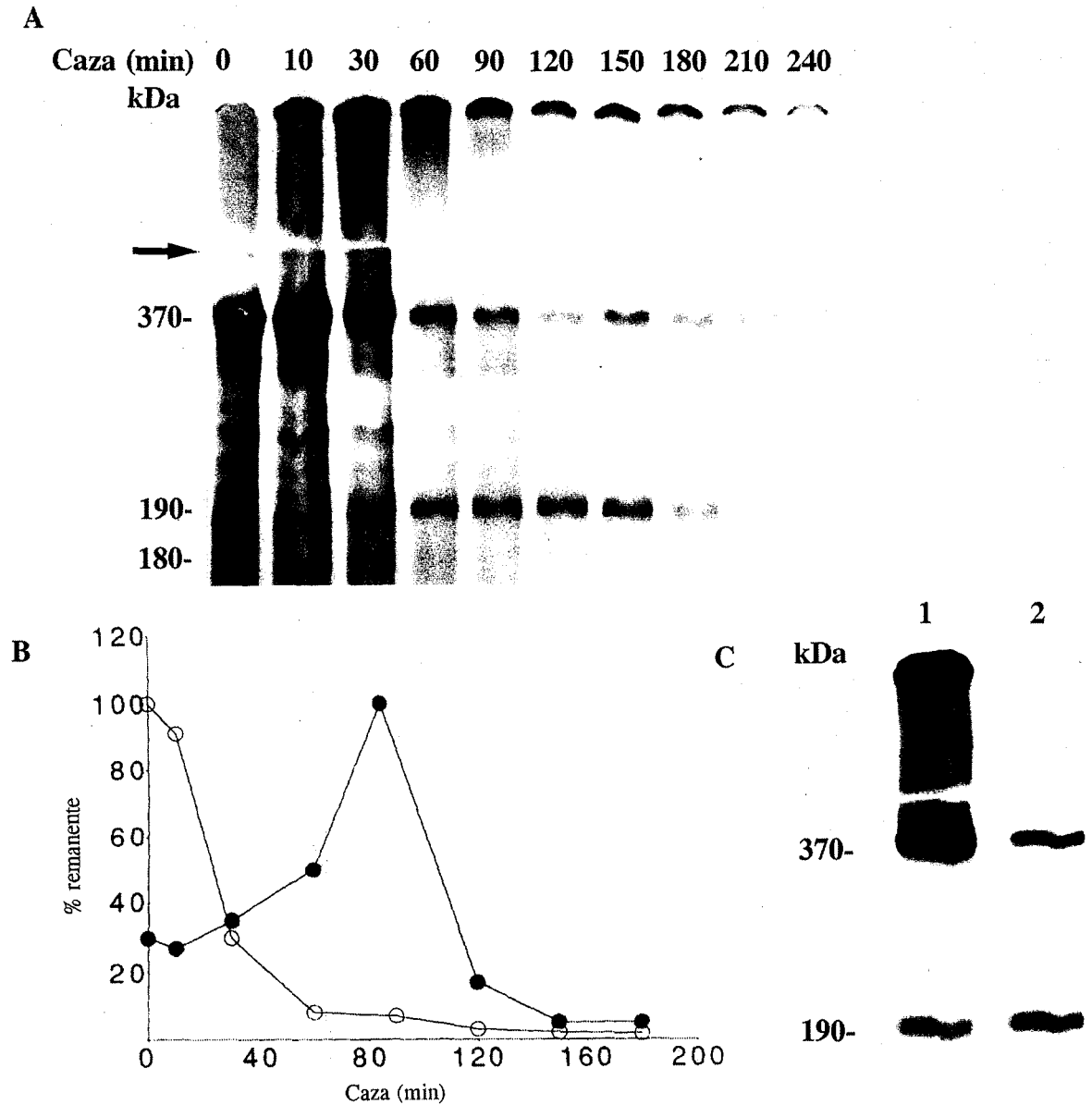


FIGURA 9.- Procesamiento biosintético de agregacán. Células (5×10^6 por muestra) fueron marcadas metabólicamente con Tran^{35}S -label durante 5 min y cazadas a 37°C en medio de caza durante los períodos de tiempo indicados. Las moléculas de agregacán, inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares, fueron sometidas a SDS-PAGE y posterior fluorografía. Las bandas correspondientes al precursor de 370 kDa (○) y al intermediario de 190 kDa (●) se localizaron en el fluorograma (A) y se cuantificaron por densitometría (B). La flecha indica el límite entre el gel concentrador y el separador. Los valores representados son el promedio de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje de la máxima cantidad de cada una de las formas moleculares encontradas dentro de la célula. (C) Células marcadas radiactivamente y cazadas durante 30 min fueron lisadas y las moléculas de agregacán inmunoprecipitadas digeridas (carril 2) o no (carril 1) con condroitinasa ABC previamente a su resolución por electroforesis en SDS-PAGE.

El precursor inicial, detectado tras el pulso radiactivo, se correspondió con una banda de M_r estimado en 370 kDa. Ello concuerda con estudios previos acerca de la biosíntesis de este proteoglicano (85). Comprobamos que, durante la caza, el precursor de 370 kDa disminuía paulatinamente hasta desaparecer, lo cual sucedió tras unas 2 horas aproximadamente. Calculamos una vida media de 25-29 minutos para esta forma molecular. Paralelamente a la desaparición del precursor de 370 kDa observamos la acumulación transitoria de una banda de muy alto peso molecular en la parte superior del gel. Con el fin de caracterizar esta otra forma molecular, sometimos los inmunoprecipitados a digestión con condroitinasa ABC con anterioridad a su resolución por SDS-PAGE (Fig. 9 C). Comprobamos que el precursor de 370 kDa no experimentó cambio alguno en su tamaño molecular tras la digestión con esta enzima, indicando la ausencia de cadenas de condroitín sulfato durante esta fase temprana de la biosíntesis. Por el contrario, el precursor de alto peso molecular que las células acumulan durante los primeros 30 minutos de caza fue sensible al tratamiento con condroitinasa ABC. De hecho, tras la digestión con esta enzima, el tamaño de la molécula descendió considerablemente, siendo entonces posible su entrada en el gel de resolución (Fig. 9 C, carril 2). Se trataba, por lo tanto, de una forma precursora ya modificada por las enzimas del Golgi y, posiblemente, en un estado próximo a su secreción al medio extracelular. Así pues, de acuerdo con estos resultados, la molécula de agregán se sintetiza inicialmente como un precursor de 370 kDa que, tras un extenso procesamiento en el CG, se transforma en una molécula de gran tamaño ($M_r > 10^6$). Teniendo en cuenta la cinética de secreción anteriormente comentada, el tiempo medio necesario para la síntesis, procesamiento y vertido al espacio extracelular de este proteoglicano sería de unos 30 minutos.

Otras formas moleculares reconocidas por el anticuerpo anti-agrecán

Además de las especies moleculares que acabamos de describir, el anticuerpo anti-agrecán inmunoprecipitó una proteína de 190 kDa cuya presencia en las células era también transitoria. Así, en los experimentos de marcaje metabólico, la banda de 190 kDa aumentó gradualmente durante los primeros 90 minutos de caza, para luego desaparecer bruscamente (Fig. 9 A). Los datos derivados de la cuantificación densitométrica de esta banda indicaron una vida media de 110 minutos (Fig. 9 B). Cabe destacar la aparición temprana de esta proteína, ya que fue detectada inmediatamente tras el pulso radiactivo de 5 minutos, aunque en pequeña cantidad.

Ocasionalmente detectamos otra banda de 180 kDa en los lisados procedentes de células radiomarcadas durante 5 minutos y posteriormente cazadas durante 10-30 minutos (Fig. 9 A). La irregularidad de esta observación, sin embargo, impidió un estudio más exhaustivo sobre la naturaleza de esta proteína.

Relación inmunológica de la proteína de 190 kDa con el precursor de 370 kDa

El reconocimiento de la proteína de 190 kDa por parte del anticuerpo anti-agrecán planteó el problema de considerar el parentesco de la misma con el precursor de 370 kDa. En primer lugar, intentamos descartar la posibilidad de que la relación entre ellas fuese meramente casual; por ejemplo, debida a la existencia de carbohidratados comunes reconocidos por el anticuerpo. Tratamos las células con tunicamicina, un agente inhibidor de la N-glicosilación, de forma que las glicoproteínas y proteoglicanos sintetizados no experimentasen la adición de oligosacáridos N-unidos. No obstante, el anticuerpo precipitó ambas formas moleculares, el precursor de 370 kDa y la

proteína de 190 kDa, las cuales debido a su naturaleza glicoproteica presentaron, en este caso, un tamaño inferior al habitual (Fig. 10, carril 2). Así pues, la reacción del anticuerpo con estas dos moléculas no se debe a la existencia de determinantes antigénicos compartidos de naturaleza carbohidratada.

Analizamos entonces la posibilidad de que ambas proteínas estuviesen estructuralmente relacionadas. Con tal fin, determinamos si la fracción del anticuerpo purificada por afinidad sobre la porción proteica de una de estas moléculas era capaz de reconocer a la otra y viceversa. Los lisados procedentes de células tratadas con tunicamicina fueron procesados para electroforesis en SDS-PAGE y las proteínas electrotransferidas a una membrana de PVDF. Incubamos el anticuerpo con fragmentos de PVDF con una u otra de las bandas proteicas en cuestión y, tras lavar, eluimos las inmunoglobulinas adsorbidas. De esta forma, obtuvimos dos preparaciones de anticuerpo altamente específicas: una contra el centro proteico de agregán (resultante de haber despojado el precursor de 370 kDa de sus oligosacáridos N-unidos) y la otra contra la porción proteica de la glicoproteína de 190 kDa. En ensayos de inmunoprecipitación de proteínas intracelulares totales ambas preparaciones reaccionaron con el precursor de 370 kDa y con la forma de 190 kDa (Fig. 11, carriles 2 y 3), independientemente de la banda proteica utilizada para su adsorción. Por tanto, los resultados corroboran la especificidad del anticuerpo utilizado y ponen de manifiesto la relación inmunológica existente entre la glicoproteína de 190 kDa y el precursor de agregán de 370 kDa.

Sensibilidad de la forma de 190 kDa al tratamiento con endoglicosidasa H

El tratamiento con tunicamicina evidenció el carácter de N-glicoproteínas de las dos especies moleculares estudiadas: el precursor de agregán de 370 kDa y la forma de

190 kDa, relacionada con él. En las células eucariotas el procesamiento de los oligosacáridos N-unidos se realiza de forma secuencial a lo largo de la ruta exocítica (6). Es posible, por ello, determinar la localización subcelular de una determinada glicoproteína en base a las modificaciones experimentadas por sus oligosacáridos. Así, durante su permanencia en el RE, los oligosacáridos N-unidos son sensibles a la digestión con endoglicosidasa H, en tanto que adquieren resistencia a este tratamiento después de ser modificados por las enzimas situadas en compartimentos distales del Golgi (86). Por el contrario, las glicoproteínas son inicialmente resistentes a la digestión con endoglicosidasa D y, al ser transportadas hasta el CG, se hacen temporalmente sensibles al tratamiento (86). Examinamos la sensibilidad a estas dos endoglicosidasas de las proteínas radiactivamente marcadas e inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-agrecán. Tanto el precursor de agreacán de 370 kDa como la glicoproteína de 190 kDa fueron sensibles al tratamiento con endoglicosidasa H (Fig. 12, carril 3), pero resistentes al tratamiento con endoglicosidasa D (Fig. 12, carril 2). Así pues, ambas especies moleculares mostraron características propias de precursores de glicoproteínas que no han experimentado aún las modificaciones oligosacarídicas propias del CG.

Detección de formas moleculares relacionadas con agreacán en fracciones subcelulares

Con el fin de precisar la localización intracelular relativa de la forma de 190 kDa y el precursor de agreacán de 370 kDa analizamos la presencia de ambas moléculas en las distintas fracciones celulares resultantes del subfraccionamiento de condrocitos (Fig. 13). Las células fueron marcadas radiactivamente, homogeneizadas y sus membranas fraccionadas en un gradiente discontinuo de sacarosa. En base al contenido en ARN y actividad p-nitrofenil- α -manosidasa de cada fracción (Fig. 13 A), determinamos la

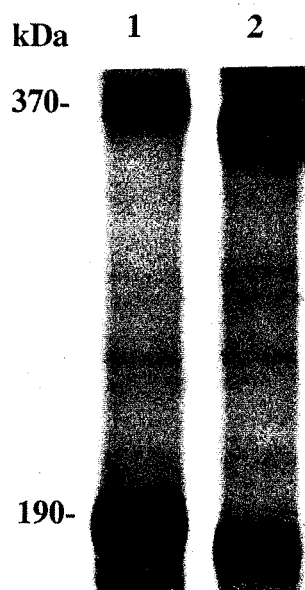


FIGURA 10.- Inmunoprecipitación de moléculas relacionadas con agregán a partir de células tratadas con tunicamicina. Células tratadas (carril 2) o no (carril 1) con 5 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina durante 16 h fueron marcadas radiactivamente con $\text{Trans}^{35}\text{S}$ -label durante 5 min e incubadas 90 min en medio de caza. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados y sometidos a electroforesis en SDS-PAGE.

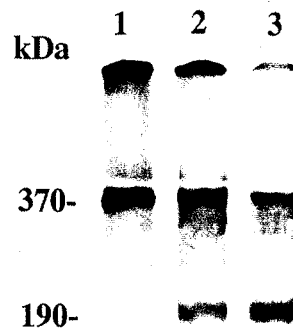


FIGURA 11.- Relación inmunológica de p190 con el precursor de agregán de 370 kDa. Condrocitos marcados radiactivamente durante 1 h con 100 μ Ci/ml de Trans³⁵S-label fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-agrecán previamente adsorbido al precursor de 370 kDa sin glicosilar (carril 2) o a la forma no glicosilada de p190 (carril 3). Carril 1, inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-agrecán de un lisado de condrocitos marcados radiactivamente con un pulso de cinco min. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y posterior fluorografía.

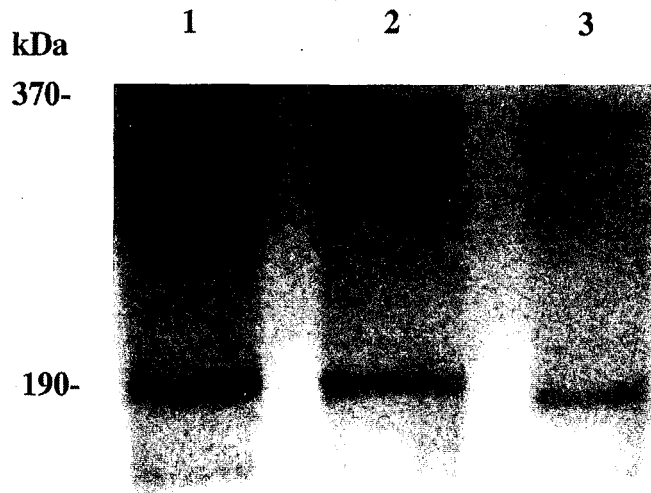


FIGURA 12.- Sensibilidad de las moléculas relacionadas con agregación al tratamiento con endoglicosidasas. Células (1×10^6 por muestra) marcadas radiactivamente durante 30 min con $100 \mu\text{Ci/ml}$ de Tran^{35}S -label fueron lisadas y las moléculas relacionadas con agregación inmunoprecipitadas y digeridas con endoglicosidasa H (carril 3) o D (carril 2). Los productos de esta digestión así como un control sin digerir (carril 1) fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE y posterior fluorografía.

distribución, a través del gradiente, de los microsomas rugosos (fracciones 2-4) y lisos (fracciones 5-8) respetivamente. El precursor de 370 kDa apareció concentrado en las fracciones 2-4 (densidad específica, 1.24-1.17 g/ml) (Fig. 13, B). Esta fue también la localización predominante de la glicoproteína de 190 kDa. Así pues, los datos de subfraccionamiento celular indicaron que ambas moléculas se encontraban acumuladas en el RE de los condrocitos.

Concentración de la forma de 190 kDa en una subregión del RE

A pesar de su localización conjunta en el RE, los precursores de 370 kDa y la glicoproteína de 190 kDa podrían estar segregados en el interior del orgánulo. Para examinar esta posibilidad modificamos el protocolo de subfraccionamiento de forma que fuese posible evidenciar la existencia de subcompartimentos en el RE. Los microsomas totales fueron incubados con EDTA a fin de inducir la disociación de los ribosomas normalmente asociados a las membranas del RE rugoso (80). Tras este tratamiento fraccionamos los microsomas en el gradiente habitual (Fig. 14). Comprobamos que parte del RE adquiría entonces una menor densidad y, por consiguiente, se localizaba en fracciones más ligeras del gradiente. Así, el precursor de 370 kDa, que con anterioridad a la incubación con EDTA se hallaba concentrado en las fracciones 2-4, después de este tratamiento se localizó además en las fracciones 5-6. Por el contrario, la glicoproteína de 190 kDa permaneció acumulada en la región más densa del gradiente (fracciones 2-4). Este resultado nos hizo pensar que la distribución de ambas moléculas en el RE no era exactamente idéntica. Concretamente, las membranas que contenían la glicoproteína de 190 kDa no experimentaron cambio de densidad tras el tratamiento con EDTA (Fig. 14). Ello podría interpretarse como la evidencia de que se trataba de una parte del RE rugoso especialmente resistente a la extracción de sus

ribosomas o, por el contrario, de un subcompartimento liso con elevada densidad de flotación.

Caracterización de las vesículas fluorescentes teñidas con el anticuerpo anti-agrecán

La detección intracelular de agrecán mediante inmunofluorescencia indirecta había indicado la existencia de acúmulos de precursores de este proteoglicano, distribuidos por el citoplasma periférico en forma de una serie de “vesículas” fluorescentes discretas. Llevamos a cabo experimentos de inmunofluorescencia de doble marcaje con la finalidad de identificar la localización intracelular de tales acúmulos. El área perinuclear, también teñida con el anticuerpo anti-agrecán, fue reconocida por un anticuerpo monoclonal dirigido contra las cadenas del glicosaminoglicano keratán sulfato (Fig. 15, a-a'). Confirmamos, de este modo, la presencia de precursores de agrecán en el CG pues está establecido que en este orgánulo tiene lugar la incorporación de keratán sulfato al centro proteico de los proteoglicanos (83). Cabe destacar la ausencia de tinción para este glicosaminoglicano a nivel de los acúmulos citoplásmicos antes comentados, los cuales no formarían por tanto parte del Golgi.

La distribución, forma y tamaño de las “vesículas” fluorescentes teñidas con el anticuerpo anti-agrecán podrían hacer pensar en una subpoblación de endosomas, lisosomas o ambos. Por tal motivo, antes de la fijación y procesamiento para inmunofluorescencia, las células fueron incubadas a 37°C con complejos rodamina-ovoalbúmina. Tras ser endocitado, este compuesto accedió al interior de los endosomas y lisosomas, los cuales quedaron marcados fluorescentemente. Sin embargo, ninguna de estas estructuras coincidió con las teñidas con el anticuerpo anti-agrecán (Fig. 15, b-b').

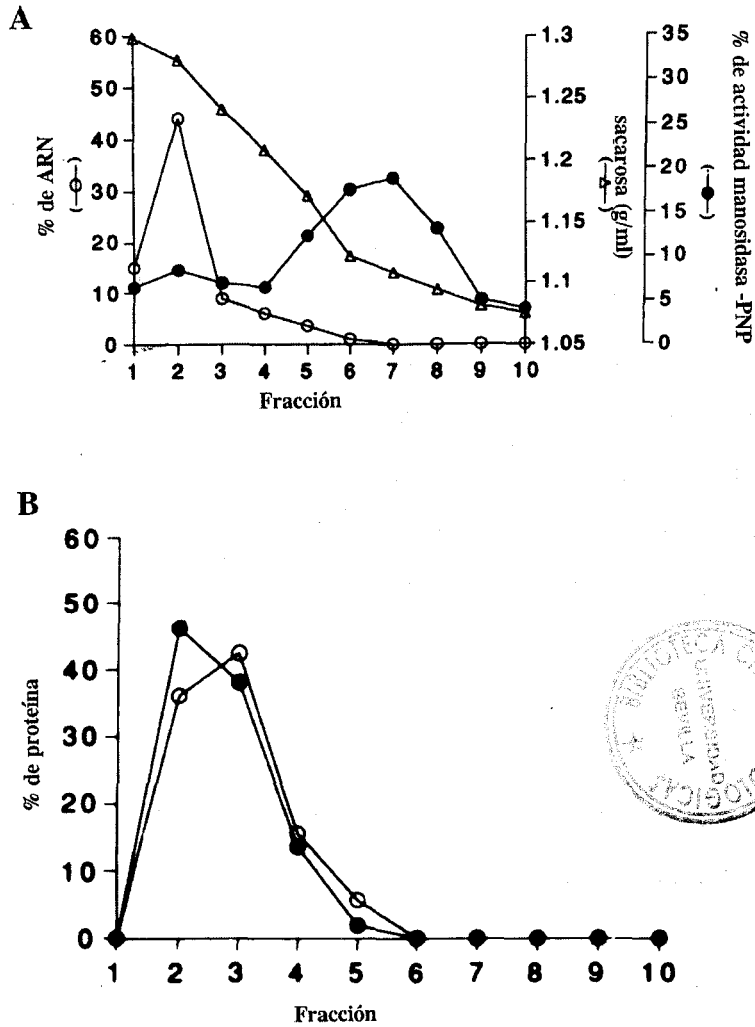


FIGURA 13.- Localización de moléculas relacionadas con agregación por fraccionamiento subcelular. Microsomas obtenidos a partir de células marcadas radiactivamente fueron fraccionados en gradiente discontinuo de sacarosa y cada fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-agregación. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y fluorografía. Las bandas correspondientes a las moléculas de agregación se cuantificaron por densitometría. (A) Distribución de ARN (-○-), actividad para-nitrofenil- α -manosidasa (-●-) y densidad de las fracciones (-Δ-) en el gradiente discontinuo de sacarosa. (B) Distribución a través del gradiente del precursor de 370 kDa (-○-) y de la especie de 190 kDa (-●-) representadas como porcentaje de la cantidad total de las bandas de una u otra forma molecular.

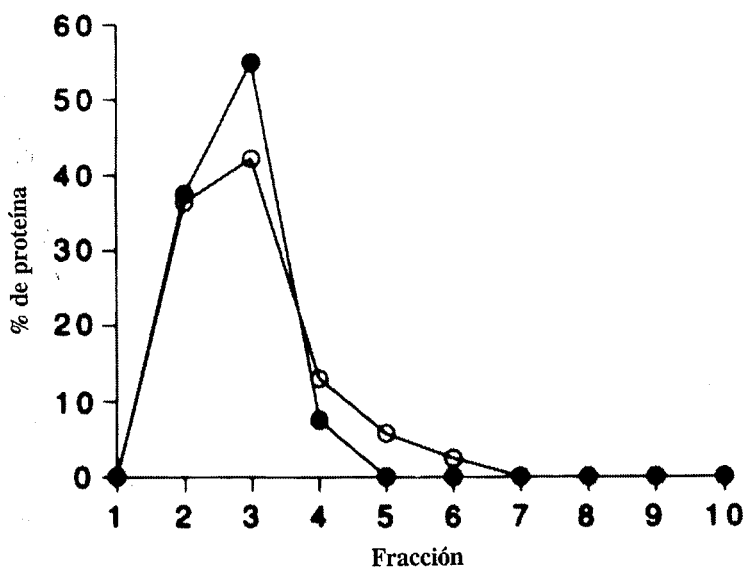


FIGURA 14.- Detección de las formas moleculares relacionadas con agregán en fracciones microsomaes previamente tratadas con EDTA. Microsomas obtenidos a partir de condrocitos marcados radiactivamente fueron incubados con EDTA 25mM antes de su fraccionamiento en un gradiente discontinuo de sacarosa. Los inmunoprecipitados procedentes de cada fracción fueron resueltos por electroforesis en SDS-PAGE. Las bandas correspondientes a las moléculas de agregán se detectaron por fluorografía y fueron cuantificadas por densitometría. La distribución a través del gradiente tanto del precursor de 370 kDa (-○-) como de la forma de 190 kDa (-●-) se muestra como porcentaje de la cantidad total de las bandas de una u otra forma molecular recuperadas del gradiente.

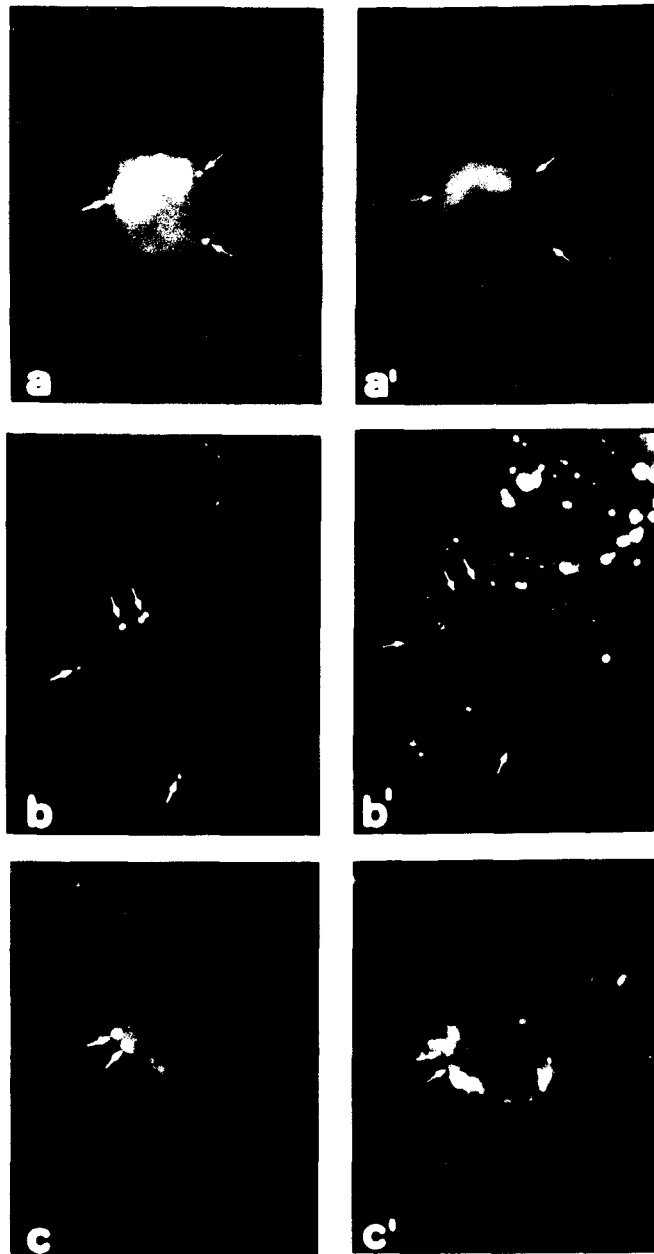


FIGURA 15.- Caracterización de las vesículas fluorescentes teñidas con el anticuerpo anti-agrecán. Condrocitos cultivados en monocapa fueron fijados y doblemente marcados para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-agrecán (a,b,c), anti-keratán sulfato (a') o anti-KDEL (c'). Las células en b-b' fueron incubadas durante 3 h a 37°C en medio mínimo con 600 µg/ml de ovoalbúmina-rodamina. Posteriormente fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con anti-agrecán (b) para comparar la distribución intracelular de las moléculas de agrecán con las de ovoalbúmina-rodamina endocitadas (b'). Las flechas en cada par de figuras indican la localización de los subcompartimentos del RE que contienen los precursores de agrecán. Aumento: X 400.

Finalmente, realizamos una doble tinción para inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-agrecán y un anticuerpo monoclonal contra la secuencia KDEL. Utilizamos este último anticuerpo con el fin de teñir las cisternas del RE, dado que la secuencia KDEL se halla presente en el extremo COOH-terminal de muchas proteínas residentes en el lumen de este orgánulo, funcionando como señal de retención para este tipo de moléculas (51). En principio, la tinción para KDEL no tendría que coincidir con las “vesículas” citoplásmicas que contenían precursores de agrecán. De hecho, el modelo reticular de tinción obtenido con el anticuerpo anti-KDEL, bastante similar al descrito para otros marcadores de RE (50), no permitía presuponer ningún tipo de solapamiento. Sin embargo, como puede apreciarse en la Fig. 15, c-c', a nivel de las “vesículas” hubo una perfecta colocación de los anticuerpos anti-agrecán y anti-KDEL. Dedujimos, por tanto, que los acúmulos de precursores de agrecán distribuidos por el citoplasma periférico se correspondían con áreas o subregiones del RE.

Identificación de las subregiones del retículo que contienen gp190

Los resultados obtenidos del subfraccionamiento celular indicaron que la glicoproteína de 190 kDa, relacionada con agrecán, se hallaba acumulada en una subregión del RE (Figs. 13 y 14). Por otro lado, los datos de inmunofluorescencia mostraron la concentración de moléculas reactivas con el anticuerpo anti-agrecán en zonas concretas del RE (Fig. 15). Quisimos averiguar si se trataba o no del mismo subcompartimento del RE. Para ello, tratamos las células con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas. Tras una incubación de dos horas con este agente, los condrocitos procesados para inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-agrecán no mostraron reacción del área perinuclear. Sin embargo, la tinción permaneció a nivel de las “vesículas” periféricas (Fig. 16, a-b). Así pues, en condiciones control, la tinción del

área de Golgi pondría de manifiesto la existencia de una población en tránsito de precursores de agregán que son secretados constantemente al medio extracelular. El tratamiento con cicloheximida detiene la síntesis de agregán, por ello, la tinción para este proteoglicano desaparece del orgánulo. Por el contrario, las subregiones del RE, identificadas como “vesículas” periféricas, deberían contener moléculas de vida media prolongada, puesto que continúan estando presentes en tales zonas después de 2 horas de incubación con cicloheximida.

Dado que después del tratamiento con cicloheximida aún permanecían retenidas en el interior de los condrocitos moléculas reactivas con el anticuerpo anti-agregán, decidimos identificar estas proteínas. Las células fueron marcadas radiactivamente con Tran³⁵S-label e incubadas durante 2 horas con cicloheximida. Al someter a subfraccionamiento los condrocitos así tratados, detectamos solamente la glicoproteína de 190 kDa en las fracciones de alta densidad del gradiente mientras que el precursor de 370 kDa no fue observado en ninguna de las fracciones (Fig. 17). Se trata, por tanto, de una subregión especializada del RE que, bien intrínsecamente o debido al confinamiento de las moléculas de 190 kDa contenidas, exhibe una alta densidad específica (1.24-1.17 g/ml). Este resultado explica la permanencia de la tinción para agregán tras el tratamiento con cicloheximida, puesto que la forma de 190 kDa tiene una vida media de unos 110 minutos (Fig. 9 B). Es más, identifica esta molécula con los precursores de agregán concentrados en los subcompartimentos del RE (“vesículas”) detectados por inmunofluorescencia (Fig. 15).

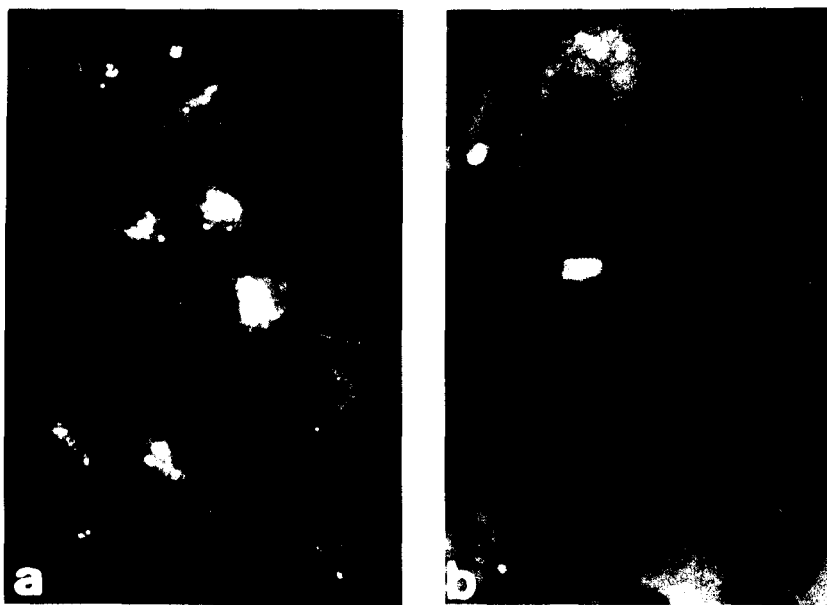


FIGURA 16.- Efecto del tratamiento con cicloheximida sobre la localización intracelular de moléculas relacionadas con agregán. Condrocitos cultivados en monocapa fueron incubados durante 2 h a 37°C en ausencia (a) o en presencia (b) de 100 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida con anterioridad a su fijación y procesamiento para inmunofluorescencia indirecta. Obsérvese la permanencia de la tinción en vesículas periféricas de las células tratadas con cicloheximida y la ausencia de marca fluorescente a nivel del complejo de Golgi. Aumento: X 350.

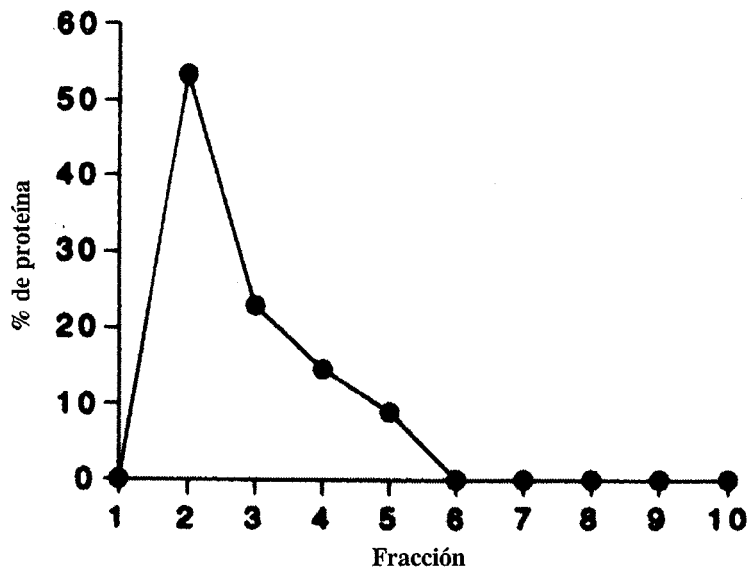


FIGURA 17.- Detección de p190 en fracciones microsomales de condrocitos tratados con cicloheximida. Condrocitos marcados radiactivamente fueron incubados durante 2 h con 100 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida en medio de cultivo normal. Los microsomas obtenidos a partir de ellos fueron fraccionados en gradiente discontinuo de sacarosa y cada fracción se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-agrecán. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE y fluorografía y las bandas correspondientes a las moléculas de agreacán se cuantificaron por densitometría. La distribución a través del gradiente de la forma de 190 kDa (-●-) se expresa como el porcentaje que cada fracción representa sobre el total de las bandas de 190 kDa de todas las fracciones.

Degradación del precursor de agregán de 370 kDa

Los resultados comentados hasta ahora indicaban que una glicoproteína intracelular de 190 kDa, relacionada inmunológicamente con el centro proteico del proteoglicano agregán, se hallaba concentrada en una subregión particular del RE de condrocitos. En principio, la significación funcional de este hallazgo no era evidente. Sin embargo, los datos que anteriormente comentamos sobre la biosíntesis de agregán mostraban que, en condiciones normales, no todas las moléculas del centro proteico inicialmente sintetizadas lograban ser procesadas adecuadamente y transformadas en proteoglicanos maduros. Medimos la radiactividad incorporada en el precursor de 370 kDa durante un pulso de 5 minutos y comparamos este valor con la radiactividad recogida posteriormente del medio de cultivo, en forma de proteoglicanos secretados, durante un período de caza de 3 horas. Los datos obtenidos a partir de 4 experimentos indicaron que únicamente el 73-75% de la radiactividad inicialmente presente en el precursor de 370 kDa fue recogida en los monómeros de agregán secretados. Esto significa que el 25-27% de los precursores son retenidos intracelularmente. Puesto que al cabo de tres horas de caza no suelen quedar copias del precursor de 370 kDa en el interior de las células (Fig. 9), es de suponer que, durante este tiempo, las moléculas retenidas experimentarían degradación. Así pues, además del procesamiento biosintético seguido por la mayoría de los precursores de agregán, hay que considerar también el fenómeno de degradación intracelular que afectaría a una fracción importante de estas moléculas.

La forma de 190 kDa es un producto de degradación del precursor de 370 kDa

Teniendo en cuenta la degradación experimentada por parte de los precursores de 370 kDa de agregán, examinamos la posibilidad de que la forma de 190 kDa fuese un producto de tal proceso dado que esta especie molecular existe en las células durante un tiempo limitado (Fig. 9), aumentando temporalmente su concentración. Intentamos, por ello, bloquear la degradación intracelular de agregán con el fin de determinar si ello afectaba o no a la aparición de la especie de 190 kDa. Las células fueron marcadas radiactivamente durante 5 minutos y después cazadas en presencia de inhibidores de proteasas de especificidad conocida. La incubación se realizó durante 90 minutos dado que, en condiciones control, es el tiempo de mayor acumulación de la forma de 190 kDa. Después, las células fueron lisadas y las proteínas relacionadas con agregán inmunoprecipitadas y separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE (Fig. 18). Simultáneamente, inmunoprecipitamos los proteoglicanos extracelulares y determinamos el efecto global sobre la secreción de agregán de cada uno de los compuestos inhibidores utilizados (Tabla I). A fin de cuantificar el efecto inhibitor calculamos el porcentaje de la forma de 190 kDa con respecto al total de moléculas de agregán intracelulares. Consideramos que un compuesto inhibió la degradación intracelular de agregán cuando, sin afectar significativamente su secreción, dió lugar a una disminución en el porcentaje de las formas de 190 kDa en comparación con las células control no tratadas. De acuerdo con este criterio, los inhibidores de proteasas de serina y cisteína como PMSF y leupeptina fueron los más eficaces en inhibir el proceso de degradación (Fig. 18). En comparación con las células control, el tratamiento con alguno de estos agentes ocasionó la acumulación del precursor de agregán de 370 kDa y, por consiguiente, la disminución de la forma de 190 kDa (Fig. 18). Puesto que ambos inhibidores no afectaron significativamente la secreción de agregán al medio de cultivo (Tabla I), dedujimos que se trataba de un efecto selectivo sobre la maquinaria enzimática responsable de la

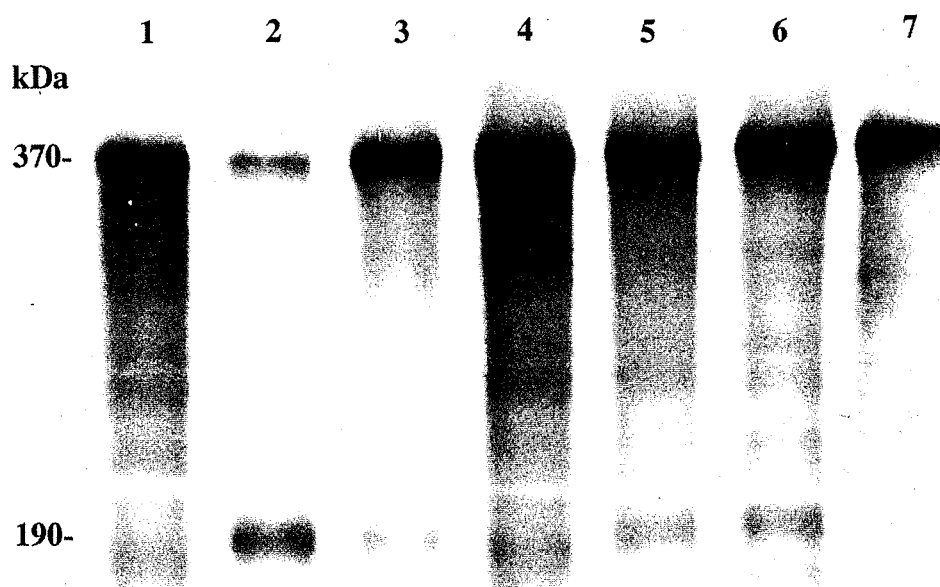


FIGURA 18.- Efecto de inhibidores de proteasas sobre la degradación intracelular del precursor de agregán. Células sometidas a un pulso radiactivo de 5 min (carril 1) fueron incubadas durante 90 min a 37°C en medio de caza que contenía PMSF 1 mM (carril 3), TPCK 20 μ M (carril 4), ALLM 200 μ g/ml (carril 5), ALLN 200 μ g/ml (carril 6) o leupeptina 200 μ g/ml (carril 7). El carril 2 corresponde a células cazadas en medio sin ninguna droga. Los inmunoprecipitados de moléculas intracelulares relacionadas con agregán se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE para su posterior autorradiografía y cuantificación.

TABLA I. Efecto de diferentes inhibidores de proteasa sobre la secreción y degradación en el RE de los precursores de agregán. Condrocitos marcados radiactivamente durante cinco minutos con Tran³⁵S-label, fueron incubados durante 90 minutos a 37° C en medio de caza con cada uno de los inhibidores de proteasa indicados. Los inmunoprecipitados de los lisados de las células (5×10^6 /muestra) fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE cargando el mismo número de cpm en cada carril. Las bandas de 190 kDa y 370 kDa fueron cuantificadas por densitometría. Los inmunoprecipitados del medio de cultivo así como la banda de 370 kDa correspondiente al pulso se cuantificaron por centelleo líquido. Los datos que se muestran representan un promedio de tres experimentos independientes.

	% de retención ^a	% de inhibición de degradación ^b
Control ^c	27	0
EDTA (5mM)	42	11.32
Fosforamidón (200 µg/ml)	34.7	14.3
Aprotinina (20 µg/ml)	30	0
PMSF (1mM)	30	45
Leupeptina (200 µg/ml)	33.3	53.1
TLCK (100 µM)	62.2	62.8
TLCK (20 µM)	64.8	35.3
Antipain (200 µg/ml)	34.2	15.5
ALLM (200 µg/ml)	49	13.5
ALLN (200 µg/ml)	22	3
Quimostatina (200 µg/ml)	37.4	11.7
Pepstatina A (200 µg/ml)	38.8	10.4
Bestatina (200 µg/ml)	27.2	0

^aEl porcentaje de retención en la secreción fue calculado como la razón entre la cantidad de agregán secretado al medio extracelular durante la caza y la cantidad de precursor de 370 kDa sintetizado durante el pulso:

$$\% \text{ de retención} = \frac{\text{agregán secretado al medio (cpm)}}{\text{precursor de 370 kDa del pulso (cpm)}} \times 100$$

^bEl porcentaje de degradación fue calculado como la razón entre la forma de 190 kDa y el total de moléculas de agregán de 370 kDa y 190 kDa. El porcentaje de inhibición de la degradación del agregán se determinó por sustracción entre los porcentajes de degradación del control y de cada tratamiento. Se corrigieron previamente los valores del precursor de 370 kDa debido a la acumulación intracelular de estas moléculas producidas por las drogas utilizadas en cada tratamiento.

$$\% \text{ de degradación} = \frac{p190}{p190+p370} \times 100$$

^c“Control” equivale a células que no recibieron ningún tratamiento.

degradación. No tomamos en cuenta, en cambio, el efecto producido por los inhibidores de proteasas de serina TLCK y TPCK, dado que estos tratamientos también disminuyeron la actividad secretora (Tabla I). Así pues, la especie molecular de 190 kDa se originaría a partir del precursor de agregán de 370 kDa, mediante un proceso degradativo sensible al tratamiento con leupeptina o PMSF.

Con el fin de comprobar que se trataba de una reacción proteolítica catalizada por enzimas específicas, analizamos los efectos derivados de la incubación con otros inhibidores de proteasas. No afectaron la degradación intracelular de agregán compuestos que, como el fosforamidón o EDTA, funcionan como inhibidores de metaloproteasas, o los péptidos ALLM y ALLN que inhiben a las proteasas de cisteína, el inhibidor de aminopeptidasa llamado bestatina, los inhibidores de proteasas ácidas quimostatina y pepstatina A y tampoco el inhibidor de catepsinas A y B conocido como antipain (Fig. 18 y Tabla I). Por otro lado, el tratamiento con PMSF o leupeptina provocó un grado de inhibición del orden del 50%, si bien se necesitaron concentraciones 2 ó 3 veces menores de este último inhibidor.

La degradación del precursor de agregán de 370 kDa tiene lugar en el RE

Los resultados anteriores demuestran que la molécula de 190 kDa, que normalmente se localiza en una subregión del RE, es un producto proteolítico derivado de la degradación del precursor de agregán de 370 kDa. Sin embargo, el proceso podría tener lugar en un orgánulo diferente, de forma que el compartimento del retículo fuese únicamente el lugar de acumulación del fragmento proteolítico resultante. En las células animales la degradación intracelular de proteínas ocurre, fundamentalmente, en dos localizaciones: el citosol y el sistema de endosomas y lisosomas. Tratándose de una

proteína no citosólica, era lógico suponer que en su degradación participasen las enzimas lisosomales. Por ello, examinamos la posibilidad de que una inhibición de la función de estos orgánulos afectase la degradación de los precursores de agregán. Tras un pulso radiactivo las células fueron cazadas en presencia de bases débiles, como NH_4Cl o cloroquina, o el ionóforo monensina. Se sabe que estos agentes, por mecanismos diferentes, elevan el pH interior de endosomas y lisosomas, anulando su función (69). Ninguno de estos tratamientos abolió por completo la degradación del precursor de 370 kDa, a juzgar por la cantidad de glicoproteína de 190 kDa generada (Fig. 19 A y Tabla II). No obstante, en estas condiciones, hubo también acumulación del precursor de 370 kDa. Puesto que estos compuestos afectaron la secreción de agregán (Tabla II), es probable que la retención del precursor de 370 kDa se debiese a un bloqueo en el transporte de esta molécula a través del CG. Dado que ninguno de los agentes lisosomotrópicos afectó la aparición del intermediario de degradación de 190 kDa, consideramos que la reacción proteolítica no tendría lugar en endosomas y lisosomas.

Un paso más en la identificación del orgánulo degradativo consistió en el uso de la droga conocida como brefeldina A. La exposición de las células a brefeldina A ocasiona la desorganización del CG y su redistribución al RE (87). Aunque la síntesis de proteínas no se ve afectada, las moléculas sintetizadas permanecen retenidas en el retículo, incapaces de abandonarlo al estar bloqueada la ruta exocítica. Como era de esperar, el tratamiento con brefeldina A inhibió la secreción de agregán al medio extracelular e indujo acumulación del precursor de 370 kDa. Sin embargo, no afectó su degradación, pues las células tratadas continuaron produciendo el intermediario de 190 kDa (Fig. 19 B). Este resultado indica que la degradación de los precursores de agregán no requiere un CG funcional y, por tanto, ocurriría en un orgánulo anterior en la vía secretora, probablemente en el RE.

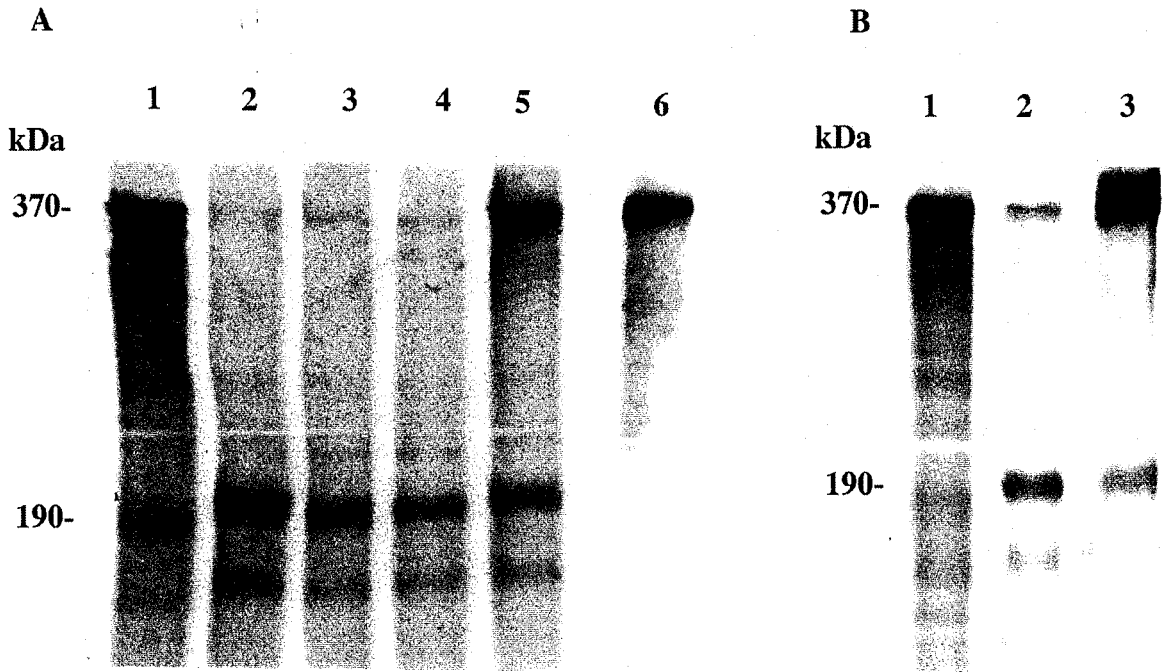


FIGURA 19.- Influencia de agentes lisosomotrópicos sobre la degradación intracelular de los precursores de agregán. (A) Células marcadas radiactivamente durante 5 min (carril 1) se incubaron a 37°C durante 90 min en medio de caza normal (carril 2) o con NH_4Cl 50 mM (carril 3), cloroquina 100 μM (carril 4) o monensina 100 μM (carril 5). Como control positivo de inhibición de la degradación se utilizaron células cazadas en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina (carril 6). Los inmunoprecipitados de moléculas intracelulares de agregán se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE, fluorografía y cuantificación por densitometría. (B) Condrocitos marcados radiactivamente del mismo modo que en (A) fueron incubados durante 90 min en ausencia (carril 2) o presencia de brefeldina A (carril 3). Los inmunoprecipitados obtenidos a partir de lisados celulares fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE y posterior fluorografía. El carril 1 corresponde al inmunoprecipitado de lisados de células control tras un pulso de 5 min.

TABLA II. Efecto de distintos tratamientos sobre la degradación de precursores de agregón en el RE. Células marcadas radiactivamente con Tran³⁵S-label fueron incubados a 37°C durante 90 minutos en medio suplementado con los compuestos indicados. Las moléculas de agregón extracelulares fueron inmunoprecipitadas del medio y cuantificadas por centelleo líquido. Las moléculas intracelulares relacionadas con agregón fueron inmunoprecipitadas, sometidas a electroforesis en SDS-PAGE, y cuantificadas por densitometría de los fluorogramas. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

	% de retención	% de inhibición de la degradación
Control ^a	26	0
Inhibición del transporte RE a Golgi		
Brefeldina A (2 µg/ml)	94.6	4
Monensina (100 µM)	56	27
Inhibición de la degradación lisosomal		
NH ₄ Cl (50 mM)	71.5	13.4
Cloroquina (100 µM)	43	7

^a"Control" equivale a células que no recibieron ningún tratamiento.

Características del proceso degradativo

Tomando como índice de la degradación de precursores de agregán la producción del intermediario de 190 kDa, intentamos determinar las condiciones que hacen posible este proceso en la célula. Los condrocitos fueron marcados con un pulso de 5 minutos de Tran³⁵S-label y luego cazados bajo diferentes condiciones de incubación. Cuantificamos la secreción de agregán a partir de los monómeros inmunoprecipitados del medio de cultivo, calculando de esta forma la retención ocasionada en cada caso. Este dato nos permitió corregir la cantidad del precursor de 370 kDa presente en el interior de las células, de forma que la relación p190/p370 se correspondiese con la actividad proteolítica. Los resultados obtenidos en la Fig. 20 se hallan cuantificados en la Tabla III.

La degradación fue dependiente de temperatura fisiológica, puesto que las células incubadas a 15°C ó 20°C mostraron menor proporción de la forma de 190 kDa que las células mantenidas a 37°C. En cambio, comprobamos que el proceso se llevaba a cabo sin requerimiento de ATP, dado que los tratamientos con azida sódica y fluoruro sódico no tuvieron efecto sobre la degradación. Como comentamos anteriormente, la cicloheximida no inhibió la producción del intermediario de 190 kDa, lo cual nos permitió aislar el subcompartimento del retículo en el cual se halla concentrado (Fig. 17). Sin embargo, los pasos siguientes en la degradación de esta molécula podrían requerir síntesis de proteínas. Así, en las células tratadas con cicloheximida el intermediario de 190 kDa permaneció intacto durante tiempos de caza muy prolongados (3-4 horas) (datos no mostrados).

Puesto que la degradación parecía ocurrir en el RE, estudiamos la influencia ejercida por las condiciones iónicas imperantes en este orgánulo. Analizamos para ello los efectos derivados de un cambio en la concentración de Ca²⁺ existente en el lumen del

retículo. La incubación con el ionóforo para el Ca^{2+} A23187 disminuyó cinco veces la tasa de degradación, medida como velocidad de aparición del intermediario de 190 kDa (Fig. 21). Hay que destacar que este tratamiento incrementó la secreción al medio de monómeros de agregán en aproximadamente un 10% en comparación con las células no tratadas. Por otro lado, el estado redox del lumen del retículo parece influir de forma relevante sobre la degradación de precursores de agregán. Así, el proceso fue estimulado por el agente reductor DTT e inhibido parcialmente por diamida, un oxidante de grupos tiol (Fig. 22). Estos dos compuestos afectaron de forma similar la secreción de agregán causando sólo una pequeña retención intracelular (33% en comparación con el 26% de las células control).

La degradación del precursor de 370 kDa ocurre en el subcompartimento del RE

Los cambios en la velocidad de degradación del precursor de 370 kDa dieron lugar a variaciones interesantes en el número de subcompartimentos del retículo detectados por inmunofluorescencia. Así, cuando examinamos la distribución de precursores de agregán tras algunos de los tratamientos anteriores comprobamos que la cantidad de “vesículas” fluorescentes por célula guardaba relación, en cada caso, con el efecto bioquímico observado (Fig. 23). Por ejemplo, en aquellas condiciones en que el proceso degradativo se hallaba inhibido o su velocidad disminuida los condrocitos mostraron un aumento significativo en el número de subcompartimentos. Ello fue especialmente evidente tras la incubación con el inhibidor de proteasas de serina-cisteína leupeptina que, tal como indicamos, bloqueó la degradación del precursor de 370 kDa. Las células expuestas a leupeptina presentaron una gran abundancia de “vesículas” fluorescentes indicativas de subcompartimentos del retículo (Fig. 23, d). En cambio, las células tratadas con inhibidores de proteasas que no afectan el proceso, como ALLN, mostraron un número de subcompartimentos similar al de las células control (Fig. 23, c).

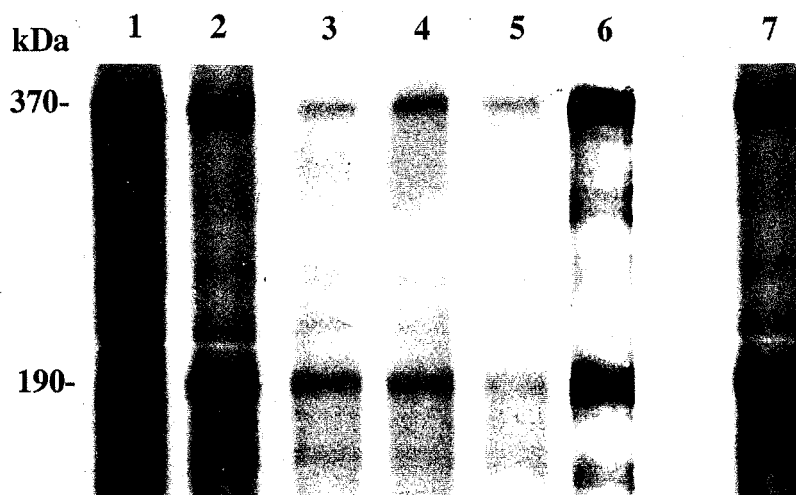


FIGURA 20.- Influencia de la temperatura, ATP y síntesis de proteínas sobre la degradación del precursor de agregación. Células marcadas radiactivamente durante 5 min (carril 1) se incubaron durante 90 min a 37°C en medio de caza que contenía azida sódica 20 mM/NaF 5 mM (carril 3), azida sódica 40 mM/NaF 10 mM (carril 4) o en ausencia de estos compuestos (carril 2). Las muestras del carril 5 corresponden a células incubadas a 20°C durante 90 min en medio de caza habitual mientras que las del carril 6 fueron incubadas a 15°C durante el mismo tiempo. Las muestras del carril 7 provienen de células tratadas durante 90 min con 100 µg/ml de cicloheximida. Los lisados intracelulares fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-agregación y sometidos a electroforesis en SDS-PAGE y fluorografía. La cuantificación de las bandas fue llevada a cabo por densitometría.

TABLA III. Cuantificación del efecto de la temperatura, inhibición de la síntesis de ATP y proteínas sobre la degradación de precursores de agregán en el RE. Células marcadas radiactivamente con Tran³⁵S-label fueron incubados a 37°C durante 90 minutos en medio suplementado con los compuestos indicados o bien en medio normal pero a menor temperatura (15°C ó 20°C). Las moléculas de agregán extracelular se inmunoprecipitaron del medio y se cuantificaron por centelleo líquido. Las moléculas intracelulares relacionadas con agregán fueron inmunoprecipitadas, sometidas a electroforesis en SDS-PAGE, y cuantificadas por densitometría de los fluorogramas. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

	% de retención	% de inhibición de la degradación
Control ^a	26	0
Tratamiento de reducción de energía		
NaN ₃ 20 mM + 5 mM NaF	3.5	0
NaN ₃ 40 mM + 10 mM NaF	30	0
Incubación a baja temperatura		
15°C	70	35
20°C	44	37
Inhibición de la síntesis proteica		
Cicloheximida (100 µg/ml)	23	21

^a"Control" equivale a células que no recibieron ningún tratamiento.

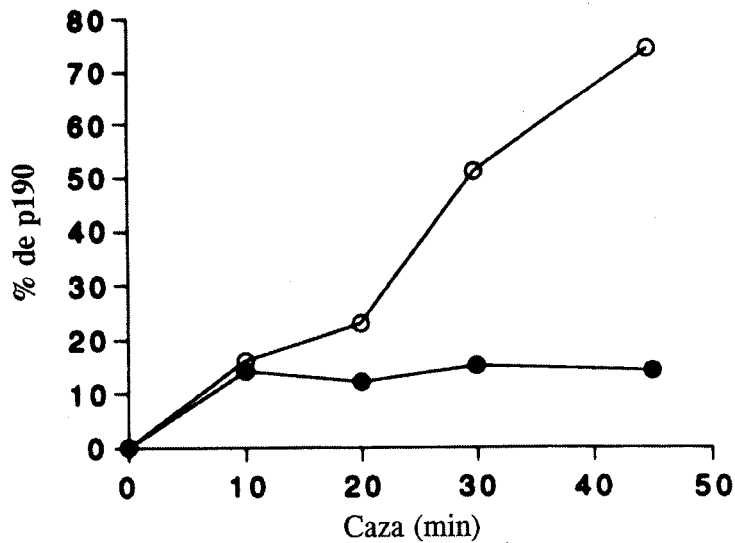


FIGURA 21.- Efecto de la disminución de los niveles de calcio en el RE sobre la degradación de los precursores de agregán. Condrocitos marcados radiactivamente durante 5 min fueron incubados durante los tiempos indicados en medio de caza libre de calcio, en presencia (●) o ausencia (○) del ionóforo de calcio A23187 5 μ M. Las moléculas de agregán inmunoprecipitadas de los lisados celulares se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y posterior fluorografía. Las bandas de 370 kDa y 190 kDa fueron cuantificadas por densitometría. Se representa el porcentaje de la forma de degradación de 190 kDa con respecto a la forma de 370 kDa. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

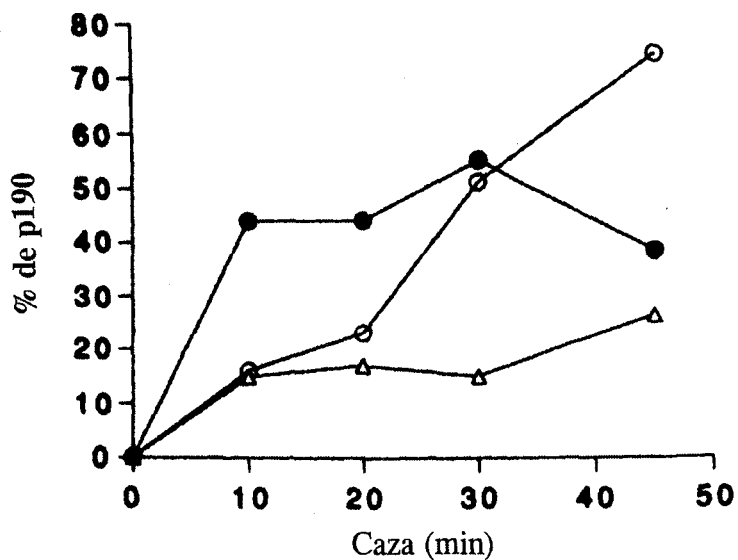


FIGURA 22.- Efecto del estado redox del RE sobre la degradación de los precursores de agregación. Células marcadas radiactivamente durante 5 min fueron incubadas durante los tiempos indicados en medio de caza en presencia de DTT 1 mM (●), diamida 1 mM (Δ) o en ausencia de ambas (○). Las moléculas de agregación inmunoprecipitadas de los lisados celulares se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE. Las bandas de 370 kDa y 190 kDa detectadas en el fluorograma fueron cuantificadas por densitometría. Los datos correspondientes a un promedio de 3 experimentos independientes se representan como el porcentaje de la forma de degradación de 190 kDa con respecto a la forma de 370 kDa.

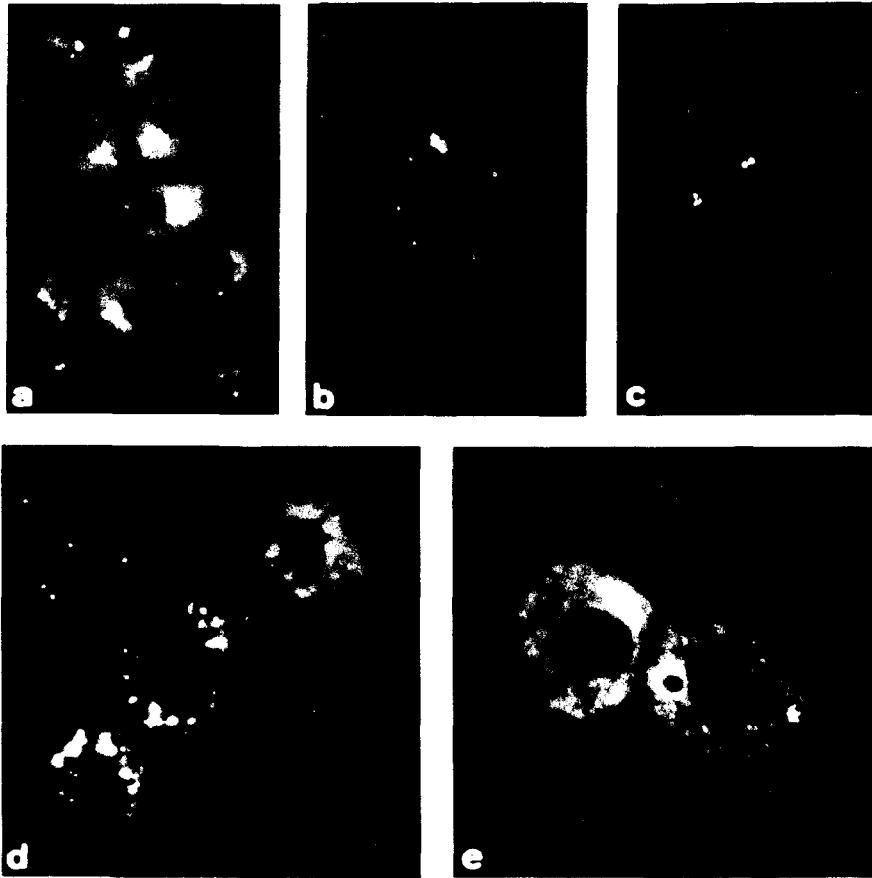


FIGURA 23.- Efectos de diferentes tratamientos sobre la localización intracelular de las moléculas de agregacán. Condrocitos cultivados en monocapa fueron incubados durante 2 h a 37°C (a, c-e) o a 20°C (b) en medio de cultivo normal (a-b) o bien suplementado con 200 µg/ml de ALLN (c), 200 µg/ml de leupeptin (d), o DTT 2 mM (e). Las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-agregacán. Aumento: X 350.

La incubación a baja temperatura ocasiona una disminución de la velocidad de degradación del precursor de 370 kDa y, correspondientemente, las células incubadas a 20°C exhibieron un número mayor de “vesículas” fluorescentes que las incubadas a 37°C (Fig. 23, b). Estos datos, por tanto, indican que la acumulación del precursor de 370 kDa, como consecuencia de una inhibición de su degradación, se traduce morfológicamente en un incremento en el número de áreas especializadas del RE donde se almacena.

El efecto contrario fue observado en aquellos tratamientos que aceleran el proceso degradativo. Así, cuando las células son tratadas con DTT el precursor de 370 kDa experimenta un plegamiento defectuoso, lo que dificulta su exportación desde el RE al CG. Por ese motivo en los condrocitos incubados con DTT el RE apareció más intensamente teñido que lo habitual (Fig. 23, e). No obstante, dado que este agente incrementa también la degradación del precursor de 370 kDa (Fig. 22), las células apenas mostraron subcompartimentos en su interior.

Consideramos, por lo tanto, que la degradación en el RE del precursor de 370 kDa viene precedida por el ingreso de esta molécula en un subcompartimento particular, de forma que cuando el proceso degradativo se acelera disminuye el número de tales subregiones, en tanto que la inhibición de la degradación ocasiona un aumento de las mismas.

En resumen, los datos obtenidos indican que una fracción (alrededor del 25%) de los precursores biosintéticos de agregación son continuamente confinados a zonas especiales del RE, donde experimentan degradación. Ello constituye una prueba

importante de la compartimentación de las actividades metabólicas en general, y particularmente de las reacciones proteolíticas, en el RE.

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos identificado un subcompartimento del RE en el cual tiene lugar la degradación de parte de los precursores biosintéticos del proteoglicano agregán. Los resultados indican que este proceso degradativo depende de una maquinaria proteolítica localizada en áreas especializadas del orgánulo. Estas observaciones nos permiten sugerir un modelo sobre la organización espacial de las actividades funcionales en el RE.



Degradación de precursores de agregán

En nuestras condiciones experimentales únicamente el 73-75% de los precursores de agregán sintetizados en un momento dado son secretados al medio extracelular. El 25-27% restante es retenido intracelularmente y es degradado lentamente. La significación de este hecho no es clara y posiblemente resulte de las condiciones fisiológicas y metabólicas presentes en las células cultivadas. Es posible que *in situ* la degradación afecte un porcentaje menor de las moléculas sintetizadas. Es evidente, sin embargo, que las células disponen de los mecanismos enzimáticos necesarios para degradar determinados precursores de agregán. La cuestión que se plantea es determinar cuáles son las características de las moléculas objeto de degradación en comparación con aquellas otras que siguen la ruta secretora. Al igual que ocurre con otras proteínas sintetizadas en diferentes tipos celulares, la degradación podría ser el resultado de una conformación defectuosa debido a mal plegamiento (66, 70, 88, 89) o incorrecta oligomerización (59, 69, 90) de las moléculas afectadas. En este sentido, es importante destacar el incremento en la cinética de degradación observado en las células tratadas con DTT (Fig. 22). La adición de este agente da lugar a la reducción de los puentes disulfuro y consiguiente desnaturalización de las proteínas en vías de elaboración. Un aumento en el número de moléculas de agregán mal plegadas podría, por tanto, acelerar su degradación. Asimismo, es posible que, en determinadas condiciones, la relación existente entre los precursores de agregán y los de la proteína de unión no sea realmente estequiométrica, con lo cual las moléculas de agregán en exceso serían selectivamente degradadas. Si bien se admite que la asociación de agregán con otras moléculas de la matriz del cartílago es un proceso extracelular, algunos estudios han señalado la posibilidad de que la asociación con la proteína de unión ocurra intracelularmente. La cinética de procesamiento de ambas moléculas es similar y ello hace pensar en un transporte intracelular conjunto (85). Así pues, a través del control de

las velocidades de síntesis y degradación las células podrían regular en todo momento la producción de moléculas funcionales de proteoglicanos. De esta forma, los resultados obtenidos amplían estudios previos sobre la biosíntesis de agregán, en los cuales se describió la degradación de parte de los precursores sintetizados (85).

El proceso de degradación comienza de forma inmediata, puesto que no hemos detectado un período de tiempo comprendido entre síntesis y proteólisis (Fig. 9 A, B). Sin embargo, las moléculas se degradan lentamente y tras dos horas de caza aún permanecen restos proteolíticos en el interior de las células. El intermediario degradativo que hemos conseguido detectar es una N-glicoproteína de 190 kDa con una vida media de 110 minutos. Pusimos de manifiesto su relación con el precursor de 370 kDa mediante técnicas inmunológicas y experimentos cinéticos. Así, ambas formas moleculares fueron reconocidas por inmunoglobulinas específicas contra una de ellas (Fig. 11). La desaparición del precursor de 370 kDa coincide con la secreción de monómeros de agregán al medio de cultivo (Fig. 7, 9 B) y el incremento intracelular transitorio en la forma de 190 kDa (Fig. 9 B). Por otro lado, la forma de 190 kDa fue reconocida por anticuerpos anti-agregán, incluido un anticuerpo monoclonal contra el centro proteico, cedidos por otros investigadores.

En ciertos experimentos de marcaje metabólico e inmunoprecipitación detectamos una forma intermediaria de 180 kDa (Fig. 9, A) que, debido a su rápida desaparición de las células, no pudimos caracterizar en detalle. Es posible, por tanto, que la reacción proteolítica inicial consista en la escisión del precursor de 370 kDa para generar intermediarios de 190 y 180 kDa respectivamente. Los datos indican que la proteasa responsable de catalizar este primer paso es sensible al tratamiento con PMSF o leupeptina (Fig. 18 y Tabla I), los cuales son conocidos agentes inhibidores de proteasas de serina y cisteína. El aumento del precursor de 370 kDa a expensas de la forma de 190

kDa en las células incubadas con estos inhibidores constituye la evidencia definitiva de la relación existente entre ambas moléculas. Concluimos por tanto que la glicoproteína de 190 kDa es un fragmento proteolítico derivado de la degradación del precursor de agregán de 370 kDa.

Si bien hemos podido estudiar la degradación de precursores de agregán en base a la aparición del intermediario de 190 kDa, no hemos logrado analizar exhaustivamente los pasos posteriores en el proceso degradativo. Únicamente hemos constatado que la degradación de esta molécula debería ser efectuada por proteasas de vida media corta, pues el tratamiento con cicloheximida interrumpe su desaparición (Figs.16 y 17). Sugerimos, por tanto, la existencia de un equipo multienzimático encargado de la degradación selectiva de aquellos precursores de agregán que no alcancen determinados criterios de conformación funcional. Cada una de las proteasas implicadas poseerían requerimientos particulares de actuación.

La degradación de los precursores de agregán ocurre en el RE

Nuestros resultados indican que la degradación del precursor de agregán de 370 kDa tiene lugar en el RE. En primer lugar, descartamos la participación de endosomas y lisosomas en el proceso degradativo mediante el uso de agentes lisosomotrópicos como NH_4Cl , cloroquina o monensina. Ninguno de estos tratamientos afectó la degradación, medida como aparición de la forma intermediaria de 190 kDa (Fig. 19 A y Tabla II). Asimismo, la reacción proteolítica transcurrió normalmente en presencia de brefeldina A (Fig. 19 B y Tabla II), a pesar de la desorganización del complejo de Golgi inducida por esta droga (87). Además, las características moleculares del intermediario de 190 kDa son típicas de una glicoproteína que aún no ha experimentado las modificaciones propias

del complejo de Golgi. Así, una vez purificada por inmunoprecipitación esta molécula se mostró sensible a la digestión enzimática con endoglicosidasa H y resistente a la digestión con endoglicosidasa D (Fig. 12). Tras el subfraccionamiento de las células el intermediario de 190 kDa se encontró acumulado en las fracciones más densas del gradiente (Figs. 13, 14 y 17), indicando de nuevo una localización anterior al Golgi en la ruta secretora. Por otro lado, aunque la degradación fue sensible a la incubación de las células a baja temperatura (15° ó 20°C), que es sabido afecta al transporte vesicular desde el RE al Golgi (2, 91), ello podría interpretarse como una disminución de la cinética de actuación de las proteasas implicadas. Por el contrario, la degradación de los precursores de agregán no necesita ATP, como se demostró con el tratamiento de las células con agentes inhibidores de la cadena respiratoria (Fig. 20 y Tabla III). Puesto que el transporte desde el RE al Golgi posee un estricto requerimiento de este nucleótido y se detiene con tan sólo un descenso del 25% en el nivel de ATP (92), estos datos definitivamente demuestran la localización en el RE del proceso degradativo.

En los últimos años se han descrito numerosos casos de precursores proteicos susceptibles de ser degradados en el RE (66, 68). La mayoría son proteínas que, debido a un deficiente plegamiento o un ensamblaje inapropiado, no logran superar el control de calidad impuesto a todas aquellas moléculas que han de abandonar el RE. Sin embargo, también existen ejemplos de proteínas cuya degradación parece atender a la necesidad de adecuar su producción efectiva a los requerimientos celulares en un momento dado (60, 93). Como se comentó anteriormente, desconocemos los factores determinantes de la degradación de parte de los precursores de agregán en el RE. No obstante, es posible que algunas de estas moléculas no posean un defecto concreto en su conformación sino que sean degradadas como parte de un proceso más general de adaptación metabólica. En el organismo animal la producción por parte de condrocitos de moléculas extracelulares, incluyendo proteoglicanos, depende de factores de crecimiento e

influencias hormonales (94). Es muy probable que en las condiciones de cultivo empleadas algunos de estos factores estén ausentes o mal representados y, por consiguiente, ocurran deficiencias en la regulación de los procesos biosintéticos. En todo caso, esta circunstancia hace de éste un sistema celular favorable para el estudio de la coordinación de las actividades de síntesis y degradación de proteínas en el RE.

La degradación de precursores de agregán se efectúa en un subcompartimento especializado del RE

Los resultados derivados de experimentos de inmunofluorescencia y subfraccionamiento celular indican que el intermediario de degradación de 190 kDa se halla acumulado en una subregión especial del RE. Morfológicamente este subcompartimento se corresponde con áreas circulares fluorescentes, distribuidas por el citoplasma periférico. Estas zonas no colocalizan con marcadores del complejo de Golgi o de endosomas y lisosomas, en tanto que sí lo hacen con un anticuerpo que tiñe el lumen del RE (Fig. 15). La densidad de flotación del subcompartimento es similar a la de los microsomas rugosos (Fig. 13) y, aún así, no depende de la presencia de ribosomas asociados. De hecho, la disociación de los ribosomas con EDTA no alteró la posición en el gradiente del subcompartimento, pero afectó a parte de los microsomas rugosos (Fig. 14). Finalmente, utilizamos el tratamiento con cicloheximida para identificar a las moléculas relacionadas con agregán confinadas en el subcompartimento. Previamente observamos que en las células tratadas con este agente la tinción inmunofluorescente para agregán permanecía a nivel de las "vesículas" periféricas (Fig. 16). Al someter estas células a subfraccionamiento comprobamos que las moléculas inmunorreactivas se correspondían con el intermediario de 190 kDa, cuya degradación se encontraba inhibida

por efecto del tratamiento con cicloheximida (Fig. 17). Así pues, estos datos indican la concentración del intermediario de degradación de 190 kDa en subregiones del RE.

Estos resultados amplían los obtenidos por Vertel y cols. sobre la detección ultraestructural de precursores de agregán en condrocitos cultivados (34). En este estudio se describió la presencia de moléculas precursoras de agregán en áreas especializadas del RE, que presentaban la particularidad de estar limitadas por una membrana lisa, si bien se trataba de subcompartimentos continuos con cisternas del RE rugoso. La morfología de estas subregiones era variable. En algunas células se trataba de los extremos dilatados y modificados de cisternas típicas del RE rugoso, en tanto que en otros casos eran áreas de confluencia de varias cisternas. Invariablemente los subcompartimentos poseían un contenido electrón-lúcido que los distinguía del resto del RE (34). Tanto la forma como la distribución intracelular de estas subregiones especializadas coincide con nuestras observaciones mediante inmunofluorescencia. Por ello, hemos considerado que se trata del mismo tipo de subcompartimento funcional. Así pues, en conjunto, las evidencias indican que la glicoproteína de 190 kDa, que resulta de la degradación intracelular del precursor de agregán de 370 kDa, se encuentra confinada en una subregión lisa del RE. Es posible que en este lugar las moléculas de 190 kDa formen agregados insolubles similares a los descritos en otros tipos celulares (95, 96). En tal caso, la morfología y tamaño del subcompartimento podrían estar condicionadas por el número de moléculas retenidas.

El estudio de ciertos factores que influyen sobre la velocidad de degradación de los precursores de agregán nos ha permitido relacionar esta actividad proteolítica con su localización en subcompartimentos del RE. Así, observamos que en aquellas condiciones en que la degradación se encuentra inhibida o retardada las células afectadas muestran un número mayor de subcompartimentos del RE. Este es el caso de las células incubadas a

baja temperatura (Fig. 23, b) o tratadas con leupeptina (Fig. 23, d), en las que el número y tamaño de las “vesículas” periféricas detectadas por inmunofluorescencia es mayor que en las células control mantenidas a 37°C. Estos tratamientos ocasionan acumulación intracelular del precursor de 370 kDa, debido a la imposibilidad de degradar adecuadamente esta especie molecular. En cambio, el tratamiento con DTT estimuló la degradación del precursor de agregán (Fig. 22) y, correspondientemente, las células mostraron muy pocas “vesículas” periféricas (Fig. 23, e). De estas observaciones se deduce que el proceso degradativo viene precedido por la inclusión del precursor de 370 kDa en un subcompartimento proteolítico, originándose en esta localización la forma intermediaria de 190 kDa. Toda inhibición de la actividad degradativa da lugar, por tanto, a un incremento en el número de moléculas precursoras alojadas en estos subcompartimentos. Por el contrario, los subcompartimentos dejan de ser evidentes en aquellas situaciones (por ejemplo, tratamiento con DTT) en que las moléculas son rápidamente degradadas. La Fig. 24 esquematiza un modelo del proceso degradativo que experimentan los precursores biosintéticos de agregán en el subcompartimento del RE.

IMPLICACIONES DE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS EN UN SUBCOMPARTIMENTO ESPECIALIZADO DEL RE

En nuestra opinión, la degradación de precursores biosintéticos de agregán en un subcompartimento especializado del RE constituye un hallazgo importante por cuanto modifica la visión que actualmente se posee de este orgánulo.

En el RE tiene lugar la síntesis de proteínas solubles y de membrana pertenecientes a casi todos los orgánulos de la célula. Estas proteínas son objeto de

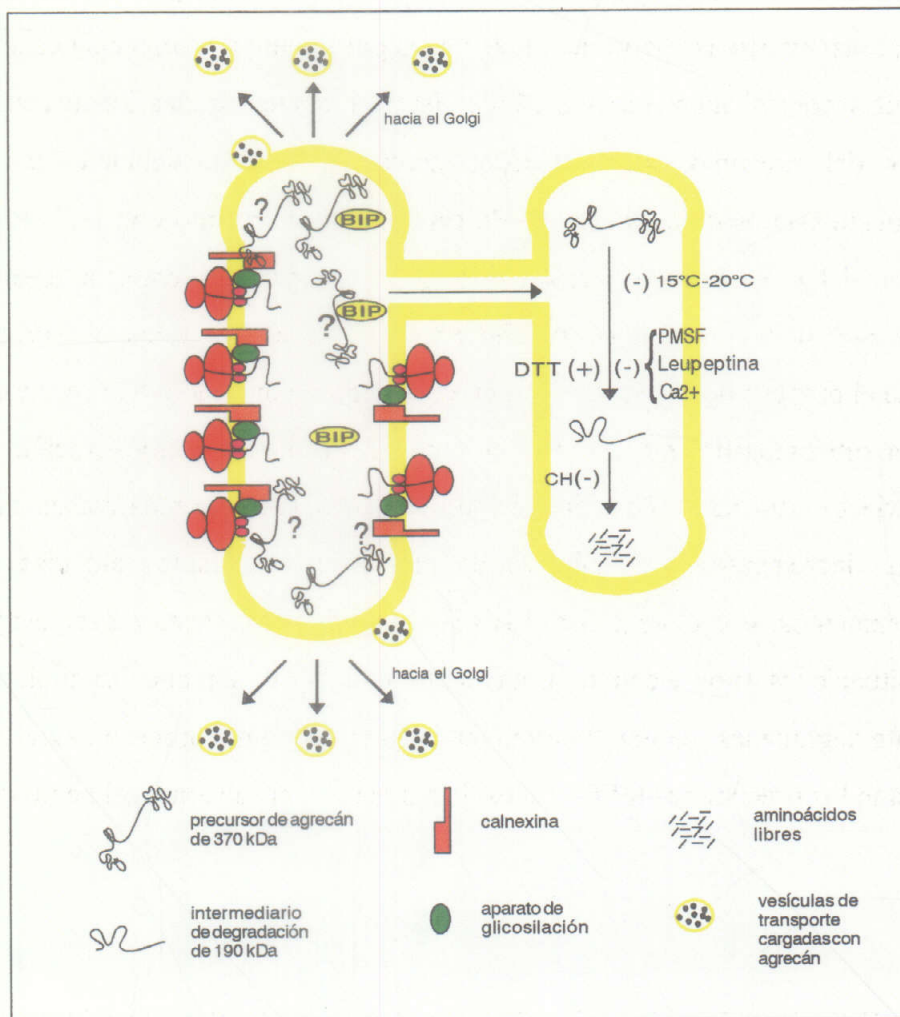


FIGURA 24.- Modelo sobre la degradación de los precursores de agregación en un subcompartimento del RE. Una vez sintetizados los precursores de agregación de 370 kDa se unirían a Bip¹ (?) y probablemente a calnexina (?) para adquirir su conformación nativa. Aquellas moléculas que no superaran todos los controles de calidad necesarios para abandonar el RE serían dirigidas hacia un subcompartimento degradativo. En dicho compartimento tendría lugar la degradación de los precursores de agregación en un proceso dependiente de Ca²⁺ y temperatura. Esta degradación se llevaría a cabo al menos en dos etapas. La primera, realizada por proteasas de serina y cisteína, produce un intermediario de 190 kDa. La segunda estaría a cargo de proteasas de vida media corta, como lo demuestra su inhibición con cicloheximida. Agentes reductores como el DTT aceleran el proceso, probablemente porque aumentan la cantidad de moléculas de agregación mal plegadas. La separación física de los procesos de síntesis y degradación dentro del mismo orgánulo supone una solución eficaz para que no interfieran entre sí estas dos actividades opuestas. El signo (+) significa incremento en la velocidad del proceso, (-) indica disminución en su velocidad o inhibición del mismo. ¹Observaciones del autor.

modificación en el propio RE. A través de una serie de reacciones de procesamiento, las moléculas alcanzan un estado de conformación apropiado. Dentro de este proceso la degradación de proteínas juega un papel esencial ya que regula su producción e impide la exportación de proteínas aberrantes. Este hecho demanda una gran organización en el RE, de forma tal que las actividades de síntesis y degradación no interfieran entre sí. Por tanto, la existencia de subcompartimentos en el RE supone una solución eficiente a esta situación, sobre todo cuando se trata de actividades que, como la síntesis y la degradación de proteínas, son completamente opuestas entre sí. Antes de su degradación las moléculas de agregán se acumulan en un subcompartimento expandido del RE donde son degradadas. De esta forma, al estar confinadas en esta región, las proteasas implicadas no interferirían con las actividades biosintéticas del orgánulo. Por otra parte, las condiciones iónicas, de pH y redox serían las óptimas para la actividad de las proteasas implicadas y, al mismo tiempo, estas condiciones podrían ser distintas a las del resto del orgánulo. Esto determinaría una mayor selectividad en la degradación.

Dado que el proteoglicano agregán es una proteína que no ha sido manipulada genéticamente, creemos que los resultados obtenidos son extrapolables a la realidad de las células *in situ*. Los sistemas previamente descritos por otros autores se refieren a proteínas quiméricas, generalmente mutantes o sobreexpresadas, y quizás por ello la existencia de subcompartimentos degradativos no haya sido evidente. Sólo recientemente se ha descrito que, en ausencia de péptidos antigénicos, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I son degradadas en un subcompartimento del RE (88).

La existencia de un subcompartimento degradativo aumenta el número de regiones funcionalmente distintas del RE, sustentando la idea de que se trata de un orgánulo compartimentado (50). Sin duda alguna los procesos de síntesis y degradación

coexistentes son complementarios entre sí. De esta forma el RE aparece como una gran factoría de proteínas en la cual no falta ninguno de los eslabones de fabricación, ni siquiera el de control de calidad. Probablemente la adquisición de oligosacáridos, el plegamiento y la oligomerización, catalizados por diversas enzimas y controlados por chaperonas, también sean actividades compartimentadas. De esta manera, los procesos biosintéticos que conducen a la formación de una proteína funcional se desarrollarían de forma ordenada y sin interferir unos con otros.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir que:

Una fracción significativa del precursor del proteoglicano agregán es selectivamente retenida y degradada en un subcompartimento del RE de condrocitos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* **189**, 347-358.
2. Pelham, H. R. B. (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 1-23.
3. Ng, TW, D. y Walter P (1994) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Curr Op Cell Biol* **6**, 510-516.
4. Saraste, J. y Kuismanen, E. (1984) Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* **38**, 535-549.
5. Hammond, C. y Helenius, A. (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **126**, 41-52.
6. Hirschberg, C. B. y Snider, M. D. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 63-87.
7. Farquhar, M. G. (1985) Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 447-488.
8. von Figura y K., Hasilik, A. (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 167-193.
9. Griffiths, G. y Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443.
10. Walter, P. y Johnson, A. E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 87-119.
11. Wiest, D. L., Burkhardt, J. K., Hester, S., Hortsch, M., Meyer, D. I. y Argon, Y. (1990) Membrane biogenesis during B cell differentiation: most endoplasmic reticulum proteins are expressed coordinately. *J. Cell Biol.* **110**, 1501-1511.
12. Remmer, H. y Merker, H. J. (1963) Drug induced changes in liver endoplasmic reticulum: association with drug metabolizing enzymes. *Science* **142**, 1657-1658.

13. Kreibich, G., Ulrich, B. L. y Sabatini, D. D. (1978) Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristics of rough microsomes. *J. Cell Biol.* **77**, 464-487.
14. Hortsch, M. y Meyer, D. I. (1985) Immunochemical analysis of rough and smooth microsomes from rat liver: segregation of docking protein in rough membranes. *Eur. J. Biochem.* **150**, 559-564..
15. Puddington, L., Lively, M. O. y Lyles, D. S. (1985) Role of nuclear envelope in synthesis, processing and transport of membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 5641-5647.
16. Gerace, L., Comeau, C. y Benson, M. (1984) Organization and modulation of nuclear lamina structure. *J. Cell Sci.* **137**, 160-164.
17. Burke, B. y Gerace, L. (1986) A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* **44**, 639-652.
18. Pathak, R. K., Luskey, K. L. y Anderson, R. G. (1986) Biogenesis of the cristalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells: evidence that newly formed endoplasmic reticulum emerges from the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **102**, 2158-2168.
19. Rose, J. K. y Doms, R. W. (1988) Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 257-288.
20. Volpe, P., Krause, K-H., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J. y Lew, D. P. (1988) "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store of nonmuscle cells? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1091-1095.
21. Villa, A., Podini, P., Clegg, D. O., Pozzan, T. y Meldolesi, J. (1991) Intracellular Ca^{2+} stores in chicken Purkinje neurons: differential distribution of the low affinity-high capacity Ca^{2+} binding protein, calsequestrin, of Ca^{2+} ATPase and of the ER luminal protein, BiP. *J. Cell Biol.* **113**, 779-791.
22. Satoh, T., Ross, C. A., Villa, A., Supattapone, S., Pozzan, T., Snyder, S. H. y Meldolesi, J. (1990) The inositol 1,4,5,-trisphosphate receptor in cerebellar Purkinje cells: quantitative immunogold labelling reveals concentration in an ER subcompartment. *J. Cell Biol.* **111**, 615-624.

23. Egea, G., Francí, C., Gambús, G., Lesuffleur, T., Zweibaum, A. y Real, F. X. (1993) *cis*-Golgi resident proteins and *O*-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells. *J. Cell Sci.* **105**, 819-830.
24. Pérez-Vilar, J., Hidalgo, J. y Velasco, A. (1991) Presence of terminal N-acetylgalactosamine residues in subregions of the endoplasmic reticulum is influenced by cell differentiation in culture. *J. Biol. Chem.* **266**, 23967-23976.
25. Pathak, R. K., Merkle, R. K., Cummings, R. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. y Anderson, R. G. W. (1988) Immunocytochemical localization of mutant low density lipoprotein receptors that fail to reach the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **106**, 1831-1841.
26. Carraway, K. L. y Hull, S. R. (1989) Mucin-type O-glycosilation. *BioEssays* **10**, 117-121.
27. Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M-L., Kern, H. F., Klenk, H. D. y Garten, W. (1995) Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* **14**, 2424-2435.
28. Wassler, M. y Fries, E. (1993) Proteolytic cleavage of haptoglobin occurs in a subcompartment of the endoplasmic reticulum: evidence from membrane fusion in vitro. *J. Cell Biol.* **123**, 285-291.
29. Valetti, C., Grossi, C. E., Milstein, C. y Sitia, R. (1991) Russell bodies: a general response of secretory cells to synthesis of a mutant immunoglobulin which can neither exit from, nor be degraded in, the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **115**, 983-994.
30. Tooze, J., Kern, H. F., Fuller, S. D. y Howell, K. E. (1989) Condensation-sorting events in the rough endoplasmic reticulum of exocrine pancreatic cells. *J. Cell Biol.* **109**, 35-50.
31. Noda, T. y Farquhar, M. G. (1992) A non-autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosomes. *J. Cell Biol.* **119**, 85-97.
32. Hobman, T. C., Woodward, L. y Farquhar, M. G. (1992) The rubella virus E1 glycoprotein is arrested in a novel post-ER, pre-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* **118**, 795-811.

33. Ulmer, J. B. y Palade, G. (1989) Targeting and processing of glycoproteins in murine erytroleukemia cells: use of brefeldin A as a perturbant of intracellular traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6992-6996.
34. Vertel, B. M., Velasco, A., LaFrance, S., Walters, L. y Kaczman-Daniel, K. (1989) Precursors of chondroitin sulfate proteoglycan are segregated within a subcompartment of the chondrocyte endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **109**, 1827-1836.
35. Li, X., Franceschi, V. R. y Okita, T. W. (1993) Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells. *Cell* **72**, 869-879.
36. Walter, P. y Lingappa V. R. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **2**, 499-516.
37. Abeijon, C., y Hirschberg, C. B. (1987) Subcellular site of synthesis of the N-acetylgalactosamine (α 1-O) serine (or treonine) linkage in rat liver. *J. Biol. Chem.* **262**, 4153-4159.
38. Berger, M. y Schmidt, M. F. G. (1985) Protein fatty acyl transferase is located in the rough endoplasmic reticulum. *FEBS lett.* **187**, 289-294.
39. Hurtley, S. M. y Helenius, A. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 277-307.
40. Helenius, A., Marquardt, T. y Braakman, I. (1992) The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol.* **2**, 227-231.
41. Freedman, R. B. (1989) Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* **57**, 1069-1072.
42. Rothman, J. E. (1989) Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* **59**, 591-601.
43. Kim, P. S., Bole, D. y Arvan, P. (1992) Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP. *J. Cell Biol.* **118**, 541-549.

44. Knittler, M. R. y Haas, I. G. (1992) Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *EMBO J.* **11**, 1573-1581.
45. Kassenbrock, C. K. y Kelly, R. B. (1989) Interaction of heavy chain binding protein (Bip/GRP/78) with adenine nucleotides. *EMBO J.* **8**, 1461-1467.
46. Ou, W.-J., Cameron, P. H., Thomas, D. Y. y Bergeron, J. J. M. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**, 771-776.
47. Hammond, C. y Helenius, A. (1994) Folding of VSV protein: sequential interaction with Bip and Calnexin. *Science* **266**, 456-458.
48. Rajagopalan, S., Xu, U. y Brenner, M. B. (1994) Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* **263**, 387-390.
49. Minami, Y., Weissman, A. M., Samelson, L. E. y Klausner, R. D. (1987) Building a multi-chain receptor: Synthesis, degradation and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2688-2692.
50. Lippincott-Schwartz, J. L., Bonifacio, J. S., Yuan, L. C. y Klausner, R. D. (1988) Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell* **54**, 209-220.
51. Munro, S. y Pelham, H. R. B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
52. Pelham, H. R. B., Hardwick, K. G. y Lewis, M. J. (1988) Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J.* **7**, 1757-1762.
53. Zagouras, P. y Rose, J. K. (1989) Carboxy-terminal SEKDEL sequences retard but do not retain two secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **109**, 2633-2640.
54. Andres, D. A., Dickerson, I. M. y Dixon, J. E. (1990) Variants of the carboxyl-terminal KDEL sequence direct intracellular retention. *J. Biol. Chem.* **265**, 5952-5955.

55. Jackson, M. R., Nilsson, T. y Peterson, P. A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **9**, 3153-3162.
56. Forsayeth, J. R., Gu, Y. y Hall, Z.W. (1992) Bip forms stable complexes with unassembled subunits of the acetylcholine receptor in transfected COS cells and in C2 muscle cells. *J. Cell Biol.* **117**, 841-847.
57. Le, A., Ferrell, G. A., Dishon, D. S., Le, Q. A. y Sifers, R. N. (1992) Soluble aggregates of the human PiZ α_1 -antitrypsin variant are degraded within the endoplasmic reticulum by a mechanism sensitive to inhibitors of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 1072-1082.
58. Adeli, K. (1994) Regulated intracellular degradation of apolipoprotein B in semipermeable HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 9166-9165.
59. Amara J. F., Lederkremer, G. y Lodish, H. F. (1989) Intracellular degradation of unassembled asialoglycoprotein receptor subunits: a pre-Golgi, nonlysosomal endoproteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* **109**, 3315-3324.
60. Eliasson, E., Mkrtchian, S. e Ingelman-Sundberg, M. (1992) Hormone- and substrate-regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involving MgATP-activated rapid proteolysis in the endoplasmic reticulum membranes. *J. Biol. Chem.* **267**, 15765-15769.
61. Wikström, L. y Lodish, H. F. (1991) Nonlysosomal, pre-Golgi degradation of unassembled asialoglycoprotein receptor subunits: a TLCK- and TPCCK-sensitive cleavage within the ER. *J. Cell Biol.* **113**, 997-1007.
62. Wileman, T., Kane, L. P., Carson, G. R. y Terhost, C. (1991) Depletion of cellular calcium accelerates protein degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**, 4500-4507.
63. Davis, E. C. y Mecham, R. P. (1996) Selective degradation of accumulated secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **271**, 3787-3794.
64. Amitay, R., Shachar, I., Rabinovich, E., Haimovich, J. y Bar-Nun, S. (1992) Degradation of secretory immunoglobulin M in B lymphocytes occurs in a postendoplasmic reticulum compartment and is mediated by a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* **267**, 20694-20700.

65. Ye, S. Q., Reardon, C. A. y Getz, G. S. (1993) Inhibition of apolipoprotein E degradation in a post-Golgi compartment by a cysteine protease inhibitor. *J. Biol. Chem.* **268**, 8497-8502.
66. Wikström, L. y Lodish, H. F. (1993) Unfolded H2b asialoglycoprotein receptor subunit polypeptides are selectively degraded within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**, 14412-14416.
67. Tsao, Y. S., Ivessa, N. E., Adesnik, M., Sabatini, D. D. y Kreibich, G. (1992) Carboxy terminally truncated forms of ribophorin I are degraded in pre-Golgi compartments by a calcium-dependent process. *J. Cell Biol.* **116**, 57-67.
68. Klausner, R. D. y Sitia, R. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* **62**, 611-614.
69. Bonifacino, J. S., Suzuki, C. K., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A. M. y Klausner, R. D. (1989) Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *J. Cell Biol.* **109**, 73-83.
70. Schmitz, A., Maintz, M., Kehle, T. y Herzog, V. (1995) *In vivo* iodination of a misfolded proinsulin reveals co-localized signals for Bip binding and for degradation in the ER. *EMBO J.* **14**, 1091-1098.
71. Suzuki, C. K., Bonifacino, J. S., Lin, A. Y., Davis, M. M. y Klausner, R. D. (1991) Regulating the retention of T-cell receptor chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca²⁺ dependent association with BiP. *J. Cell Biol.* **114**, 189-205.
72. Caterson, B., Christner, J. E. y Baker, J. R. (1983) Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulfate. *J. Biol. Chem.* **258**, 8848-8854.
73. Caterson, B., Christner, J. E., Baker, J. R. y Couchman, J. R. (1985) Production and characterization of monoclonal antibodies directed against connective tissue proteoglycans. *Fed. Proc.* **44**, 386-393.
74. Upholt, W. B., Vertel, B. M. y Dorfman, A. (1981) Cell-free translation of cartilage RNAs. *Ala. J. Med. Sci.* **18**, 35-40.
75. Oike, Y., Kimata, K., Shinomura, T., Nakazawa, K. y Suzuki, S. (1980) Structural analysis of chick-embryo proteoglycan by selective degradation with chondroitin

- lyases (chondroitinases) and endo- β -D-galactosidase (keratanase). *Biochem. J.* **191**, 193-207.
76. Olmsted, J. B. (1981) Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J. Biol. Chem.* **256**, 11955-11957.
77. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 3932-3939.
78. Towbin, H., Staehelin, T y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
79. Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A. y Rothman J. E. (1984) Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* **39**, 405-416.
80. Walter, P. y Blobel, G. (1983) Microsomal membrane for protein translocation. *Methods Enzymology*. **96**, 84-93.
81. Tulsiani, D. R. P., Hubbard, S. C., Robbins, P. H. y Touster, O. (1982) α -D-Mannosidases of rat liver Golgi membranes. Mannosidase II is the GlcNacMAN₅ - cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases IA and IB are the enzymes converting MAN₉ precursors to MAN₅ intermediates. *J. Biol. Chem.* **257**, 3660-3668.
82. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. (1992) *Principios de Bioquímica*, **Cap. 11**, 312-314. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
83. Hascall, V. C. (1988) Proteoglycans: the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan of cartilage. *ISI Atlas Sci. Biochem.* **1**, 189-198.
84. Castagnola, P., Moro, G., Descalzi-Cancedda, F. y Rainieri Cancedda (1986) Type X collagen synthesis during in vitro development of chick embryo tibial chondrocytes. *J. Cell Biol.* **102**, 2310-2317.
85. Campbell, C. y Schwartz, N. B. (1988) Kinetics of intracellular processing of chondroitin sulfate proteoglycan core protein and other matrix components. *J. Cell Biol.* **106**, 2191-2202.

86. Tarentino, A. L., Trimble, R. B. y Plummer Jr., T. H. (1989) Enzymatic approaches for studying the structure, synthesis and processing of glycoproteins. *Methods. Cell Biol.* **32**, 111-138.
87. Lippincott-Schwartz, J., Yuan L.C., Bonifacino, J. S. y Klausner, R. D. (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with Brefeldin A: Evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813.
88. Raposo, G., van Santen, H. M., Leijendekker, R., Geuze, H. J. y Ploegh, H. L. (1995) Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Biol.* **131**, 1403-1419.
89. Le, A., Graham, K. S. y Sifers, R. N. (1990) Intracellular degradation of the transport-impaired human PiZ α 1-antitrypsin variant. *J. Biol. Chem.* **265**, 14001-14007.
90. Fra, A. M., Fagioli, C., Finazzi, D., Sitia, R. y Alberini, C. M. (1993) Quality control of ER synthesized proteins: an exposed thiol group as a three-way switch mediating assembly, retention and degradation. *EMBO J.* **12**, 4755-4761.
91. Saraste, J., Palade, G. E. y Farquhar M. G. (1986) Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 6425-6429.
92. Balch W. E., Elliot, M., y Keller, D. S. (1986) ATP-coupled transport of vesicular stomatitis virus G protein between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *J. Biol. Chem.* **261**, 14681-14689.
93. Hampton, R. y Rine, J. (1994) Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J. Cell Biol.* **125**, 299-312.
94. Stockwell, R. A. (1983) Metabolism of cartilage. *Cartilage. Structure, Function and Biochemistry* **9**, 253-280.
95. Marquardt, T. y Helenius, A. (1992) Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **117**, 505-513.
96. Sawyer, J. T., Lukaczyk, T. y Yilla, M. (1994) Dithiothreitol treatment induces heterotypic aggregation of newly synthesized secretory proteins in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 22440-22445.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE QUÍMICA

República de México, D.F., a los 28 días del mes de Julio de 1966.

D. Manuel Abasco

Caracterización de un subcompartmento proteolítico en el retículo endoplasmico de condrocitos

Apto "Cum laude"

28

96

~~98~~

~~juicio~~

~~juicio~~

~~juicio~~

~~juicio~~

Doctorado,
juicio



500769701

FBI ETD / 346