

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de un lípido-trisacárido intermediario en animales superiores : Papel en la biosíntesis de glicoproteínas

Levy Sabaj, José A.

1976

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

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

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

Cita tipo APA:

Levy Sabaj, José A.. (1976). Biosíntesis de un lípido-trisacárido intermediario en animales superiores : Papel en la biosíntesis de glicoproteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1520_LevySabaj.pdf

Cita tipo Chicago:

Levy Sabaj, José A.. "Biosíntesis de un lípido-trisacárido intermediario en animales superiores : Papel en la biosíntesis de glicoproteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1976.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1520_LevySabaj.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Biosíntesis de un lípido-trisacárido intermediario en animales superiores. Papel en la biosíntesis de glicoproteínas.

Autor : José A. Levy Sabaj

Director : Héctor Carminatti

Lugar de Trabajo : Instituto de Investigaciones Bioquímicas

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

- 1 9 7 6 -

4520

A los míos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Carminatti por el gran apoyo humano y todas las enseñanzas que me brindó. A él se deben los mejores aportes de esta tesis.

A los Dres. Luis F. Leloir y Nicolás H. Behrens por la guía recibida de ellos durante todo el transcurso de este trabajo.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por su valiosa cooperación.

A los Dres. Ana Cantarella y Eduardo Tábor, mis compañeros de laboratorio, mi reconocimiento por la colaboración brindada.

A la Organización de Estados Americanos y a la Fundación Universidad de Rio Grande, Brasil, por haberme dado el apoyo material durante la realización de este trabajo.

Al Ministerio de Educación y Cultura de Uruguay por su respaldo para la realización de estos estudios.

Al Dr. Israel Korc y a mis compañeros del laboratorio de Bioquímica del Centro de Ciencias Biológicas e da Saúde; Hilda Cammay de Matte, Neuza Souza y Yamandú Perez, por el apoyo recibido.

A la Srta. Mirian Coreti dos Santos, del G.A.P.L.A.N., por la paciente tarea de realizar todos los dibujos de esta tesis.

A la Srta. Tânia Maria Pereira por la copia de los manuscritos.

A la Imprenta de la Fundación Universidad de Rio Grande, Brasil, por la impresión de este trabajo.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la síntesis de un lípido-trisacárido y su papel en la biosíntesis de la porción azúcar de las glicoproteínas. Se pueden considerar tres aspectos en esta investigación:

Biosíntesis del Dolicol-P-P-N-acetilglucosamina. Microsomas de oviducto de gallina incubados con dolicol-P, Mg^{++} , detergente y UDP ^{14}C GlcNac catalizan la transferencia de la GlcNac a un compuesto soluble en la fracción lipídica.

Por hidólisis ácida suave del lípido-azúcar, seguida de cromatografía en papel, se obtiene únicamente ^{14}C GlcNac.

La formación del lípido- de N-acetilglucosamina se incrementa por la adición de cantidades crecientes de dolicol-P.

Se estudiaron también las condiciones óptimas de incubación. Se compararon estos resultados con los obtenidos a partir de microsomas de hígado de rata.

Biosíntesis del Dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa. Incubando dolicol-P-P-N-acetilglucosamina radioactivo y UDPGlcNac, no marcado, con microsomas de oviducto de gallina, en presencia de Mg^{++} y detergente, se obtiene la formación de un nuevo lípido-azúcar.

Este nuevo compuesto es lábil al tratamiento ácido suave y el resto hidrofílico fue identificado por cromatografía en papel y por digestión con β -N-acetilglucosaminidasa como la di-N-acetilquitobiosa (2-acetoamido-2 deoxi-0- β -D-glucopirano-sil-(1-4)-2 acetoamido-2 deoxi-D-glucosa).

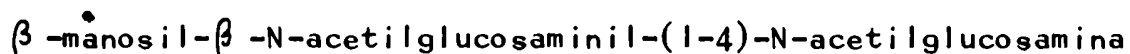
Se estudió también la síntesis de este disacárido en distintos tejidos y las condiciones óptimas para obtener un mejor rendi-

dimiento.

Se presentan evidencias de que este lípido-disacárido, al igual que el de GlcNac son derivados del dolicol-pirofosfato.

La biosíntesis de estos dos lípido-azúcares había sido descrita anteriormente en este Instituto, (110), con preparaciones de microsomas de hígado.

Biosíntesis del lípido-trisacárido. Manosa puede ser transferida desde guanosina difosfato manosa al dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa cuando estos sustratos se incuban con microsomas de oviducto de gallina en presencia de Mg^{++} y detergente. Por hidrólisis -ácida suave del compuesto formado se obtiene un oligosacárido que por cromatografía en papel con distintos solventes y por acción de diferentes glicosidasas parece ser el siguiente trisacárido:



Se estudiaron las condiciones experimentales para la formación de este lípido-trisacárido.

El lípido-trisacárido puede ser sintetizado con microsomas preparados a partir de otros tejidos.

En ciertas condiciones experimentales se puede transferir más moléculas de manosa formándose un lípido-ologosacárido de mayor tamaño.

Parte de estos resultados se han presentado en la IX y X Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (151) (152) y han sido publicadas en el Biochemical and Biophysical Research Communications, (153).

INDICE

	pag.
Abreviaturas.....	1
<u>I INTRODUCCION</u>	
Glicoproteínas.....	2
Biosíntesis de Glicoproteínas.....	6
Tipos de unión azúcar-péptido.....	10
Poliprenoles	18
Papel de los poliprenoles en la síntesis de los glicanos de la pared bacteriana.....	22
Papel de los poliprenoles en la síntesis de glicanos en Levadura y Plantas.....	26
Papel de los lípidos intermediarios en la biosíntesis de glicoproteínas en animales superiores.....	27
Finalidad de la presente investigación	35
<u>II MATERIAL Y METODOS</u>	
1) <u>Reactivos</u>	37
2) <u>Métodos analíticos</u>	37
a) Proteínas.....	37
b) Intercambiadores iónicos.....	37
c) Cromatografía y electroforesis en papel.....	37
d) Medida de la radioactividad.....	38
3) <u>Preparación de microsomas y ensayos enzimáticos</u>	38
a) Tejidos utilizados.....	38
b) Preparación de microsomas.....	39
c) Mezcla de incubación estandar.....	40
d) Aislación de lípido-azúcares.....	40
e) Purificación de lípido-azúcares.....	41
f) Hidrólisis ácida suave.....	43
g) Tratamiento alcalino.....	43

	pag.
4) <u>Preparación de lípidos aceptores</u>	43
5) <u>Preparación de maltooligosacárido</u>	44
6) <u>Preparación y ensayos de glicosidasas</u>	44
a) Preparación de α -manosidasa de bromelina.....	44
b) Preparación de α -manosidasa de poroto.....	45
c) Preparación de glicosidasas de saliva humana.....	46
d) Preparación de β -N-acetilglucosaminidasa de oviducto de gallina.....	46
e) Determinación de la actividad de las glicosidasas.....	47
7) <u>Interacción del oligosacárido con aglutininas</u>	49

III RESULTADOS

<u>Biosíntesis de un lípido-difosfato-N-acetilglucosamina</u>	50
Identificación del producto de la incubación y estudio de algunas de sus propiedades.....	50
Condiciones óptimas de incubación.....	51
<u>Biosíntesis de un lípido-disacárido que contiene acetilglu- cosamina</u>	59
Identificación del producto de incubación.....	59
a)Hidrólisis ácida.....	59
b)Hidrólisis alcalina.....	60
c)Digestión con β -N-acetilglucosaminidasa.....	60
Condiciones de la mezcla de incubación.....	65
Preparación de lípido-di-N-acetilquitobiosa radioactivo....	71
Purificación de los lípido-azúcares.....	72
<u>Biosíntesis de un lípido trisacárido</u>	77
Condiciones experimentales de la mezcla de incubación.....	77
a)Especificidad del compuesto dador de manosa al lípido - disacárido.....	79
b)Efecto de los distintos componentes de la mezcla de	

	pag.
incubación.....	80
c)Efecto del tiempo de incubación en la síntesis del lí- pido X ₃ ,.....	83
Identificación de este nuevo lípido-azúcar.....	83
a)Propiedades que le confiere su porción hidrofóbica....	83
b)Estudio de la estructura del resto hidrofílico.....	85
1. Composición en azúcares.....	85
2. Estudio del tamaño de la porción hidrofílica.....	87
3. Estudio del tipo de unión entre los azúcares que la componen.....	88
a)Estudio con α -manosidasa.....	90
b)Estudio de la acción de la β -manosidasa.....	90
c)Estudio de la acción de la β -N-acetilglucosami- nidasa.....	92
d)Unión del trisacárido a una aglutinina de arve- ja.....	95
Síntesis del lípido-trisacárido en distintos tejidos.....	99
Formación de oligosacáridos mayores.....	102
<u>IV DISCUSION.....</u>	107
<u>Biosíntesis de lípido-azúcares que contienenN-acetilgluco- samina.....</u>	108
<u>Biosíntesis de un lípido-difosfato-trisacárido.....</u>	112
<u>Estudio de la porción hidrofílica del lípido-X₃.....</u>	114
<u>Modelo de la síntesis de la porción azúcar en glicoproteí - nas del tipo asparragina.....</u>	118
Bibliografía.....	124

ABREVIATURAS

UDPGlcNac	5'Uridina Difosfato N-acetilglucosamina
UDPGlc	5'Uridina Difosfato Glucosa
UDP	5'Uridina Difosfato
UMP	5'Uridina Monofosfato
GDPMan	5'Guanosina Difosfato Manosa
GlcNac	N-acetilglucosamina
Glc	Glucosa
Man	Manosa
GlcNH ₂	Glucosamina
Gal	Galactosa
GlcUA	Ácido Glucurónico
Asn	Asparragina
Dol-P	Dolicol Monofosfato
Dol-P-P	Dolicol Pirofosfato
Pi	Fosfato Inorgánico
PPi	Pirofosfato
DOC	Deoxicolato de sodio
GEA	Aceptor Endógeno Glucosilado
TRIS	Tris(Hidroximetil)Amino Metano
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
Ram	Ramnosa
TDPRam	Timidina difosfato ramnosa
UND	Undecaprenoil
Treo	Treonina
Ser	Serina
Hyl	Hidroxilisina

I INTRODUCCION

GLICOPROTEINAS

Los últimos años se han caracterizado por un gran incremento en el estudio de los mecanismos del reconocimiento celular y de la comunicación entre las células. Estos estudios condujeron a un mayor conocimiento de la composición química y de la disposición de las moléculas que forman las membranas de las células y al mismo tiempo pusieron de relevancia el papel de los azúcares en estos procesos.

La célula es la unidad básica de la vida. Casi nunca se encuentra aislada sino relacionada con otras células. Se las puede encontrar asociadas formando tejidos, migrando de un tejido a otro, "atacando" otras células, o defendiéndose contra un "ataque". Todos estos hechos son manifestaciones de un comportamiento social de las células, en el cual los azúcares estarían muy comprometidos (1).

Los azúcares pueden encontrarse unidos entre si en forma de polímeros, o asociados a péptidos como en los péptidoglicanos, o a lípidos como en los glicolípidos o unidos covalentemente a proteínas formando las glicoproteínas. Todas estas moléculas son componentes importantes de las membranas. Son de gran interés por la posibilidad de ser responsables de la expresión de la individualidad biológica de las células.

Dentro de este grupo de moléculas han merecido especial interés las glicoproteínas. Estas pueden definirse como proteínas en las cuales los carbohidratos están unidos covalentemente a la porción peptídica. Se encuentran en toda la escala zoológica, lo que es un índice, sin lugar a dudas, de su gran importancia biológica (2).

Las glicoproteínas se encuentran en distintas formas físicas, pudiendo estar como compuestos solubles o altamente in-

solubles. Su localización puede ser dentro o fuera de las células. Los azúcares pueden estar presentes en muy pequeñas cantidades o también constituir la mayor parte de la molécula. Se pueden presentar como unidades simples o muy complejas.

En la tabla I se observa algunas de las distintas glicoproteínas y se indica las numerosas funciones biológicas que pueden desempeñar estos biopolímeros. Pueden tener actividad de enzimas, de hormonas, tomar parte en las reacciones antígeno-anticuerpo, actuar en el transporte de metales, servir como lubricantes, tener funciones estructurales, ser sustancias de defensa (como la segregadas por las glándulas de algunos insectos); son importantes componentes de la membrana plasmática donde cumplen funciones en el proceso del reconocimiento celular.

La significación biológica de la fracción carbohidrato no ha sido todavía bien dilucidada. Solo se ha estudiado el rol que juegan algunos azúcares, como por ejemplo el ácido siálico.

El tratamiento con neuroaminidasa, que remueve el ácido siálico, de algunas glicoproteínas con importante actividad biológica muestra la importancia de este azúcar. Algunas hormonas luego de este tratamiento son inactivadas, otras moléculas como los anticuerpos no son afectados (3).

La ceruloplasmina tratada con neuroaminidasa e inyectada en conejos es eliminada de la circulación en pocos minutos y va a las células parenquimáticas del hígado. Estas células tienen gran afinidad por la galactosa que es el azúcar terminal luego del tratamiento con la enzima. Si se remueve también la galactosa y se inyecta, tiene la misma actividad que la ceruloplasmina nativa (4) (5).

TABLA I

Glicoproteína	Función	Tipo de unión	Referencia
Bromelina	enzima	Asn-GlcNac	(51)
Pepsina	enzima	Asn-GlcNac	(160)
Ribonucleasa	enzima	Asn-GlcNac	(58)
α - amilasa	enzima	Asn-GlcNac	(51)
Ovoalbúmina	reserva	Asn-GlcNac	(59)
Ovomucoide	reserva	Asn-GlcNac	(154)
IgG	anticuerpo	Asn-GlcNac	(52)
IgA	anticuerpo	Asn-GlcNac	(52)
IgM	anticuerpo	Asn-GlcNac	(52)
Ceruloplasmina	transporte	Asn-GlcNac	(5)
Transferrina	transporte	Asn-GlcNac	(5)
C'3	complemento	Asn-GlcNac	(163)
C'1q	complemento	Asn-GlcNac	(161)
Colágeno	estructural	Hyl-Gal	(28)
Hemaglutinina	aglutinina	Asn-GlcNac	(166)
Tiroglobulina	hormona	Asn-GlcNac	(60)
Gonadotrofina coriónica	hormona	Asn-GlcNac	(170)
Folículo estimulante	hormona	Asn-GlcNac	(171)
Fetúina	prot. Plasma.	Asn-GlcNac	(165)
Fibrinógeno	prot. Plasma.	Asn-GlcNac	(133)
Protrombina	prot. Plasma.	Asn-GlcNac	(168)
α_1 -Fetoproteína	prot. Plasma.	Asn-GlcNac	(169)
HL-A	antígeno de histocompat.	?	(116)
H-2	antígeno de histocompat.	?	(117)

El componente C9 que es el responsable de la fase final de la reacción de fijación del complemento forma quelatos con el hierro. Se inactiva si se oxida con metaperiodato (6). Similares resultados se observan oxidando los azúcares del factor de inhibición de la migración de los macrófagos, MIF(7).

En otros casos es llamativo el hecho de que haya isoenzimas que se diferencian únicamente en que una de ellas sea una proteína pura y la otra tenga una cadena de azúcares. Por ejemplo las ribonucleasas pancreática llamadas tipo A y B. Hasta ahora no se ha encontrado diferencias en sus propiedades enzimáticas y físicas. En esos casos es difícil comprender la razón por la cual durante la evolución se han conservado ambas formas de enzima. Tal vez nuestro conocimiento sea aún limitado para entender estos problemas.

En esta década se han acumulado muchas evidencias de que las moléculas de azúcar son las encargadas del reconocimiento celular y que podrían actuar como señales que codificarían el proceso de la comunicación entre las células. Estas moléculas pueden llevar mucha información biológica. No solo por el gran número de monosacáridos que se conocen, lo que permite un enorme número de combinaciones, sino también por su propiedad de ramificarse, que aumenta aún más la posibilidad de nuevas combinaciones.

Quizás dentro de no muchos años los azúcares puedan contestar algunas de las muchas preguntas que la Biología Molecular se plantea sobre el muy interesante problema de las relaciones entre las células.

BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS

En la biosíntesis de las proteínas y de los ácidos nucleicos existen sistemas enzimáticos relativamente simples en cargados de la construcción de estos biopolímeros. La especificidad y la información que contienen estas moléculas están determinadas por el mensaje genético. En el caso de las cadenas hidrocarbonadas de las glicoproteínas su síntesis se cree que no es realizada por un mecanismo de templado, sino que se necesita de un complejo enzimático que lleve la información adecuada. La presencia o ausencia de estas enzimas o sistemas multienzimáticos estaría determinado genéticamente, y ellos serían los responsables de la especificidad .

La biosíntesis de la cadena de azúcares de las glicoproteínas ha sido muy estudiada en los últimos años. En general se cree que los azúcares son agregados secuencialmente de los respectivos nucleótido-azúcares catalizados por glicosiltransferasas específicas. Estas enzimas serían responsables de la estructura y secuencia de los oligosacáridos de las glicoproteínas (8) (9).

Roseman(10) propone que en la síntesis de la cadena hidrocarbonada, los nucleótido azúcares serían los dadores del azúcar. Estos se irían agregando en la secuencia definitiva "dictada" por glicosiltransferasas específicas, cuya especificidad no solo sería para el azúcar en cuestión, sino también para su posición en la cadena. De esta forma si un mismo azúcar se encuentra repetido en la cadena hidrocarbonada, la transferencia se realizaría por dos enzimas distintas. Habría la llamada "especificidad secuencial cooperativa". El producto de una reacción sería el sustrato para la siguiente glicosiltrans

ferasa (11).

De acuerdo con estas ideas la incorporación de los azúcares no está codificada por el RNA. En las glicoproteínas que poseen el tipo de unión asparragina-azúcar, los carbohidratos se unirían únicamente cuando existe la secuencia Asn-X-Treo o Ser (12).

Todas las glicoproteínas que tienen este tipo de unión azúcar-péptido poseen esta secuencia donde el aminoácido X sería la señal para la glicosilación (13)(14). La única excepción conocida es el oligosacárido de la fosfovítina de la yema de huevo, (15).

Ha sido propuesta también una relación entre la polaridad del aminoácido X y la complejidad del oligosacárido de las glicoproteínas. Si este aminoácido es no polar la cadena de azúcares sería relativamente simple y podría contener únicamente manosa y N-acetilglucosamina. Si fuera polar, el oligosacárido sería más complejo y contendría otros azúcares además de los mencionados (16). Estos resultados no han sido confirmados totalmente y hay bastantes excepciones.

Estudios realizados con azúcares radioactivos, ya sea incorporados "in vivo" o en cultivo de células, han aportado gran información sobre el lugar y la secuencia de la transferencia de éstos a las proteínas (17)(18)(19)(26).

Redman y col. (20) proponen para la biosíntesis de las glicoproteínas del suero, que ocurre en el hígado de rata, una secuencia de las distintas transferencias cuyo esquema se muestra en la Fig. 1. El primer azúcar, que en el caso de estas glicoproteínas es la N-acetilglucosamina, se une posiblemente cuando la molécula de proteína aún se está sintetizando y se encuentra por lo tanto unida al polisoma (etapa b). Luego que

la proteína está sintetizada se unirían otras moléculas de N - acetilglucosamina y probablemente también de manosa(etapa c y d). En el retículo endoplasmático liso se incorporan otras moléculas de manosa y N-acetilglucosamina así como también de galactosa (etapa e). Finalmente en el aparato de Golgi el oligosacárido se completaría con la incorporación de otras moléculas de galactosa y también de ácido siálico y fucosa(etapa f).

Algunos autores han observado la presencia de manosiltransferasas tanto en el retículo endoplasmático rugoso como en el liso (21) (22). También se ha determinado actividad de glicosiltransferasas en preparaciones de microsomas de distintos tejidos en los cuales los poliprenoles-fosfatos podrían actuar como aceptores intermediarios de estos azúcares(23) (24) (25). Esto será estudiado más adelante.

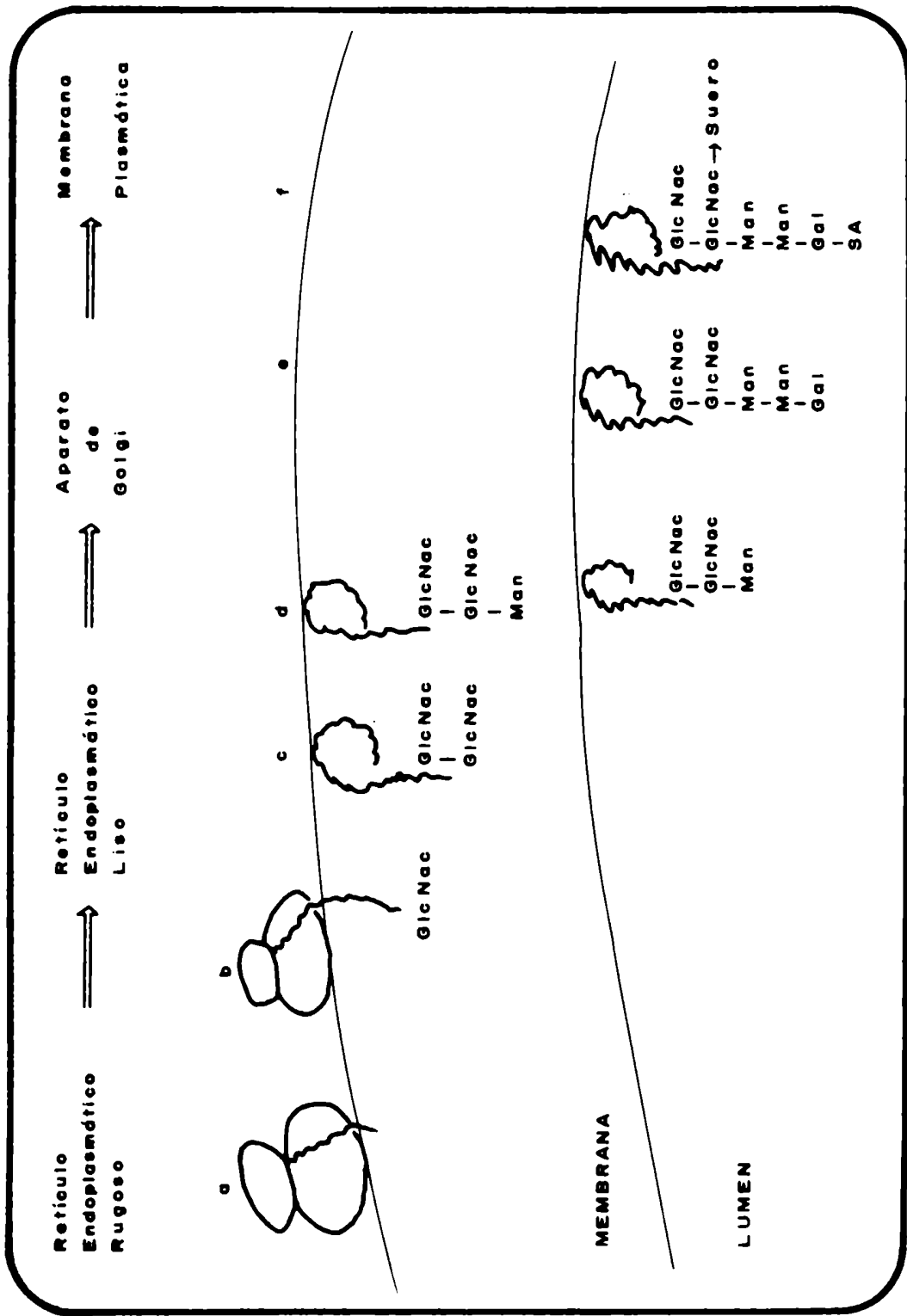


Fig. 1 - Representación esquemática de la síntesis de las glicoproteínas de suero, de acuerdo a Redman y col, (20).

TIPOS DE UNION AZUCAR-PÉPTIDO

Los carbohidratos están unidos a las cadenas peptídicas en forma de oligosacáridos de tamaño variable.

Uno de los problemas importantes en el estudio de la estructura de las glicoproteínas es la determinación de la naturaleza de la unión azúcar-aminoácido. Distintos tipos de uniones glicopeptídicas han sido determinadas por diferentes métodos y éstas pueden reunirse en dos grandes grupos: I) Unión O-glicosídica y II) Unión N-glicosídica.

La Fig. 2 muestra los dos tipos de unión. En A se observa la unión entre la galactosa y la hidroxilisina y en B la N-acetilgalactosamina y o la xilosa con el grupo hidroxilo de la serina o treonina. Ambos corresponden al grupo O-glicosídico.

El segundo grupo corresponde al tipo de unión N-glicosídica, que es más abundante, y se realiza entre la N-acetilglucosamina y la asparragina. La hexosamina está unida por su grupo reductor a la función amida de este aminoácido.

No se ha encontrado una relación estructural entre los aminoácidos y los azúcares que participan de estos tipos de uniones covalentes. Cuando se observa los tripletes de bases que forman los codones para estos aminoácidos, se encuentra que en el caso de la asparragina es AAU y AAC, mientras que en la serina es AGU y AGC, en la treonina es ACU y ACC y en la lisina es AAA y AAG. Jet (27) propone relaciones filogenéticas entre los distintos tipos de uniones de los azúcares con los aminoácidos que involucrarían a la asparragina como el más primitivo tipo de unión.

A) Tipo de unión galactosa-hidroxilisina.

La unión galactosa-hidroxilisina representa uno de los grandes grupos en que los carbohidratos están unidos a proteínas. El disacárido unido al grupo hidroxilo de este aminoácido es el α -D-glicosilgalactosa.

Este tipo de unión se encuentra en una gran variedad de colágenos de vertebrados(28) y de invertebrados(29). También se encuentra en las membranas basales, entre las que debemos mencionar, la del glomérulo renal (30) y la de la cápsula del cristalino, (31) (32). Estas membranas tienen un gran número de hidroxilisina que en un alto porcentaje está unida a carbohidratos. El azúcar es principalmente el disacárido formado por galactosa y glucosa.

La transferencia de estos azúcares está catalizada por dos glicosiltransferasas específicas (33) (34) que transfieren estos carbohidratos desde sus respectivos nucleótido-azúcares.

B) Tipo de unión con serina o treonina.

Dentro del grupo de glicoproteínas con unión O-glicosídica tenemos además del colágeno, aquellas en que el aminoácido puede ser la serina o la treonina, entre los que se encuentran el condroitin sulfato y las mucinas submaxilares.

Este tipo de unión ha sido estudiada en detalle por Roseman y col. (10) en las mucinas submaxilares de oveja y cerdo. Ambas son un buen ejemplo de como estas glicoproteínas son sintetizadas por adiciones sucesivas de carbohidratos, a partir de los nucleótido-azúcares respectivos, catalizados por glicosiltransferasas específicas.

En la parte superior de la Fig. 3, se observa el mecanismo de síntesis de la mucina submaxilar de oveja (35). En la parte inferior se muestra la síntesis del oligosacárido de la

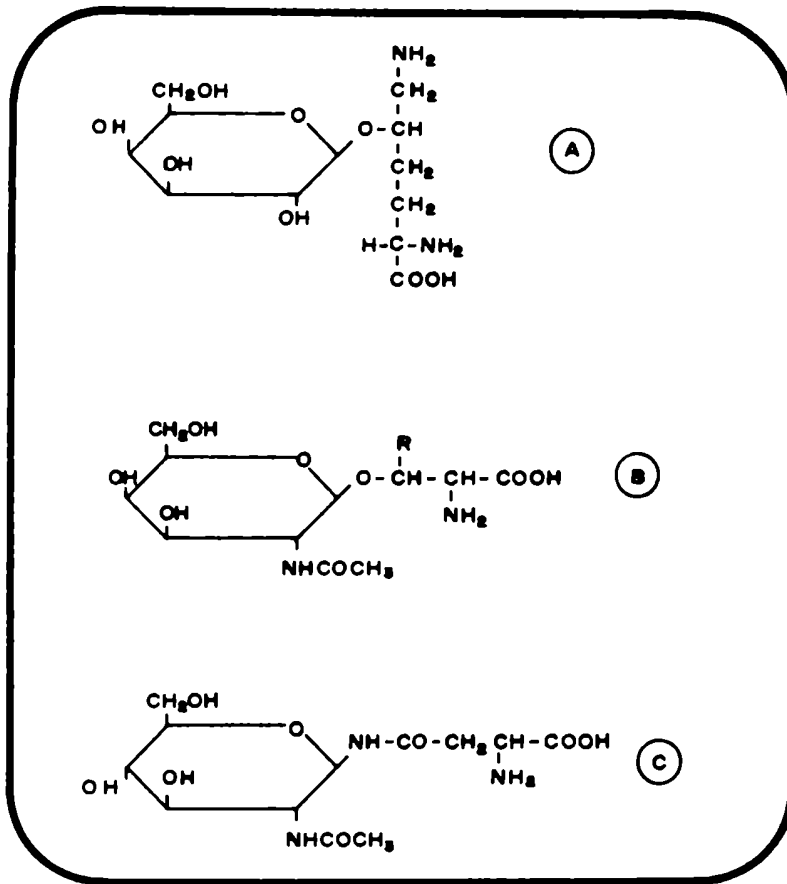


Fig. 2 - Tipo de Unión Azúcar-aminoácido
A - Hidroxilisina- galactosa
B - Serina o treonina-N-acetilgalactosamina
C-- Asparragina-N-acetilglucosamina

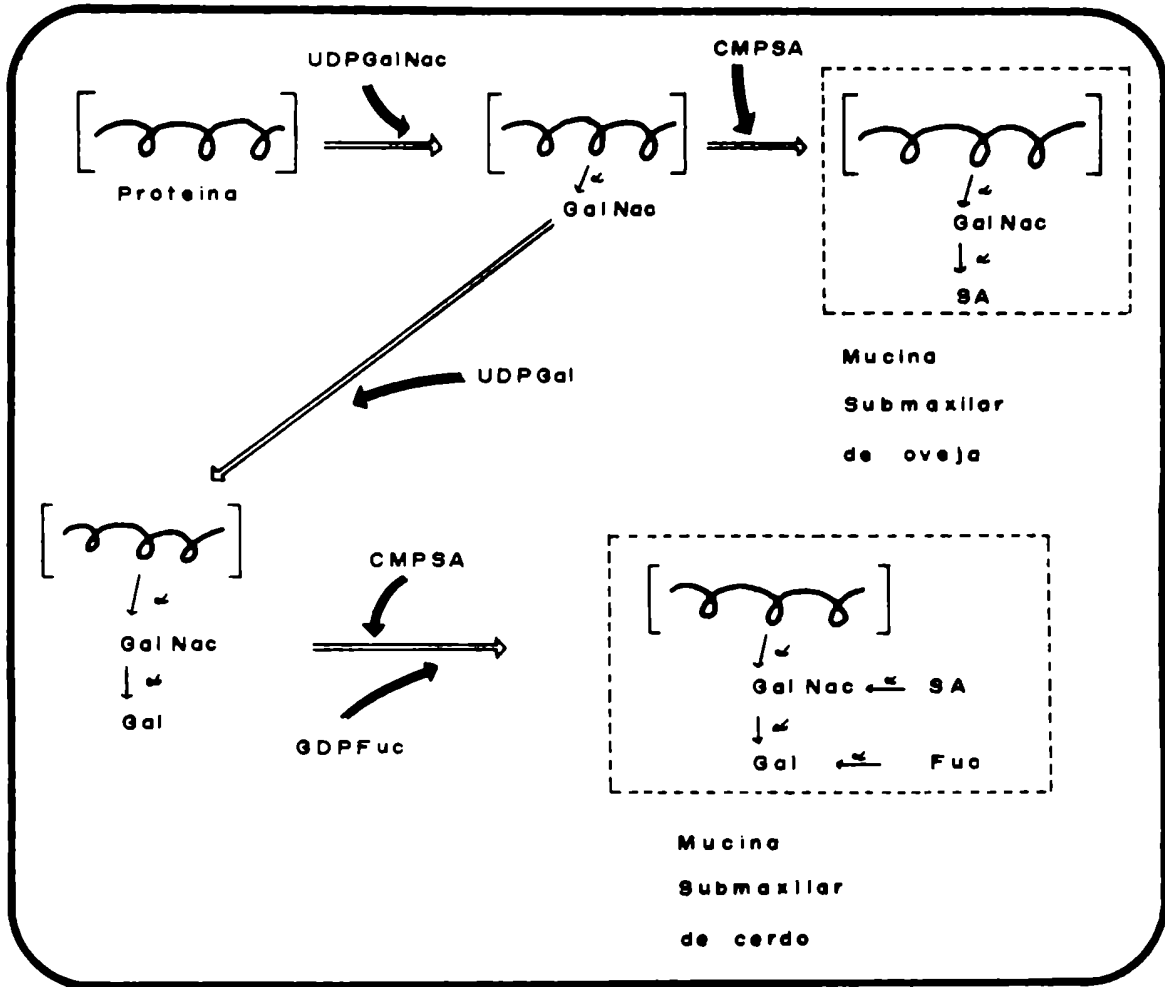
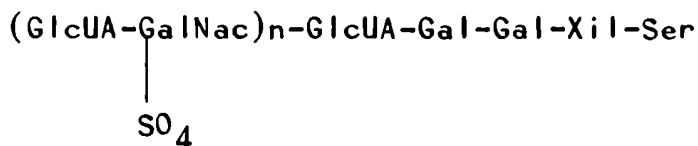


Fig. 3. Síntesis del oligosacárido de la mucina submaxilar de oveja y cerdo, de acuerdo a Roseman y col (10).

de cerdo. En este caso la cadena de azúcar es más compleja. El oligosacárido puede tener actividad de grupos sanguíneos A y H (36). La actividad del grupo A ocurre cuando otra molécula de N-acetilgalactosamina se une a la galactosa (37). Se adquiere actividad de grupo B si se transfiere galactosa en lugar de la N-acetilgalactosamina (38). La presencia de estas transferasas depende de los genes para A y B respectivamente. Cuando la fucosa es agregada se forma el grupo sanguíneo H. Esta reacción es catalizada por la fucosiltransferasa y su presencia depende del gen H (39).

En el condroitin sulfato la unión O-glicosídica se realiza entre la xilosa y el grupo hidroxilo de la serina (40) (41).

La transferencia de xilosa del nucleótido-azúcar a aceptores endógenos fue observada en preparaciones libres de células de oviducto de gallina (42) y cartílago de las epífisis de pollo (43). Esta reacción es la primera en la secuencia de la síntesis de la cadena de carbohidratos de estos proteoglicanos. Su secuencia representa en el esquema siguiente:



Un nuevo tipo de unión azúcar-treonina ha sido recientemente descrito por el grupo de Lundbland. El azúcar es la fucosa y esta unión fue estudiada en oligosacáridos presentes en orina humana normal. El estudio del análisis de azúcares y aminoácidos muestra que está formado por glucosa, fucosa y treonina en cantidades equimoleculares. También estudiaron la secuencia y la configuración anomérica (44), siendo la siguiente:

β -D-glucopiranosil-(1-3)- β -L-fucopiranosil-(1-0)-L-treonina

C) Tipo de unión asparragina-N-acetilglucosamina.

Este tipo de unión se caracteriza por ser N-glicosídica. La N-acetilglucosamina está unida al grupo amido de la asparragina por un enlace N-glicosídico. Esta unión fue determinada por la aislación del N-acetilglucosaminil-asparragina, (2-acetoamido 1 (L- β -aspartamida)-1-,2-di-deoxi- β -D-glucosa), de ovoalbúmina y también por síntesis química (45). Esta unión se caracteriza por ser estable a tratamientos suaves con álcali y con ácido (46).

La Tabla II, muestra los oligosacáridos de algunas de las numerosas glicoproteínas que contiene este tipo de unión. Los azúcares característicos son la N-acetilglucosamina y la manosa, conteniendo también galactosa, siálico y fucosa.

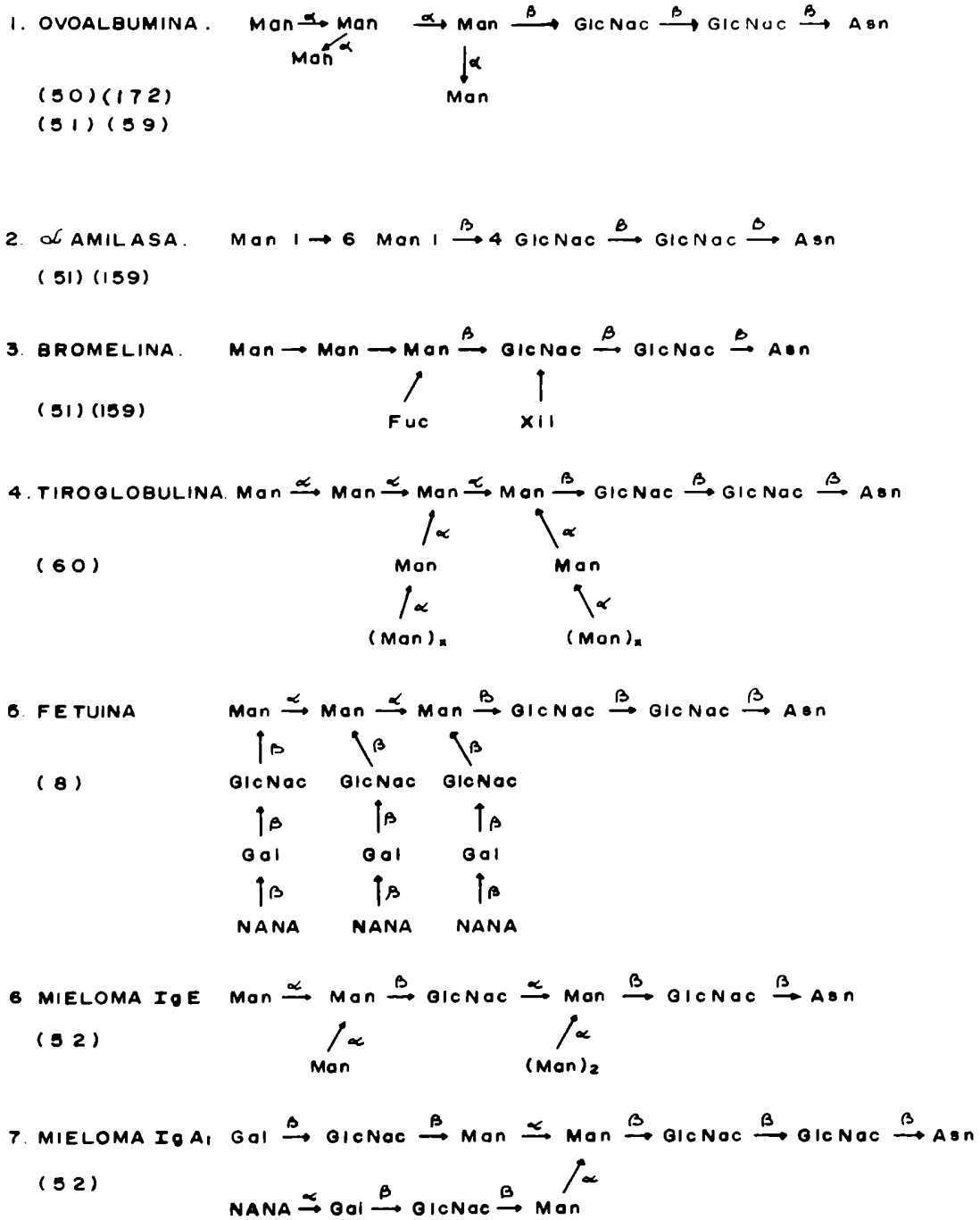
La distribución biológica de las glicoproteínas que poseen este tipo de unión es muy amplia, tanto en plantas como en animales. Se las encuentra en algunas hormonas(53),(54); inmunoglobulinas (52) (55)(56)(57); ribonucleasa (58); ovoalbúmina (59); tiroglobulina (60); glicoproteínas del plasma(3) (5) (48) (49).

La asparragina está unida en todos los casos bien estudiados, con la excepción del oligosacárido descrito por Kornfeld,(52), al disacárido formado por dos moléculas de N-acetilglucosamina que constituyen la di-N-acetilquitobiosa. Este compuesto es la unidad estructural de la quitina; un polisacárido que se encuentra en el exoesqueleto de los artrópodos, en otros invertebrados, así como también en bacterias y hongos.

Además, en los casos en que la estructura ha sido bien dilucidada, hay una manosa unida a la N-acetilglucosamina no

TABLA II

ESTRUCTURA DE ALGUNOS OLIGOSACARIDOS UNIDOS A ASPARRAGINA.



reductora de la di-N-acetilquitobiosa, constituyendo una unión β (1 - 4).

En este tipo de glicoproteínas los estudios de biosíntesis han sido enfocados sobre los azúcares de la porción terminal de los oligosacáridos. Estos son agregados directamente de los nucleótido-azúcares respectivos catalizadas por glicosil-transferasas específicas (62).

En cambio el estudio de la biosíntesis de la porción más interna de estos oligosacáridos no ha sido dilucidada todavía (9) (63). Más adelante se va a discutir el posible rol de los poliprenoles-fosfatos en la síntesis de esta porción.

POLIPRENOLES

El descubrimiento de los lípidos intermediarios y el conocimiento de su participación en las reacciones de transferencia de azúcares, constituye en la bioquímica de los hidratos de carbono, uno de los hechos más salientes de la década del 60. Su importancia podría ser comparada en cierto sentido, con el enorme aporte que el descubrimiento de los nucleótido-azúcares significó en la comprensión del metabolismo y estructura de los hidratos de carbono.

Los lípidos intermediarios han y están aportando enormes progresos en el conocimiento de la estructura y de los mecanismos de la biosíntesis de polisacáridos y de algunas glicoproteínas asociadas a membranas en su localización o en su biogénesis.

Los primeros estudios fueron realizados sobre la biosíntesis de los polisacáridos que forman las paredes bacterianas. Estos estudios se han extendido también a otros organismos vivos como los vegetales. Ultimamente se han centrado en tejidos animales donde se ha observado la importancia de estos compuestos como intermediarios en la transferencia de moléculas de azúcar (112) (142).

Los lípidos intermediarios están constituidos por una cadena hidrofóbica formada por varias unidades de isopreno, una de las cuales contiene una función alcohol primario (Tabla III) Los ésteres fosfóricos de estos poliprenoles, tanto los mono - como los difosfatos, son de gran importancia biológica(65) (66) como veremos más adelante.

El número de unidades de isopreno varía entre 5 y 24. Estos compuestos pueden encontrarse en la forma cis o trans.(67).

En general los poliprenoles son de dos tipos: unos que contienen solamente la forma trans y otros que presentan ambas formas. Estos últimos son los más abundantes en la naturaleza y se extraen generalmente como mezclas o familias que se diferencian entre sí por el número de residuos cis.

Con respecto al grado de saturación se ha observado que los organismos eucariotes contienen un isopreno saturado que corresponde a la unidad α , que es la que contiene el grupo alcohólico.

Hemming y col. (68), en Liverpool, encontraron en el hígado de cerdo un poliprenol cuyo número de unidades isopreno variaba de 17 a 24. Este poliprenol fue denominado dolicol, (del griego, dolikos=largo), debido al largo de la cadena. Posteriormente se encontraron otros dolicoles en distintos organismos los cuales pueden diferenciarse entre si por el número de unidades de isopreno. Actualmente el término dolicol designa a los poliprenoles que tienen la unidad isopreno α saturada y que contienen además dos residuos en la forma trans.

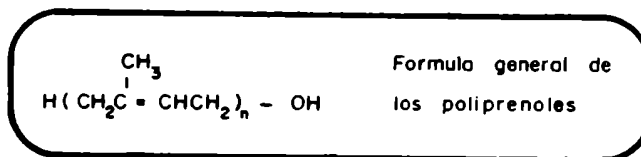
La saturación del residuo isopreno hace que la cadena sea más hidrofóbica y ésto podría jugar un importante papel biológico ya que estos compuestos actúan en las regiones hidrofóbicas de las membranas (69).

Los poliprenoles se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Tabla III). Se denominan generalmente de acuerdo a la fuente de donde son extraídos. El largo de la cadena es variable, así como también la presencia de forma cis y trans. En los tejidos animales y en levaduras son de tipo di-trans, poli-cis.

La concentración de estos lípidos varía en los distintos órganos. El dolicol se encuentra en mayor concentración en hígado

TABLA III

Formula , estructura y fuente de algunos Poliprenoles



NOMBRE	FUENTE NATURAL	ESTRUCTURA	REFERENCIA
Betulaprenol	Abedul	I - T-T-C - [C] - C - OH ₍₁₋₄₎	(147)
Bactoprenol	Bacteria	I - T-T-C - [C] - C - OH ₍₅₋₇₎	(76)
Dolicol	Levadura	I - T-T-C - [C] - S - OH ₍₉₋₁₃₎	(148)
	Mamiferos	I - T-T-C - [C] - S - OH ₍₁₂₋₁₆₎	(67)
Ficaprenol	Hojas verdes	I - T-T-T-C - [C] - C - OH ₍₄₋₈₎	(149)
Hexahidropolipreno	Aspergillus fumigatus	S - S - T-T - [C] - S - OH	(150)
Solanesol	Hojas verdes	I - S - T-T - [T] ₄ - T - OH	(154)

I = residuo de isopreno, T = residuo de isopreno Trans,

C = residuo de isopreno Cis, S = residuo de isopreno Saturado(dihidro).

do (70-140 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) en menor concentración en bazo y riñon y menos de 5 $\mu\text{g/g}$ de peso seco en cartílago y músculo esquelético (69).

Estudios realizados por Dalner y col (70) mediante el fraccionamiento celular de hígado de rata muestran que la mayor concentración de dolicol-mono-fosfato corresponde a la fracción que contiene núcleos, seguida de aparato de Golgi y microsomas.

PAPEL DE LOS POLIPRENOLES EN LA SINTESIS DE LOS GLICANOS DE LA PARED BACTERIAL

Los primeros estudios sobre el papel de los lípidos intermediarios en la biosíntesis de polisacáridos fueron realizados en bacterias. En 1959 Colvin (71) demostró que la presencia de una sustancia soluble en alcohol era necesaria para la síntesis de celulosa por fracciones particuladas de Acetobacter xylinum.

Entre los años 1964-65 simultáneamente y en forma independiente los grupos de Robbins, Strominger y Osborn demostraron que los prenoles intervenían en la síntesis de los polisacáridos de la pared bacteriana (66) (72) (74) (64).

El lípido involucrado en la transferencia de azúcares en estos casos es el undecaprenol-fosfato. Este compuesto es un poliprenol de once unidades de isopreno con un alcohol alílico en el isopreno α de la cadena (76).

Este lípido intermediario es responsable de las síntesis de varios tipos de polisacáridos de la pared bacteriana, entre los que se destacan:

- a) Péptidoglicanos (76)
- b) Lipopolisacáridos (66) (73) (74) (80)
- c) Polisacáridos capsulares (82) (83) (109)
- d) Polimananos (84) (101)
- e) Ácidos Teicoicos (86) (87)

En la Fig.4 se presenta como ejemplo de polisacárido de la pared bacteriana, la estructura del O-antígeno de Salmonella sp. (90) (91) (92).

La parte más externa del lipopolisacárido es el O-antígeno. Este está formado por diferentes azúcares según la es-

especie unidos entre sí en forma de oligosacáridos. Estos componen la unidad estructural del polisacárido de alto peso molecular. La estructura de cada antígeno-O varía con el sero tipo del organismo del cual fue aislado. En *Salmonella newington* el oligosacárido que forma la unidad repetitiva esta constituido por 3 azúcares que son: galactosa, ramnosa y manosa.

La Fig. 5 muestra el mecanismo de biosíntesis del O-antígeno en *S. newington*, estudiado por Robbins y col. (88) (89) (93). En este esquema se muestra la formación del poliprenol trisacárido. Estas reacciones son catalizadas por glicosiltransferasas específicas asociadas a las membranas. La primer reacción consiste en la transferencia de la galactosa-fosfato al undecaprenol-monofosfato. Se forma el undecaprenol-difosfato-galactosa que es el primer lípido-azúcar-intermediario en este camino biosintético. Otras glicosiltransferasas específicas transfieren la ramnosa y manosa de sus respectivos nucleótido-azúcar para formar el lípido-trisacárido.

La segunda etapa consiste en la polimerización del trisacárido que es la unidad repetitiva del polisacárido (81). Finalmente el polisacárido es transferido formando el lipopolisacárido (97).

Este esquema de biosíntesis muestra que los azúcares no son transferidos directamente al producto final (polisacárido) sino a un compuesto intermediario (lípido-trisacárido). Este a su vez, luego de polimerizarse, se transfiere a la región central para formar el lipopolisacárido.

Dankert y col., (77), han descripto la formación de lípido-azúcares con preparaciones de *Acetobacter xylinum*, observándose la formación de lípido-P-P-glucosa, lípido-P-P-celobiosa y lípido-P-galactosa.

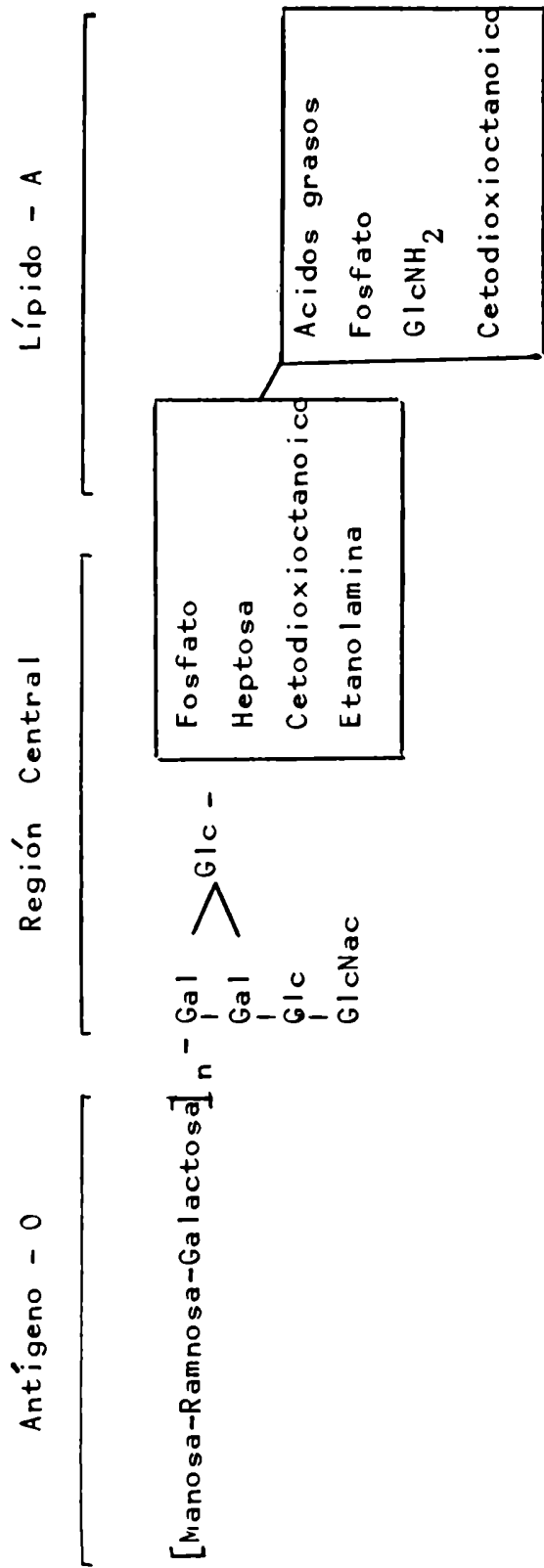


Fig. 4 Esquema de la estructura del lipopolisacárido de Salmonella newington

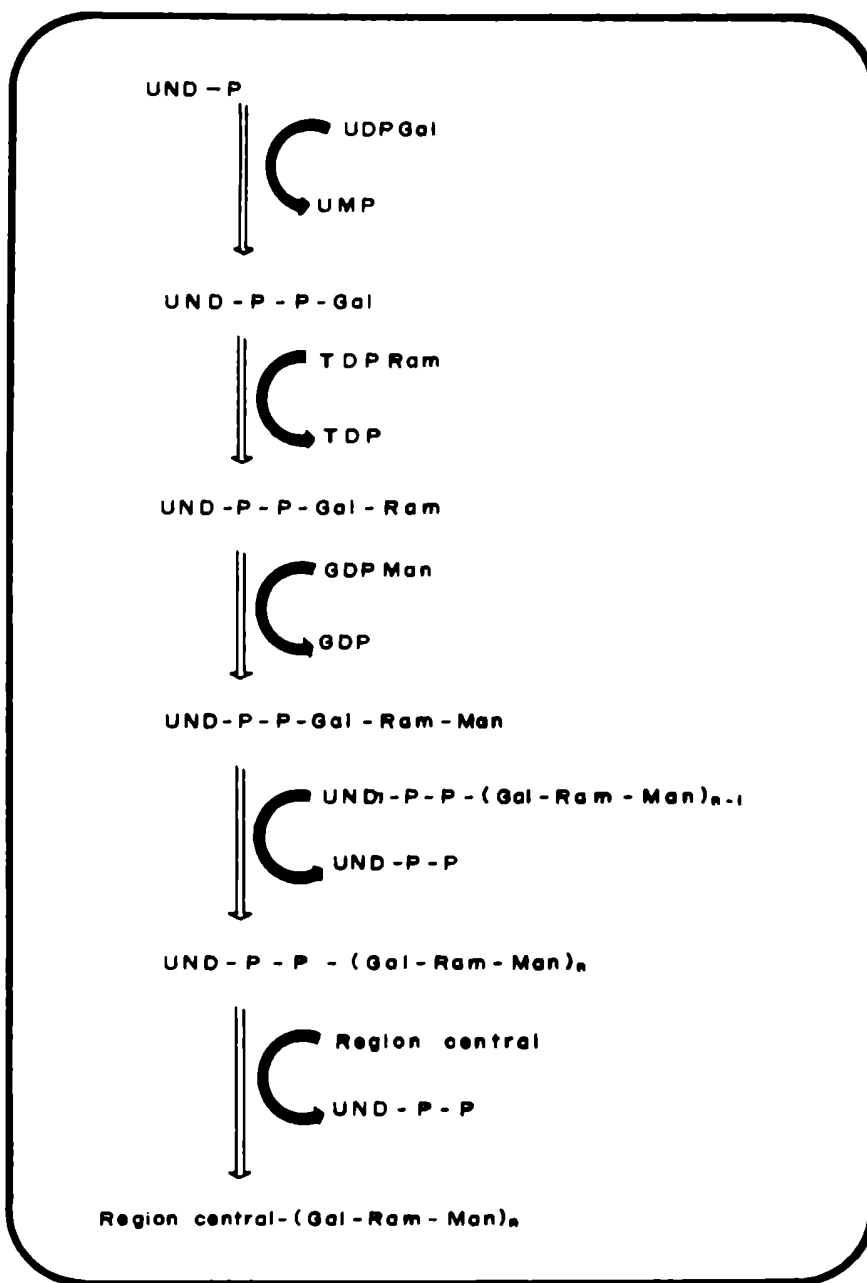


Fig. 5 - Esquema de la síntesis del determinante antigénico "O" de S. newington. (UND= Undecaprenol)

PAPEL DE LOS POLIPRENOLES EN LA SINTESIS DE GLICANOS EN LEVADURAS Y PLANTAS

Tanner y col, (85) (130), trabajando con preparaciones particuladas de Sacharomyces cervisiae sintetizaron un manolípido, ácido lábil, a partir de GDPMan. La formación de este compuesto es estimulada por el agregado de dolicol-P aislado de hígado de cerdo. La manosa del manolípido puede ser transferida a una proteína.

En vegetales superiores se ha mostrado también la presencia de lípido-azúcares. Se han aislado varios poliprenoles entre los cuales se puede mencionar el ficaprenol, betulaprenol y dolicol (69).

Trabajando con preparaciones particuladas de Phaseolus aurens, los grupos de Kauss (78) Willemetz (79) (138) y Hemming (139) han observado la transferencia de manosa a un lípido aceptor endógeno. También ha sido demostrado por Forsee y col. (47), la transferencia de manosa y glucosa, de sus respectivos nucleótido-azúcar, con preparaciones particuladas de fibras de algodón. Esta transferencia es también estimulada por el agregado de extractos orgánicos de ese mismo material biológico.

Recientemente, Pont Lezica y col., (173) han estudiado la transferencia de glucosa a un lípido aceptor de germen de trigo y de soja. Los resultados obtenidos sugieren que el lípido aceptor, que es ácido lábil y tiene propiedades cromatográficas similares al dolicol-P de hígado, es un poliprenol α saturado.

PAPEL DE LOS LIPIDOS INTERMEDIARIOS EN LA BIOSÍNTESIS DE GLICO PROTEINAS EN ANIMALES SUPERIORES.

Los primeros indicios sobre la formación de un posible lípido-azúcar intermediario en la síntesis de glicoproteínas fueron obtenidos por el grupo de Eylar y col. (22). Estos investigadores observaron la transferencia de manosa C^{14} desde el GDPMan radioactivo a un lípido ácido lábil y también a proteína. Esta reacción es catalizada por retículo endoplasmático de hígado de conejo. Un manolípido similar fue encontrado por Zatz y col. (94) con microsomas de cerebro de ratón. Paralelamente Tetas y col. (95) y Malnar y col. (96) encontraron la formación de lípidos unidos a galactosa con hígado de conejo y sugirieron su posible papel en la síntesis de las glicoproteínas.

En este Instituto los Drs. Leloir y Behrens (23) identificaron y aislaron por primera vez un lípido-azúcar intermediario. Incubando microsomas de hígado de rata con UDPGlc, marcado en glucosa, observaron la transferencia de ésta a un compuesto soluble en cloroformo metanol. La formación de este glicolípido era estimulado por el agregado a la mezcla de incubación de Mg^{++} , detergente y un extracto de hígado de cerdo. Este extracto lipídico fue purificado y su espectro en IR era similar al de los poliprenoles.

El poliprenol purificado parecía ser dolicol-monofosfato. Para verificarlo estos investigadores purificaron dolicol de hígado y lo fosforilaron químicamente por el método de Cramer (98) y Popjack (99). La Fig.6 muestra la estructura del dolicol. Cuando incubaron el nucleótido-azúcar radiactivo con el dolicol fosfato en cantidades crecientes observaron que la síntesis del lípido-azúcar aumenta proporcionalmente. Esto sugirió que el aceptor de la glucosa es el dolicol-fosfato y la

reacción correspondiente se puede escribir de la siguiente forma:



El dolicol-monofosfato-glucosa es ácido lábil y por hidrólisis ácida suave libera unicamente glucosa radioactiva.

Otro hecho importante es que si la preparación de microsomas era incubada con UDPGlc marcado con ^{32}P no se obtenía glucolípidos radioactivos. Esto confirma que el poliprenol-azúcar contiene solamente un fosfato y que solo se transfiere el azúcar (23).

También se pudo sintetizar el dolicol-monofosfato de manosa y el de N-acetilglucosamina (100). La formación del dolicol-monofosfato-manosa es posteriormente estudiada por el grupo de Hemming (24) quien obtiene este lípido azúcar en cantidades suficientes para hacer determinaciones químicas. Mediante estudios de la porción lipídica por infrarrojo y resonancia magnética nuclear estos autores pudieron comprobar que se trataba de dolicol-monofosfato (102) (139) (140).

Cuando se incubó dolicol-P-glucosa con microsomas de hígado de rata (23) la radioactividad disminuyó notablemente de la fase cloroformo metanol donde este compuesto es soluble. La reacción se detuvo por el agregado de cloroformo:metanol:agua en la proporción 3:2:1. Se formaron dos fases. La fase inferior u orgánica estaba constituida por cloroformo metanol y en ésta es soluble el dolicol-P-glucosa. La fase superior es polar (metanol:agua:cloroformo 16:16:1). Entre estas fases se encuentra una interfase sólida formada por la proteína microsomal desnaturalizada. En esta interfase se encuentra ahora la

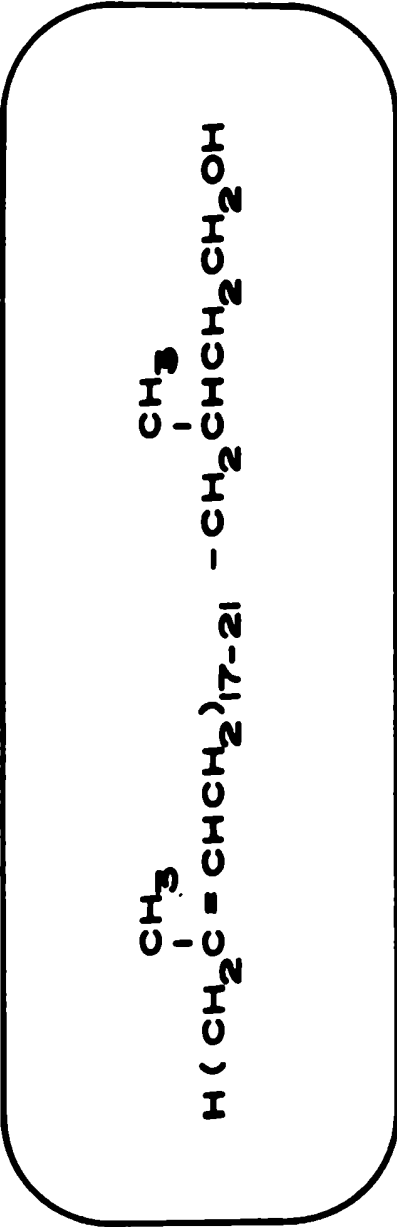


Fig. 6 - Estructura del dolicol de hígado, tomada de Burgos y Col, (68).



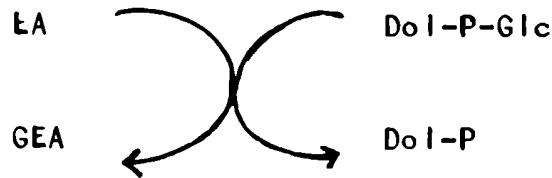
mayor parte de la radioactividad que provenía del dolicol-P-glucosa. Este compuesto, debido a su insolubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos, se pensó que se trataba de una proteína glucosilada, Estudios posteriores realizados en el Instituto por Behrens y col., demostraron que este compuesto puede ser extraído de la interfase proteica con una mezcla de cloroformo:metanol:agua 10:10:3 (104).

Este nuevo compuesto es también un lípido-azúcar ácido lábil y los productos de la hidrólisis ácida suave son solubles en agua. Cuando se estudia su comportamiento en columnas de Sephadex G 50 se observa que se eluye como compuestos de alrededor de 3500 daltons. Corresponde a un oligosacárido que posee entre 17 a 20 unidades de hexosas. Estos resultados fueron también confirmados por su movilidad en cromatografía en papel comparándolos con maltooligosacáridos de glucosa (105).

Cuando este lípido-oligosacárido es tratado con álcali se libera un producto de aproximadamente igual peso molecular que el obtenido por hidrólisis ácida suave pero que está cargado negativamente. Esta carga desaparece luego de incubarlo con fosfatasas, lo que indica que corresponde a un grupo fosfato.

Por cromatografía en DEAE-celulosa este lípido-oligosacárido se eluye como los prenol-pirofosfatos, diferenciándose muy bien del dolicol-monofosfato-glucosa (104) (106).

Todos estos hechos hicieron pensar a Leloir y col. (108) que el dolicol-monofosfato-glucosa transfería su azúcar a un aceptor endógeno, (E A), el cual sería un dolicol-pirofosfato oligosacárido. Se forma un nuevo lípido intermediario en el cual el oligosacárido tiene una o dos glucosas más. Este nuevo compuesto fue denominado GEA (aceptor endógeno glucosilado) y la ecuación que representa su síntesis sería:



El oligosacárido de GEA pudo ser transferido a una proteína microsomal. La glicoproteína obtenida es solubilizada únicamente con tratamientos muy drásticos. Cuando se la digiere exhaustivamente con enzimas proteolíticas se obtiene un glucopéptido cuyo peso molecular es similar al del oligosacárido obtenido de GEA.

A fin de determinar la posición de la glucosa transferida, el oligosacárido de GEA fue tratado con NaBH_4 . Luego de reducido, el oligosacárido es hidrolizado completamente y los productos son cromatografiados en papel observándose que la radioactividad tiene la misma movilidad que la glucosa. Ello indicó que la glucosa transferida no se encuentra en el extremo reductor (108).

El número de residuos de glucosa transferidos fue estudiado oxidando el oligosacárido con periodato y determinando el porcentaje de ácido fórmico radioactivo formado. Estos resultados indicaron la posibilidad de que sean dos las glucosas transferidas.

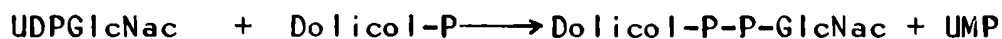
El oligosacárido de GEA por electroforesis en papel se comporta como un compuesto neutro. Pero cuando es tratado con álcali fuerte y se somete a electroforesis aparecen dos picos cargados positivamente. Uno de ellos aparece a los 30 minutos del tratamiento y el otro a los 60 minutos. Estos resultados

pueden explicarse por la presencia de dos moléculas de N-acetilhexosaminas, las que podrían encontrarse en el extremo reductor de la cadena del oligosacárido (103).

Como ya se mencionó Behrens y col.(100), encontraron que los microsomas de hígado catalizan la formación de un lípido-azúcar a partir de UDPGlcNac radioactiva. Por analogía a lo que ocurría en el caso del lípido azúcar que contenía glucosa y/o manosa lo describieron como dolicol-monofosfato-N-acetilglucosamina.

Posteriormente Molnar y col.(95) incubaron microsomas de hígado de rata con ($\beta^{32}\text{P}$) UDP (^{14}C) N-acetilglucosamina y lípido aceptor y observaron que además de la GlcNac el fosfato también se transfería al lípido en cantidades equimoleculares. Si el lípido aceptor contenía ya un fosfato se podría suponer la formación de un enlace pirofosfato. En apoyo de esta suposición está el hecho encontrado por estos autores de que el UMP inhibe la reacción.

Leloir y col.(110) confirmaron los experimentos de Molnar por otro camino. Si se cromatografía el lípido unido a la N-acetilglucosamina en columnas de DEAE-celulosa, que permite la separación de los prenil-azúcares con un fosfato de los difosfatos, éste, eluye en la zona de los prenil-pirofosfato-azúcares (110). Estos hechos indican que el lípido-azúcar, sintetizado en hígado, es un dolicol-pirofosfato-N-acetilglucosamina. Entonces la reacción de transferencia se puede escribir de la siguiente manera:



Al mismo tiempo Leloir y col.(110) observaron que este lípido-azúcar puede aceptar también otra molécula de N-acetilglucosamina proveniente del UDPGlcNac para formar el dolicol-pirofosfato-di-N-acetilquitobiosa. Este disacárido es de gran

importancia por ser un constituyente de la porción más interna de los oligosacáridos de numerosas glicoproteínas. La unión as parragina di N-acetilquitobiosa se encuentra en la tiroglobulina (60), ovoalbúmina (59) y otras glicoproteínas (8). Podría ser un intermediario también en la biosíntesis del oligosacári do de GEA el cual contiene dos hexosaminas (108). Este lípido disacárido fue también sintetizado con preparaciones de pan - creas (145) y, recientemente ha sido sintetizado químicamente por Strominger y col. (146).

Posteriormente Behrens y col. (111) incubando GDPMan radi oactivo con dolicol-P y microsomas de hígado de rata observaron que el mayor producto formado es el dolicol-monofosfato-mana nosa. Luego de la incubación si se realiza una hidrólisis ácida suave, y los productos de la misma se cromatografían en papel, la mayor parte de la radioactividad corresponde a la manosa y una pequeña cantidad a oligosacáridos que contienen manosa radioactiva. Si en esta incubación se agrega también aceptor lipídico la formación de los oligosacáridos de manosa se incremen ta. Por cromatografía en papel migran como maltooligosacári dos que contienen entre 5 a 16 residuos de hexosas. En cromatogra fía en DEAE-celulosa eluyen en la zona correspondiente a los prenoles-pirofosfatos. Por tratamiento con álcali fuerte se comportan en electroforesis igual que el oligosacárido de GEA, dando dos picos cargados positivamente. Esto indica la presencia de dos hexosaminas.

La transferencia de manosa a estos lípidos aceptores podr ía ser a partir del GDPMan o del dolicol-P-manosa o de ambos.

Algunos de estos lípido-oligosacáridos de manosa constitu irían el aceptor endógeno(EA) , al cual el dolicol-P-glucosa

transferiría su azúcar para formar el GEA. Este aceptor endógeno no manosilado podría contener otros azúcares además de las hexosaminas y manosas.

Recientemente se ha podido purificar el GEA y determinar por cromatografía de gases, su composición cuantitativa en azúcares (167), la cual es:



Tanto el aceptor endógeno manosilado como el GEA pueden transferir su porción carbohidrato a proteínas (111) (107).

La Fig.7 esquematiza la formación del oligosacárido de GEA y su transferencia a una proteína todavía desconocida. Este mecanismo podría ser universal para la biosíntesis de las glicoproteínas que poseen el tipo de unión asparragina-N-acetilglucosamina (112).

FINALIDAD DE LA PRESENTE INVESTIGACION

El objeto de este trabajo consiste en estudiar las primeras etapas de la síntesis de los oligosacáridos de las glicoproteínas que poseen la unión entre la asparragina y la N-acetilglucosamina.

De acuerdo a lo encontrado en el Instituto se podía predecir la existencia de una manosil transferasa que catalizara la transferencia de manosa al dolicol-P-P-di-N₁-acetilquitobiosa. Este lípido de quitobiosa, como ya se ha mencionado, fue sintetizado con preparaciones de hígado por Leloir y col. (110). Por otro lado, estos autores, también estudiaron la transferencia de manosa a lípidos endógenos de hígado de rata, los que poseen también dos N-acetilhexosaminas (111). Lo que aún faltaba era unir experimentalmente estos dos hallazgos, lo que fue el objeto de esta tesis.

Para este estudio se trabajó con preparaciones particuladas de oviducto de gallina. El 70% de las proteínas solubles sintetizadas en este tejido corresponde a la ovoalbúmina. Este compuesto posee un oligosacárido cuya estructura es relativamente simple y está formado únicamente por manosa y N-acetilglucosamina.

La Figura 7 esquematiza el mecanismo propuesto para la síntesis de estos oligosacáridos. En el presente trabajo se centra el estudio en las tres primeras etapas.

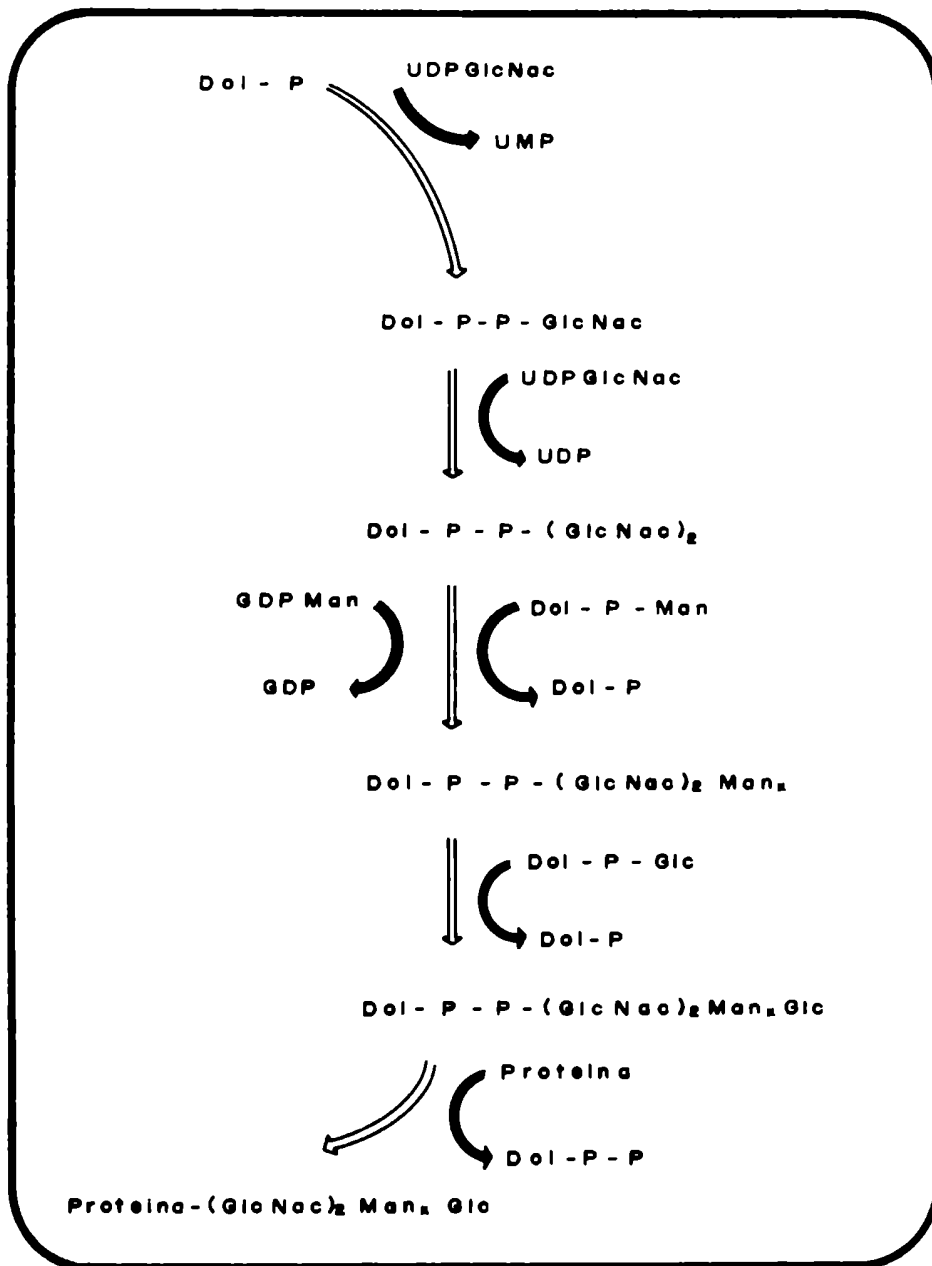


Fig.7 -Esquema de la biosíntesis del Dol-P-P-(GlcNac)₂ Man Glc (GEA) y una glicoproteína, propuesto por Behrens (112).

II MATERIAL Y METODOS

I. REACTIVOS

UDPGlcNac ^{14}C y GDPMan ^{14}C , son obtenidos de New England Nuclear Corporation (USA). UDPGlcNac, GDPMan, Tris(base libre), EDTA, GlcNH₂, GlcNac, mercaptoetanol, p-nitrofenil glucósidos se obtienen de Sigma Chemical Company. Deoxicolato de sodio, ácido silícico y concanavalina A son compradas en Calbiochem (USA). Bio-gel, Dowex 50 X 4 y DEAE-celulosa son obtenidos en Bio-Rad Laboratory (USA) y Serva (Alemania) respectivamente. Sephadex es adquirido en Pharmacia.

La di-N-acetilquitobiosa fue cedida gentilmente por el Dr. Luis F. Leloir. Había sido preparada de acuerdo con el método de Arima y col. (60), a partir de quitina.

Todas las otras drogas empleadas son de origen diverso y siempre de alto grado de pureza.

2. METODOS ANALITICOS

a) Proteínas

La determinación de proteínas se efectuó de acuerdo al método de Lowry y col. (113), con albúmina de suero bovino como estandar.

B) Intercambiadores Iónicos

La DEAE-celulosa es lavada y ajustada al pH utilizado de acuerdo al método de Peterson y Sober (114).

Dowex 50 (H⁺) es lavada previamente con agua destilada a fin de eliminar las impurezas coloreadas.

c) Cromatografía y Electroforesis en papel.

Se utilizan los siguientes solventes: A, butanol-piridina-agua 6:4:3 (115); B, butanol-piridina-agua 4:3:4 (105);

C, acetato de etilo-piridina-agua 2:1:2 (137); D, acetato de etilo-ácido acético-agua 3:1:1 (137); E, ácido fórmico al 5% ; F, acetato de piridina pH 6,5.

Los papeles de cromatografía utilizados son Whatman N° 1,4 y 3 MM. Estos son lavados siempre antes de usarlos de acuerdo al método de Sutherland y col. (118). Whatman N° 1 es usado como tal o también previamente tratado con $ZnSO_4$ 1M, o $Na_2B_4O_7$ 0,2M y se ajusta el pH a 8,5 con H_2SO_4 . Después de estos tratamientos el papel se seca y se usa.

Los azúcares son visualizados con el reactivo de plata alcalino (119), tanto en cromatografía como en electroforesis en papel.

d) Medida de la Radioactividad.

La radioactividad de los extractos cloroformo-metanol y de los productos de hidrólisis ácida suave es medida en un contador de flujo gaseoso secando previamente las muestras en planchetas de aluminio. Cuando los compuestos se quieren recuperar son medidos en planchetas de vidrio y luego se los extrae con el solvente apropiado.

La medición de la radioactividad de los cromatogramas y electroforogramas se realiza en un detector Packard modelo 7201. Para obtener determinaciones cuantitativas de la radioactividad, en los cromatogramas se eluyen las zonas correspondientes a cada pico y luego se miden en planchetas como se describe más arriba.

3. PREPARACIONES DE MICROSOMAS Y ENSAYOS ENZIMATICOS

a) Tejidos utilizados

Los oviductos son obtenidos de gallinas Leghor de 36 semanas, seleccionadas en el pico de postura, gentilmente dona -

das por Cargill Argentina.

Hígados de rata se obtuvieron de ratas Wistar de 200 g aproximadamente. Los animales son ayunados por 3 días suministrándosele únicamente agua ad libitum. Una hora antes de ser sacrificados son inyectados con 20 UI de insulina Lilly. Luego de la decapitación los hígados son perfundidos con una solución fría de sacarosa 0,25 M que contiene EDTA 5 mM y mercaptoetanol 10 mM.

Bazo, riñón y corazón son también obtenidos de ratas Wistar de 200 g.

Tiroides e hígado de cerdo son suministrados gentilmente por el frigorífico La Negra, Buenos Aires.

b) Preparación de Microsomas

Los microsomas son preparados de acuerdo al método de Moule y col. (120), con algunas modificaciones. A continuación se describe una preparación tipo.

Los tejidos, luego de extraídos, se pesan y se homogenizan con 1,5 volúmenes de sacarosa 0,25 M que contiene EDTA 5 mM y mercaptoetanol 10 mM, en un homogenizador de vidrio-teflon. Todas estas operaciones se llevan a cabo a una temperatura entre 0 y 4 °C. El homogenato se centrifuga a 14.000 rpm durante 20 minutos a fin de eliminar núcleos, mitocondrias y restos de tejido. El sobrenadante obtenido se somete entonces a una centrifugación de 3 horas a 105.000 xg, en una centrífuga preparativa, Spinco, Modelo L. El precipitado obtenido de esta centrifugación se homogeniza con mínima cantidad de buffer Tris-Maleato 0,1 M, pH 7,8 y se divide la preparación en pequeños volúmenes los que se guardan hasta su uso a -70°C.

c) Mezcla de incubación estandar

La mezcla de incubación para la síntesis de los diferentes lípido-azúcares se detallan en la Tabla IV.

Todas las incubaciones se realizan a 30°C y se agrega al rededor de 2 mg de proteína microsomal.

Los lípidos aceptores, dolicol-P, dolicol-PP-GlcNac, dolicol-PP-(GlcNac)₂ y lípido - X3, que se encuentran en solución de cloroformo-metanol 2:1 se secan junto a la solución de EDTA-Mg bajo atmósfera de nitrógeno.

El volumen final de la mezcla de incubación para la síntesis de los diferentes lípido-azúcares es de 50 μ l.

d) Aislación de los Lípido-azúcares

Las incubaciones con los distintos aceptores siempre son detenidas por el agregado de una mezcla de cloroformo-metanol-MgCl₂ en la relación 3:2:1 de acuerdo a Folch y col. (103). Después de agitar vigorosamente se centrifuga y se obtienen dos fases. La superior, contiene las sustancias solubles en agua, como por ejemplo los nucleótido-azúcares que no han reaccionado. La fase inferior está formada fundamentalmente por cloroformo-metanol. Es la llamada también fase orgánica y en ella se encuentran los lípido-azúcares. Entre ambas fases, la acuosa y la orgánica, se encuentra una interfase sólida formada por la proteína microsomal desnaturalizada. Esta proteína es reextraída dos veces más con la mezcla de Folch y col.

Las fases orgánicas obtenidas por este tratamiento se juntan y se eliminan los posibles restos de sustancias hidrosolubles lavándola con una mezcla de composición semejante a la fase superior. De esta manera los compuestos presentes en la fase orgánica quedan libres de posibles contaminantes hidrosolubles. Luego, se concentran bajo atmósfera de nitrógeno y se

guardan a -15°C en cloroformo-metanol 2:1.

Los lípido-azúcares cuyos restos hidrofílicos son de mayor tamaño, como por ejemplo los lípido-oligosacáridos, no son totalmente solubilizados en la fase orgánica, sino que permanecen en la proteína desnaturalizada de la interfase. Esta proteína primero se lava con una mezcla de composición semejante a la fase superior y luego se extraen los lípido-azúcares con una mezcla de cloroformo-metanol-agua 10:10:3 (104). Esta extracción se repite por lo menos dos veces, y los extractos se concentran bajo nitrógeno y se guarda a -15°C .

e) Purificación de los Lípido-azúcares

Para la purificación de los lípido-azúcares se usan columnas analíticas de DEAE-celulosa, forma acetato, de 1,2 cm de diámetro por 46 cm de altura (121). Luego de lavar el exceso de acetato de potasio, se equilibra con cloroformo-metanol-agua 10:10:3. Después de la adsorción, la columna se lava con alrededor de 50 ml. de la mezcla de equilibrio.

La elución se efectúa haciendo pasar un gradiente lineal de formiato de amonio entre 0 y 30 mM disuelto en la mezcla de equilibrio. El flujo de la columna se ajusta a 1 ml. por minuto. Los volúmenes correspondientes al lavado y al gradiente se recogen en alrededor de 50 fracciones de 4 ml. cada una.

Los lípido-pirofosfato-azúcares eluyen a una concentración 10 mM de formiato de amonio. Las fracciones correspondientes a los lípido-azúcares se concentran bajo atmósfera de nitrógeno. Entonces se agrega cloroformo-metanol-agua en la proporción 3:2:1 y la fase orgánica se lava repetidas veces con la mezcla de composición similar a la fase superior hasta quedar libre de formiato de amonio y entonces se guarda a -15°C .

TABLA IV

Componentes	Lípido-azúcares sintetizados					
	DoI-P-P-GlcNac	DoI-P-P-(GlcNac) ₂	Lip-X ₃	Lip-Oligos.	DoI-P-Man	
DoI-P(30 µg Pi total)	20 µl	-	-	-	5 µl	
EDTA-Mg 0,5 mM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	
Mg Cl ₂ 0,5 mM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	
Tris-Maleato 0,1M pH 7,8	10 µl (a)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	
Mercaptoetanol 0,1 M	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	
DOC 0,5%	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-	
Triton X-100 2%	-	-	-	-	5 µl	
UDP ¹⁴ C GlcNac 45 Ci/M	50.000 cpm	5 µl (b)	-	-	-	
DoI-P-P-(GlcNac) ¹⁴ C	-	-	2.000cpm	-	-	
Lípido- X ₃ ¹⁴ C	-	-	-	-	-	
GDPMan 3mM	-	-	-	2.000 cpm	-	(c)
DoI-P-Man	-	-	5 µl	-	60.000 cpm	
Tiempo de incubación en minutos	30	60	240	240	30	

(a) Buffer Tris-Maleato 0,1 M pH 8,4 (c) GDPMan radioactivo (10 Ci/M)

(b) UDPGlcNac no radioactivo (d)

La concentración exacta de este compuesto no se pudo determinar, pero a proximadamente corresponde a cinco veces la concentración del DoI-P-Man radioactivo.

Para detectar los lípido-azúcares radioactivos se toman alícuotas de cada fracción y luego de secadas se miden en un contador de flujo. En el caso de las preparaciones de dolicol-P-manosa, no radioactivo, luego de la incubación se purifica también en columnas de DEAE-celulosa. Como no es posible detectar la presencia de este lípido-azúcar, la columna es previamente calibrada con dolicol-P-manosa radioactivo. De esta manera se determina la zona en que eluye este lípido-azúcar.

f) Hidrolisis ácida suave

La porción hidrofílica de los lípidos azúcares, que provienen de la purificación por columnas de DEAE-celulosa o de los productos de la reacción, se obtienen por hidrólisis ácida suave. A tal efecto luego de secados bajo nitrógeno son suspendidos en 0,2 ml. de agua y se agrega HCl 0,5 N hasta que el azul de timol vire al rojo (pH 2). Las muestras son calentadas a 100° C durante 10 minutos. Los productos de la hidrólisis son entonces separados por cromatografía en papel.

g) Tratamiento Alcalino

Los azúcares liberados por hidrólisis ácida suave, luego de cromatografiarlos en papel y eluirlos con agua, son tratados con KOH 2 M a 100° C a tiempos variables. Las soluciones son entonces neutralizadas con ácido perclórico y el sobrenadante es sometido a electroforesis en ácido fórmico al 5%, durante 210 minutos a 20 V/cm.

4.- PREPARACION DE LIPIDO ACCEPTOR.

El lípido aceptor es preparado a partir de hígado de cerdo de acuerdo a Burgos y col.(68), con las modificaciones de Behrens y col. (23).

El hígado de cerdo es homogeneizado en una licuadora

con dos volúmenes de acetona fría. Luego de filtrado el residuo se seca al aire y entonces se extrae con 3 volúmenes de cloroformo-metanol 2:1. Al sobrenadante se le agrega NaOH hasta una concentración final de 0,1 N y se incuba a 37° C durante 15 minutos. Luego se le agrega HCl suficiente para obtener una concentración final de 0,1 N y se hierve a reflujo durante 15 minutos. La fase cloroformo-metanol es lavada de acuerdo al método de Folch y col. (103).

La fase orgánica es purificada en una columna preparativa de DEAE-celulosa, de 5 cm de diámetro por 70 cm de altura, en la forma acetato, la cual es equilibrada con cloroformo-metanol 2:1.

Luego de la adsorción del lípido aceptor, se eluye con acetato de amonio 0,1 M pH 4, en cloroformo-metanol 2:1. Las fracciones que contienen al lípido aceptor se concentran y se lavan para liberar el acetato.

5-PREPARACION DE MALTOLIGOSACARIDO

Los maltoligosacáridos se obtuvieron de acuerdo al método de Thoma y col. (122).

A 100 g de amilopeptina se le agrega 100 ml de H₂SO₄ 0,2 N y se calienta a 100° C durante 70 minutos. Luego se neutraliza con carbonato de bario y se centrifuga. El precipitado se lava varias veces y los sobrenadantes se concentran y se vuelven a lavar hasta eliminar el carbonato de bario.

6- PREPARACION Y ENSAYOS DE GLICOSIDASAS

a) Preparación de α -manosidasa de bromelina

El polvo seco de bromelina de ananá es suministrado gentilmente por Dole Co., Honolulu, Hawaii. Este es suspendido en agua destilada y agitado 30 minutos. Luego de centrifugar, al

sobrenadante se le agrega sulfato de amonio hasta llegar a una concentración final de 50%. Esta operación se realiza lentamente y la solución es agitada continuamente. Luego de dos horas se centrifuga y la α -manosidasa que se encuentra en el sobrenadante, es precipitada con sulfato de amonio hasta llevar a una concentración del 65 %. El precipitado obtenido es disuelto en buffer de fosfato de sodio de 10 mM, pH 7,0 y se dializa 48 horas contra el mismo buffer. Todas estas operaciones se realizan a 4° C.

Esta preparación es realizada de acuerdo al método de Li y Lee (114) con algunas modificaciones, llegando solamente hasta la etapa de sulfato de amonio. La preparación no tiene actividad de β -manosidasa y tampoco de β -N-acetilglucosaminidasa, dentro de la sensibilidad del ensayo utilizado.

b) Preparación de α -manosidasa de poroto

Esta preparación se realiza de acuerdo a Li (124) con ligeras modificaciones.

El polvo de poroto (*Canavalia ensiformes*) se suspende en una solución de sulfato de amonio al 33% y se deja toda la noche, con agitación, en el cuarto frío. Luego de centrifugar, el sobrenadante se lleva a 40 % de saturación con sulfato de amonio sólido. Al sobrenadante obtenido de esta nueva centrifugación se le agrega sulfato de amonio hasta el 60% de saturación. El precipitado obtenido en esta etapa se disuelve en buffer de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. Se dializa contra buffer de acetato de piridina 50 mM, pH 6,0, durante 24 horas, con varios cambios de la solución.

El dializado se pasa por columna de Bio-gel P-200, equilibrado con acetato de piridina 50 mM pH6,0 y el eluido es re

cogido en fracciones de 3ml. Alícuotas de cada fracción se tomaron a fin de determinar la actividad de α -manosidasa. Todas las etapas son realizadas en el cuarto frío.

Esta preparación contiene alrededor de un 10% de actividad de β -N-acetilglucosaminidasa pero carece de actividad de β -manosidasa.

c) Preparación de glicosidasas de saliva humana

Las muestras de saliva de cada dador, luego de recogidas, son centrifugadas. El sobrenadante es entonces dializado contra buffer de citrato 0,25M pH 4,6. Todas las operaciones son realizadas entre 0 y 4° C.

Como se observa en la Tabla IV, existe una notable variación entre los distintos dadores con respecto a la actividad de las glicosidasas medidas. En casi todos los casos se pudo determinar una alta actividad de β -N-acetilglucosaminidasa. Mientras que la actividad de las manosidasas era muy variable.

d) Preparación de β -N-acetilglucosaminidasa de oviducto de gallina

Los oviductos de gallinas Leghor de 36 semanas son homogeneizados con buffer de fosfato de potasio, 10 mM pH 7,5. El homogenato es centrifugado a 12.000 xg durante 15 minutos. El precipitado es reextraído con el mismo buffer. El sobrenadante, es ajustado a 35 % de saturación con sulfato de amonio sólido. Esta operación se realiza lentamente y la solución es agitada continuamente. La solución se deja 20 minutos y luego se centrifuga. El sobrenadante es llevado, con sulfato de amonio, a 80% de saturación.

Luego de esta última etapa es dializada toda la noche contra buffer de fosfato de potasio 10 mM pH 7,5.

Luego de la diálisis el sobrenadante se lleva cuidadosamente a pH 11,0 con NaOH 0,1 N. Esta operación se realiza con continua agitación y midiendo el pH constantemente. De acuerdo a Sukeno y col.(125), con este procedimiento se elimina la α -manosidasa que contamina la preparación, lo cual es verificado. Luego el pH de la solución se lleva a 7,5 y se centrifuga. El sobrenadante obtenido es dializado contra buffer de citrato de sodio 5mM pH 4,5 que contiene además acetato de Zn 0,1 mM y ClNa 50 mM, toda la noche. El dializado es pasado por una columna de Sephadex G-200, de 1,5 cm. de diámetro por 50cm de altura, previamente equilibrada con la solución de diálisis.

Se recogen fracciones de 5 ml cada una y la actividad enzimática se determina como más adelante se describe.

Por este método se obtiene β -N-acetilglucosaminidasa, libre de las otras manosidasas.

e) Determinación de la actividad de las glicosidasas

La actividad de las tres glicosidasas estudiadas es determinada por el método de Levvy y col.(126).

La mezcla de incubación contiene 1,8 mM de p-nitrofenilglicósido, 33 mM de buffer de citrato pH 4,8 y enzima (glicosidasa a estudiar) hasta un volumen final de 300 μ l. La reacción se realiza durante 30 minutos a 37° C.

Es detenida por el agregado de 2,7 ml de Na₂CO₃ 0,1 M y se lee la absorbancia a 400 m μ .

La incubación de los carbohidratos obtenidos de los lípidos-azúcares se hace bajo atmósfera de tolueno, a fin de prevenir la contaminación bacteriana. La reacción se detiene por calentamiento a 100° C durante 5 minutos o por agregado de 0,5 ml de cloroformo-metanol 2:1. Luego de centrifugar el sobrenadante se cromatografía en papel.

TABLA V

Actividad de glicosidasas en saliva de distintos dadores

Dador	α -Manosidasa	β -Manosidasa	β -N-acetilglucosaminidasa
M	1	1,3	40
N	45	40	64
O	37	60	67
P	1,5	37	67
Q	15	65	67
R	23	27	67
S	34	53	64

Las incubaciones se realizaron de acuerdo al método de Levvy y col.(126). Se varió con cada enzima el p-nitrofenil-glucósido.

Todas las preparaciones de saliva fueron previamente centrifugadas.

La actividad enzimática está expresada en unidades de enzimas.

7 - INTERACCION DEL OLIGOSACARIDO CON AGLUTININAS

El trisacárido marcado es obtenido por hidrólisis ácida suave del lípido-trisacárido, seguida de cromatografía en el solvente A. A fin de purificarlo se recromatografía en papel Whatman 3 MM, en el mismo solvente y se eluye con agua.

La aglutinina de arveja es cedida gentilmente por el Dr. Rafael Pont Lezica de la Fundación Bariloche.

Las aglutininas son disueltas (alrededor de 0,5 mg) en buffer Tris-Maleato 0,1 M pH 7,0 que contiene además cloruro de sodio 3 M y cloruro de magnesio 4 mM. Luego de incubar 1 hora el trisacárido con la aglutinina se cromatografía en una columna de Bio-gel P 60 (Bio-Rad) de 16 x 0,8cm.

Se colectaron fracciones de 0,5 ml comenzando desde el pico del dextrano azul. Las muestras se midieron con solución de Bray (61), en un contador de centelleo, Packard Tri-Carb , modelo 3003.

III RESULTADOS

BIOSÍNTESIS DE UN LÍPIDO-DIFOSFATO-N-ACETILGLUCOSAMINA

Estudios previos efectuados en este laboratorio con preparaciones de microsomas de hígado de rata (100) y por otros investigadores con diferentes tejidos(22) (95) (127) habían demostrado la transferencia de GlcNac del UDP (^{14}C) GlcNac a un lípido aceptor.

En el presente trabajo se estudió las condiciones de formación del lípido-pirofosfato-N-acetilglucosamina con microsomas de oviducto de gallina. Era de esperar que este sistema fuera muy efectivo en la síntesis de este compuesto ya que como se ha dicho, este tejido sintetiza principalmente ovoalbúmina cuyo oligosacárido contiene únicamente manosa y acetilglucosamina (59).

Identificación del producto de la incubación y estudio de algunas de sus propiedades.

Luego de incubar la fracción particulada de oviducto de gallina con UDPGlcNac ,(marcado uniformemente en la molécula de glucosamina) y dolicol-P , la reacción se detuvo por el agregado de cloroformo-metanol-4mM MgCl_2 en la proporción 3:2:1 De esta manera se forman 2 fases: la superior(acuosa), la inferior(orgánica). La fase orgánica lavada y llevada a sequedad se sometió a hidrólisis ácida suave, seguida de cromatografía en papel, como se indica en Material y Métodos. La mezcla de reacción se detalla en la Tabla IV.

La Fig.8 , muestra la aparición de una sustancia radioactiva que migra como la N-acetilglucosamina estandar.

El lípido-azúcar obtenido se comporta como los prenol - azúcares. Estos son muy lábiles al tratamiento ácido suave a diferencia de los del tipo diglicéridos que requieren un vigo-

roso tratamiento ácido antes de ser hidrolizados(76)(128)(129).

El azúcar liberado por hidrólisis ácida suave, seguida de cromatografía en papel, fue eluído y tratado con álcali(KOH 2N 100° C) durante 30 minutos. Los productos obtenidos del tratamiento alcalino fueron entonces sometidos a electroforesis en papel como se indica en Material y Métodos. El perfil de la radioactividad del electroforograma muestra la formación de dos sustancias radioactivas. Una de ellas migra hacia el polo negativo, mientras que la otra permanece en el origen. Ambas coinciden con la glucosamina y la N-acetilglucosamina respectivamente. Esto se puede interpretar como una desacetilación parcial de la N-acetilglucosamina.

El lípido-azúcar obtenido con preparaciones de oviducto se absorbe a columnas de DEAE-celulosa y se eluye en las mismas condiciones que los prenoles pirofosfato azúcares, (ver Material y Métodos). Estos mismos resultados se obtienen con el compuesto preparado con la enzima de hígado (110).

Condiciones óptimas de incubación

La incorporación de acetilglucosamina radioactiva al dolicol-P es del 5 al 10% del nucleótido-azúcar marcado, presente en la mezcla de incubación. Este rendimiento es variable dependiendo de las diferentes preparaciones enzimáticas. La actividad de dichas preparaciones es en general bastante estable y se observa una pequeña disminución después de algunos meses de conservada a - 70°C.

La Tabla VI, muestra el efecto de omitir varios componentes de la mezcla de reacción. Es interesante destacar que el sistema además de necesitar un detergente, parece ser dependiente de Mg^{++} . Por otro lado este catión no puede ser susti -

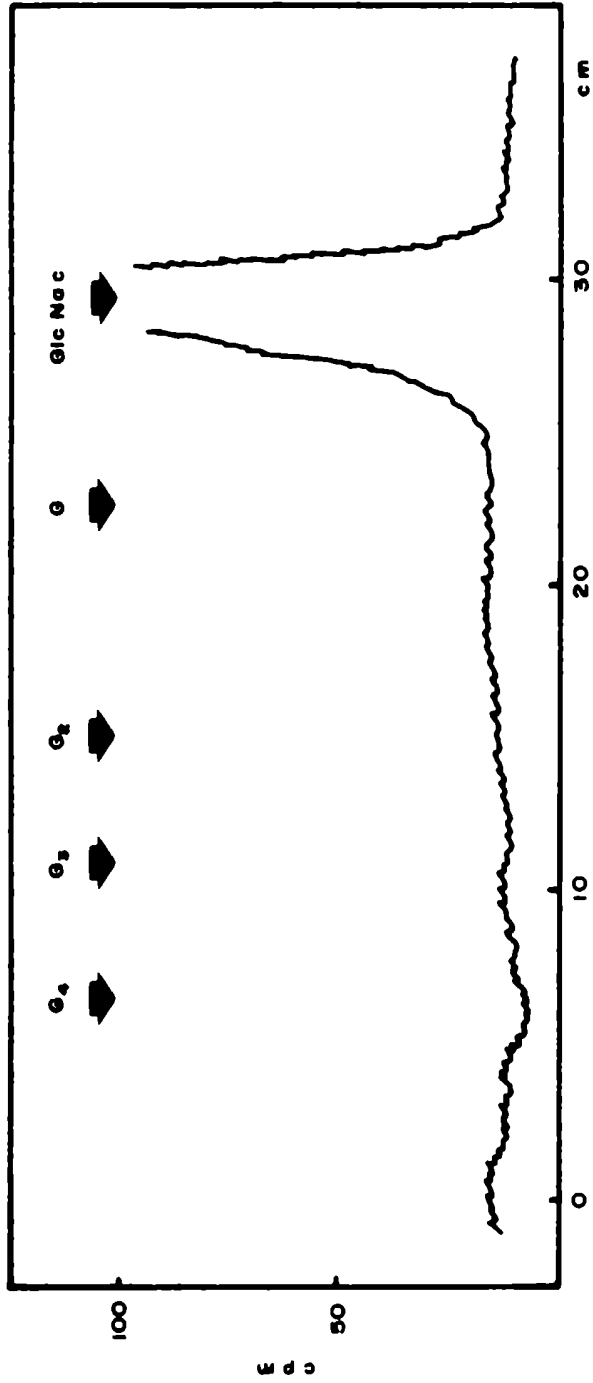


Fig. 8 -Cromatografía en papel, en el solvente A, del producto de hidrólisis ácida suave de la fracción lipídica correspondiente a la incubación de UDPGlcNac C¹⁴ y dolicol-P con preparaciones de oviducto de gallina de acuerdo a la Tabla IV.
G= glucosa ; G₂ = maltosa, etc.

tuído por el Mn^{++} . Este hecho ha sido descrito también en la síntesis del dolicol-monofosfato-glucosa (23). Por el contrario el Mn^{++} es más efectivo que el Mg^{++} en la transferencia de oligosacáridos de los lípido-azúcares a proteínas en hígado de rata (24). Tanner y col. (130), (131), usando preparaciones particuladas de levadura observaron que el Mn^{++} es necesario para la transferencia del azúcar a la proteína, mientras que en la formación del lípido-azúcar tanto Mg^{++} como Mn^{++} eran igualmente efectivos.

Por los resultados expuestos en la Tabla VI se observa que el DOC es un poco más eficiente que el Triton X 100 para la incorporación del azúcar al lípido. Esta pequeña diferencia no se ha observado con todas las preparaciones de enzima y depende del grado de pureza del dolicol-P utilizado.

La adición de cantidades crecientes de dolicol-P se muestra en la Fig. 9. Como puede observarse, la incorporación del azúcar es proporcional a la cantidad del lípido aceptor agregado. Este experimento fue realizado con dolicol-P obtenido de hígado de cerdo y purificado como se indica en Material y Métodos. Resultados similares se obtuvieron con dolicol fosforilado químicamente por el método de Popjak (99), cedido gentilmente por el Dr. E. Táborá.

La incorporación de acetilglucosamina al prenol-P en general se ha observado que es mayor en las reacciones catalizadas por microsomas de hígado de rata que por microsomas de oviducto de gallina. Además se observa que el agregado de dolicol-P incrementa bastante la incorporación con ambas preparaciones enzimáticas. Estos resultados podrían indicar el bajo contenido de prenol de estos tejidos, ya que como se muestra en la Tabla VI, la incorporación sin dolicol-P exógeno es muy baja. Tam

TABLA VI

Transferencia de ^{14}C GlcNac desde el UDP ^{14}C GlcNac a la fase cloroformo-metanol

Componente variado	conc. final	cpm
ninguno		1.400
- Dol-P	-	200
- Mg^{++}	-	200
- DOC	-	280
- Mercaptoetanol	-	800
+ Mn^{++} en lugar Mg^{++}	15 μ -moles	200
+ Triton - X 100 en lugar de DOC	0,5 %	1.100
+ Enzima calentada (5 min a 100° C)	2 mg	120

La mezcla estándar de incubación contiene: 0,5 μ moles MgEDTA, 0,5 μ moles MgCl_2 . Fueron secados junto con 30 μ g Dol-P expresado como fosfato total y se suspendió en 2,0 mg de proteína de microsomas de oviducto de gallina en 0,1 M de mercaptoetanol, 0,1 M de tris-maleato buffer pH 8,4 y 0,5 % de deoxicolato en un volumen final de 50 μ l y se agregó UDP ^{14}C GlcNac (45 Ci/M, 50.000 cpm). Después de 30 minutos a 30°C se agregó cloroformo-metanol 0,4 mM MgCl_2 3:2:1 y la fase cloroformo-metanol luego de lavada con fase superior teórica se midió en un contador de flujo gaseoso.

bién podría hacer descender el nivel de dolicol-P, la diferente actividad de la prenil-fosfatofosfatasa en los distintos tejidos. Hemming y col. (24) estudiando en hígado de cerdo las condiciones de formación del dolicol-monofosfato-manosa encontraron que la incorporación del azúcar al lípido se estimulaba en presencia de fluoruro de sodio 80 mM. La estimulación era del orden de 10 veces, lo cual se podía determinar disminuyendo la cantidad de dolicol-P agregado. Experimentos similares se realizaron con nuestro sistema observándose que el F^{-} , no tenía ningún efecto en la formación del dolicol-P-P-N-acetilglucosamina.

La Fig. 10-A, muestra el efecto de variar la concentración de detergente en la mezcla de incubación. Se estudió en particular el deoxicolato. En experimentos similares se observó que la concentración óptima de detergente dependía de la cantidad de enzima utilizada. Trabajando en las condiciones usuales de incubación, (es decir con una concentración de 2 mg de proteína), la concentración más conveniente del detergente es de 0,5 %.

El tiempo óptimo de incubación para la transferencia del azúcar, del nucleótido acetilglucosamina al dolicol-P, se muestra en la Fig. 10-B. Se observa que la incorporación de la radioactividad aumenta casi linealmente hasta los 30 minutos de incubación y permanece constante por lo menos hasta los 60 minutos.

La Fig. 10-C, muestra la formación del dolicol-pirofosfato-acetilglucosamina en función de la cantidad de proteína microsomal agregada. Se observa que el rendimiento aumenta con la concentración de enzima, hasta llegar a una meseta. No obs-

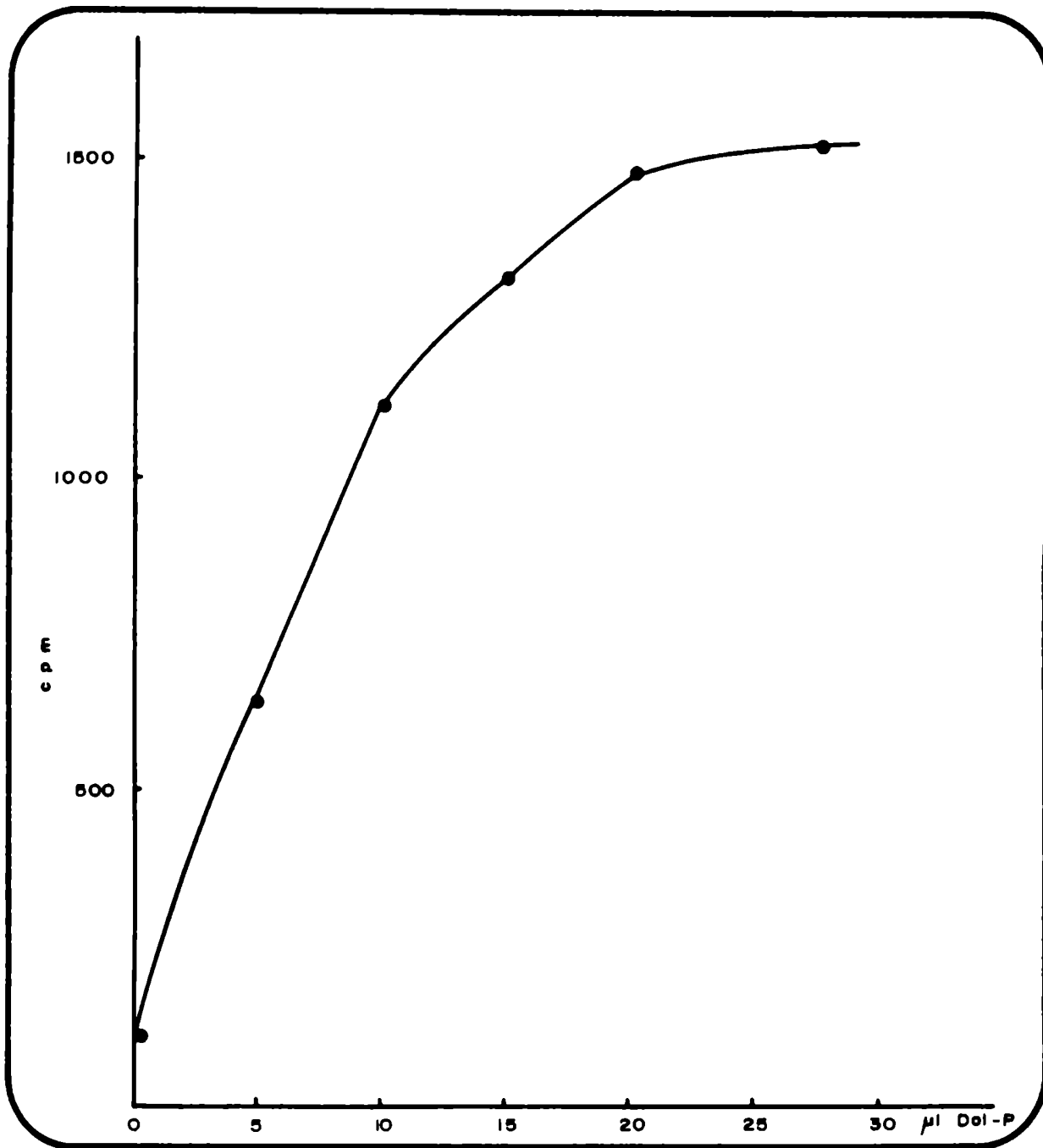


Fig. 9 - Efecto de la estimulación de la formación de Dol-P-P-GlcNac en función de la concentración de dolicol-P.

tante hay que destacar que los otros componentes de la mezcla de incubación se mantenían constantes, entre ellos el detergente. Esto tiene importancia por lo visto anteriormente al estudiar el efecto del deoxicolato de sodio.

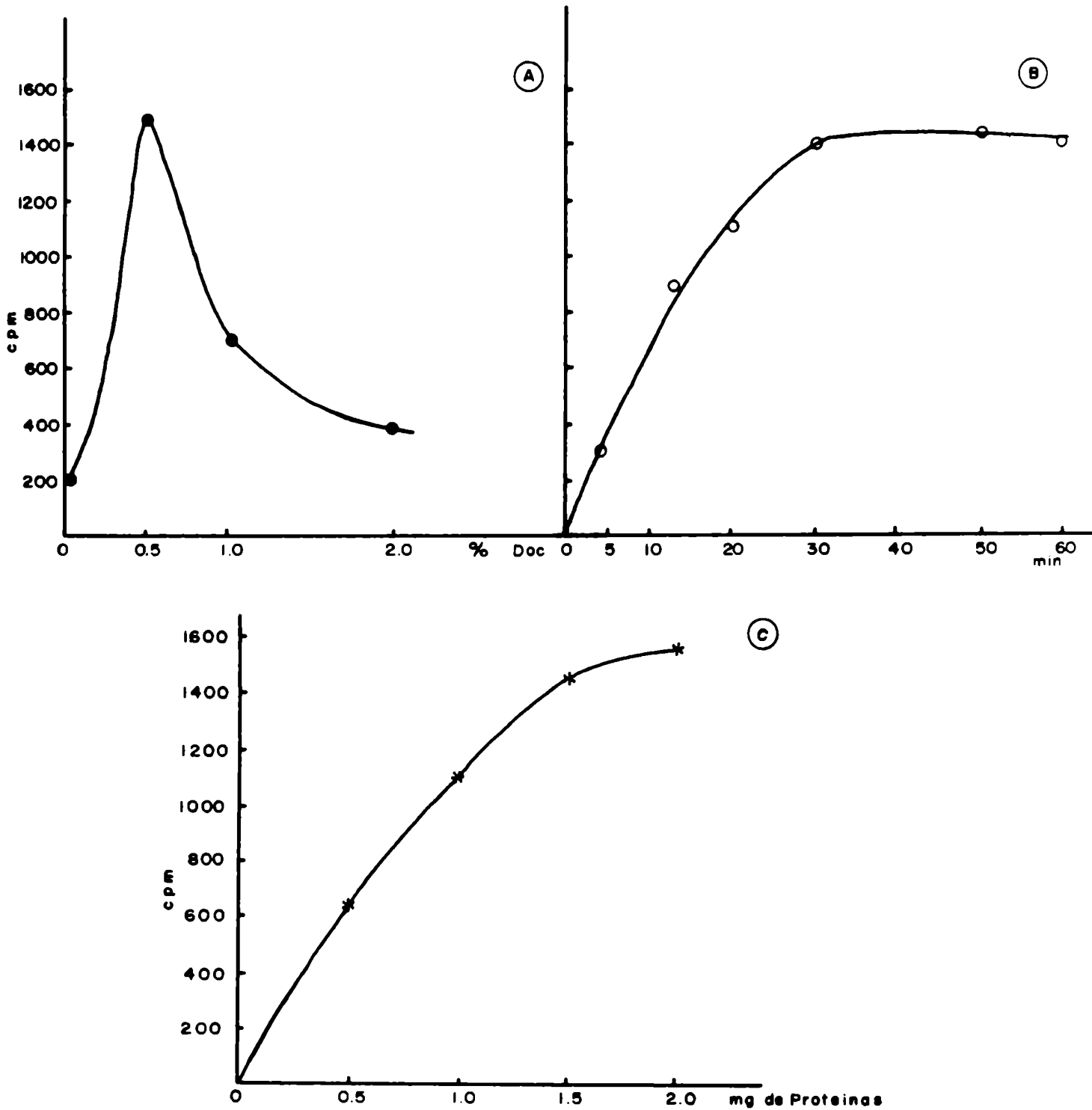


Fig. 10- Estudio de las condiciones óptimas de la síntesis del Dolicol-P-P-(¹⁴C) GlcNac.
A= Variación de la concentración de Deoxicolato de so dio.
B= Variación del tiempo de incubación
C= Estudio de la concentración óptima de enzima de oviducto.

BIOSINTESIS DE UN LIPIDO-DISACARIDO QUE CONTIENE ACETILGLUCOSA
MINA.

Cuando se incubaba dolicol-pirofosfato-N-acetilglucosamina, (marcado en la molécula del azúcar) en presencia de UDPGlc-Nac (no radioactivo) Mg^{++} , detergente y la preparación enzimática de oviducto de gallina, se obtiene un nuevo lípido-azúcar radioactivo. El resto hidrofílico se identificó como se describe a continuación.

Identificación del producto de incubación.

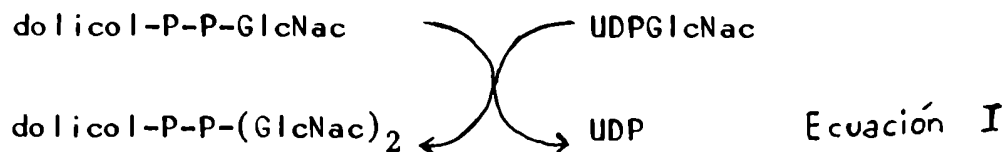
Para la identificación de la porción carbohidrato de este nuevo compuesto se ha tenido en cuenta diferentes criterios que a continuación se exponen:

a) Hidrólisis Acida.

Este nuevo azúcar se obtuvo como ya se indicó en Material y Métodos. Es decir, hidrólisis ácida suave del lípido-azúcar seguida por cromatografía en papel en el solvente A. En la Fig. II, se muestra el perfil de radioactividad de la cromatografía de los productos hidrofílicos de la mezcla de incubación y se lo compara con el perfil obtenido con igual tratamiento del lípido-N-acetilglucosamina.

El azúcar formado, pico II, Fig. II, fue eluído. Entonces se estudió su comportamiento por cromatografía en papel con diferentes solventes. La Tabla VII, muestra que este nuevo compuesto migra como la di-N-acetilquitobiosa estandar. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos con el compuesto sintetizado con microsomas de hígado de rata (110). Estos autores además presentan evidencias de que la porción hidrofóbica está unida al azúcar por un puente pirofosfato. La formación del lípido-pirofosfato-di-N-acetilquitobiosa podría ocurrir de

la siguiente manera:



Se sometió a hidrólisis ácida fuerte (HCl 4N, 6h. 100°C) el compuesto obtenido, (pico II, Fig. 11). Luego de eliminar el ácido clorhídrico se purificó por cromatografía en papel en el solvente A. Se obtuvo una única sustancia radioactiva que migra como la glucosamina estandar.

b) Hidrólisis Alcalina.

La sustancia que migra como la di-N-acetilquitobiosa fue sometida a un tratamiento alcalino, como se describe en Material y Métodos. La Fig. 12 muestra la aparición de sustancias en función del tiempo de tratamiento, que migran hacia el cátodo. A los 30 minutos, se observa la aparición de una sola sustancia con este comportamiento. A los 60 minutos aparece otro pico más. Esta nueva sustancia migra aproximadamente el doble de distancia que la primera.

Estos resultados se pueden atribuir a la desacetilación de las dos acetilhexosaminas. A los 30 minutos de tratamiento se libera un grupo amino, mientras que a los 60 minutos el disacárido estaría totalmente desacetilado. El azúcar sin desacetilar permanece en el origen.

c) Digestión con β -N-acetilglucosaminidasa

La hidrólisis enzimática con una glicosidasa específica fue otro de los criterios utilizados para identificar al componente hidrofílico del nuevo lípido-azúcar sintetizado de acuerdo a la ecuación I.

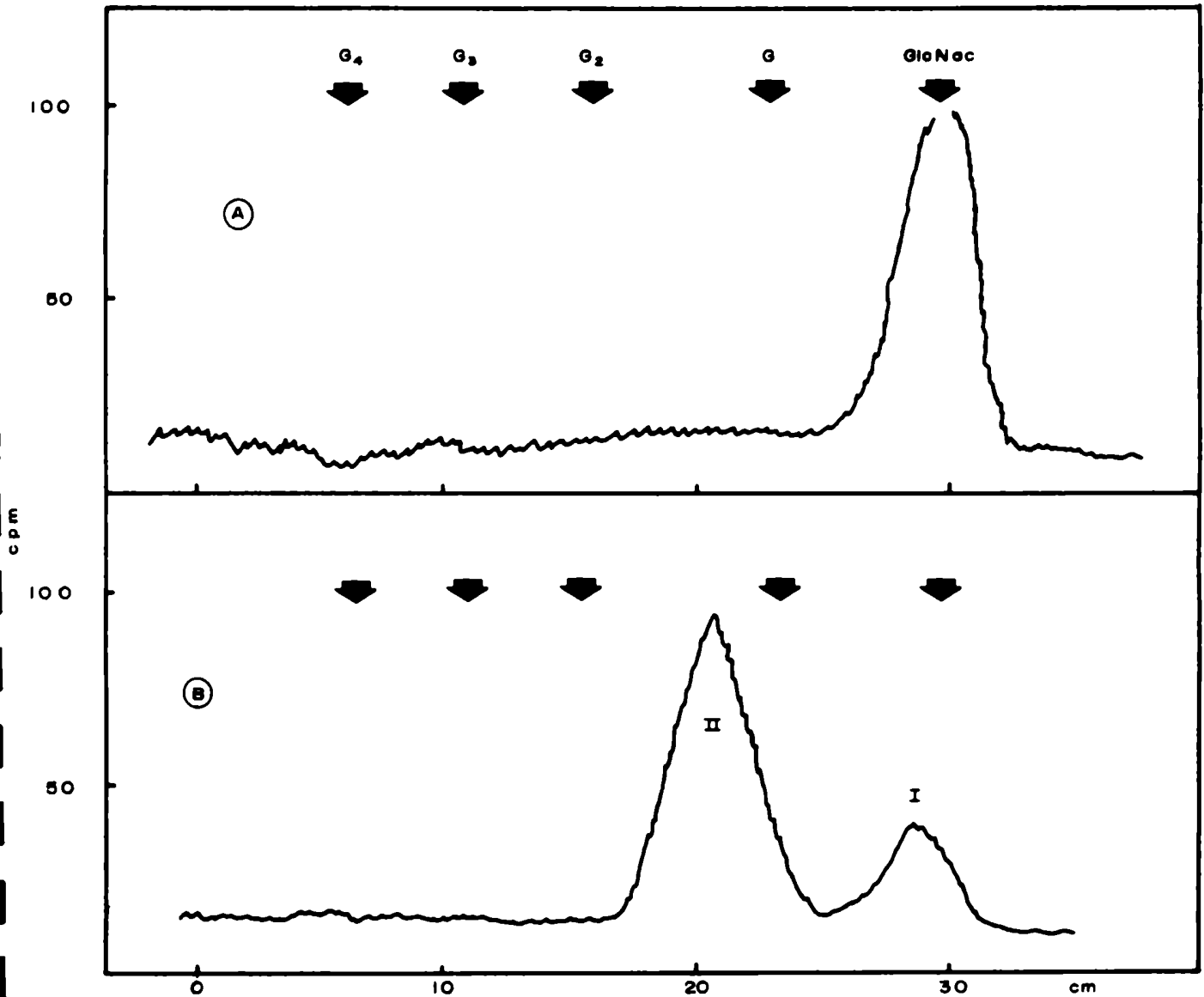


Fig. 11 -Cromatografía en papel, en el solvente A, de los productos de hidrólisis ácida suave de los compuestos hidrofílicos obtenidos en: A-incubación de UDP-(¹⁴C)-GlcNac y Dolicol-P de acuerdo a figura 8; B - incubación de Dolicol-P-P-N-acetilglucosamina radioactiva con UDP-GlcNac no radioactivo.
G = glucosa, G₂ = maltosa, etc.

TABLA VII

Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis ácida suave del compuesto obtenido en la incubación de DoI-P-P-¹⁴C GlcNac con UDPGlcNac.

Solvente	A	A*	B
Sustancias	Móvilidad con respecto a la glucosa		
GlcNac	1,25	9,9	1,23
Glc	1,01	1,0	1,02
di-N-acetilquitobiosa**	0,73	4,5	0,73
GlcNH ₂	0,65	-	0,66
Pico II (Fig. II)	0,72	4,4	0,73

* El papel de cromatografía fue previamente tratado con borato como se describió en Material y Métodos.

El nuevo compuesto radioactivo obtenido de la incubación del DoI-P-P-¹⁴C- GlcNac con UDPGlcNac fue obtenido como se describe en la Tabla III. Luego fue purificado y se estudió su comportamiento en cromatografía en papel en distintos solventes.

** Preparado por hidrólisis ácida parcial de quitina de acuerdo al método de Arima y col. (60).

Después de una hidrólisis ácida el disacárido fue purificado, recromatografiándolo en papel en el solvente A, y la radioactividad de la zona correspondiente se eluyó con agua (ver Material y Métodos).

Las β -N-acetilglucosaminidasas utilizadas para esta digestión fueron obtenidas de dos fuentes distintas. Una de ellas fue purificada de oviducto de gallina como se describe en Material y Métodos. La otra es una preparación solo dializada de saliva humana.

Ambas preparaciones tenían alta actividad enzimática, lo cual fue determinado de acuerdo al método de Levvy y col. (126). La preparación de saliva humana tenía también actividad de α -manosidasa y β manosidasa (dador M).

Se estudió la actividad de la β -N-acetilglucosaminidasa a diferentes tiempos de incubación. En la Fig. 13-B-C, se exponen los resultados obtenidos con preparaciones de saliva humana a dos tiempos de incubación distintos. En D se muestra el resultado de la incubación con la enzima purificada de oviducto de gallina.

La actividad de la β -N-acetilglucosaminidasa puede ser disminuída específicamente por el agregado de 2-acetoamido-2-deoxi-D-gluconolactona que es un fuerte inhibidor competitivo. Este compuesto fue preparado de acuerdo a Findlay y col. (75). La Fig. 14 muestra la acción de este compuesto sobre una preparación de saliva humana. Allí se puede observar una apreciable disminución de la actividad enzimática con respecto al ensayo realizado sin el inhibidor.

Los resultados presentados identifican a la porción hidrofílica del dolicol-P-P-azúcar, obtenido con microsomas de

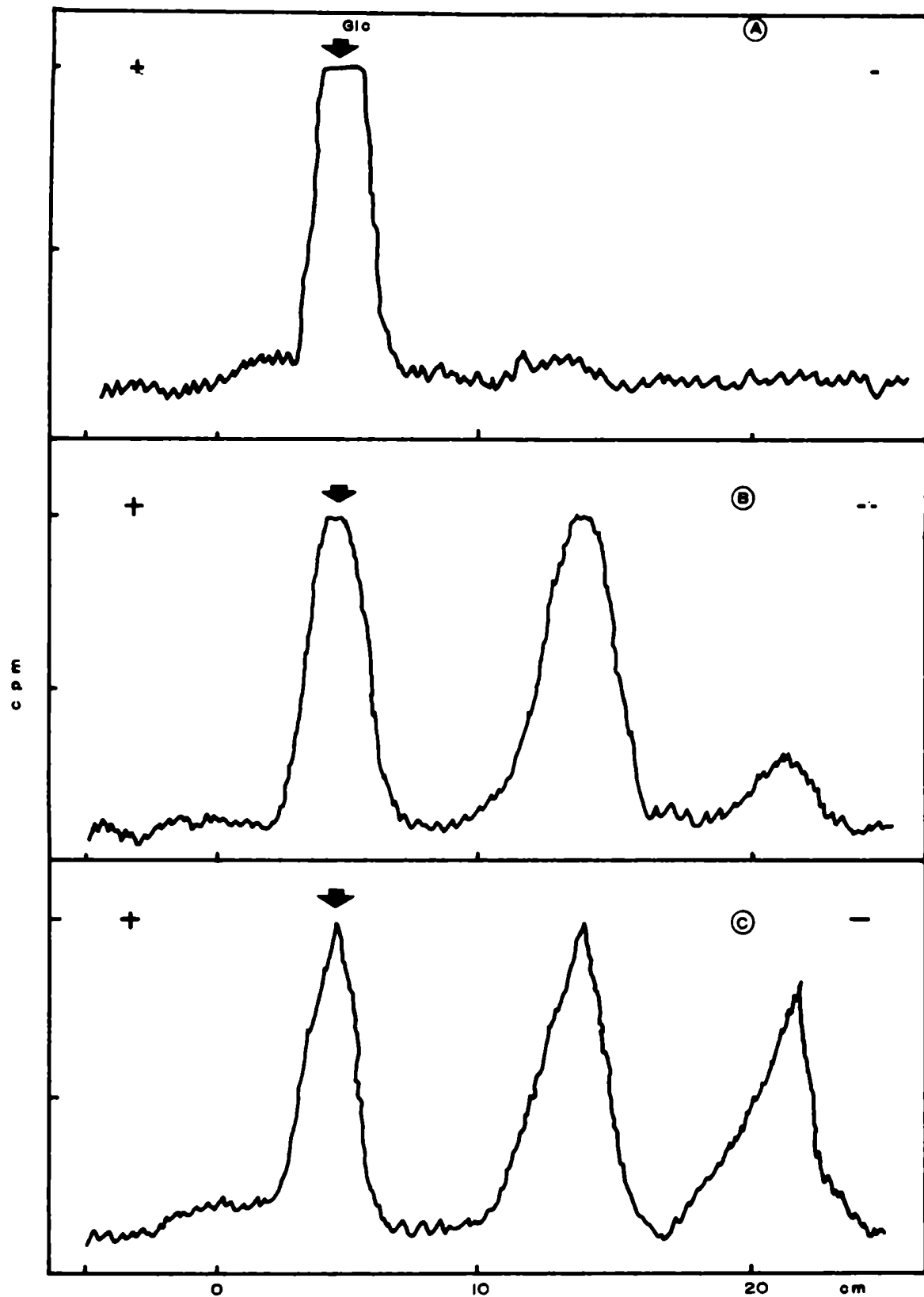


Fig. 12 - Tratamiento alcalino de la di-N-acetilquitobiosa. El disacárido fue secado y tratado con 1ml de KOH 2N. A - no fue calentado, B y C se calentaron a 100°C durante 30 y 60 minutos respectivamente. El álcali se neutralizó con ácido perclórico y el sobrenadante se sometió a electroforesis en papel en ácido fórmico 5% (25 V/cm, durante 3 horas).

de oviducto de gallina, como un disacárido de acetilglucosamina. Este compuesto tiene una unión de tipo β de acuerdo a la degradación enzimática. Esto apoyaría, entonces, que el nuevo compuesto sintetizado sería la di-N-acetilquitobiosa, (2-acetamido-2-deoxi-0- β -D-glucopiranosil-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa).

Condiciones de la mezcla de incubación

Existen, como se describió en la Introducción, numerosas glicoproteínas, que contienen di-N-acetilquitobiosa unida al aminoácido asparragina. De acuerdo al esquema propuesto se supone primero la formación de la cadena de azúcares unida a un lípido intermediario, la cual sería finalmente transferida a la proteína aceptora.

Con el propósito de poder demostrar esta hipótesis, era necesario disponer de gran cantidad del lípido-disacárido. Para ello uno de los primeros problemas que se planteó fue estudiar con que tejido convenía sintetizar este lípido-azúcar.

Los tejidos estudiados fueron entre otros, tiroides, oviducto de gallina, hígado de rata y de cerdo. De todos estos se encontró que las preparaciones obtenidas de hígado de rata eran las más activas.

A continuación se estudian en detalle las condiciones experimentales de la reacción a fin de obtener la mayor eficiencia en la preparación de este lípido-disacárido con la enzima de hígado de rata. El problema del rendimiento en esta etapa de la síntesis tiene además una importancia adicional, porque no es fácil separar los productos obtenidos. Una conversión incompleta del lípido-P-P-N-acetilglucosamina en dolicol-P-P-N-acetilquitobiosa, hace que en las etapas siguientes del trabajo se utili-

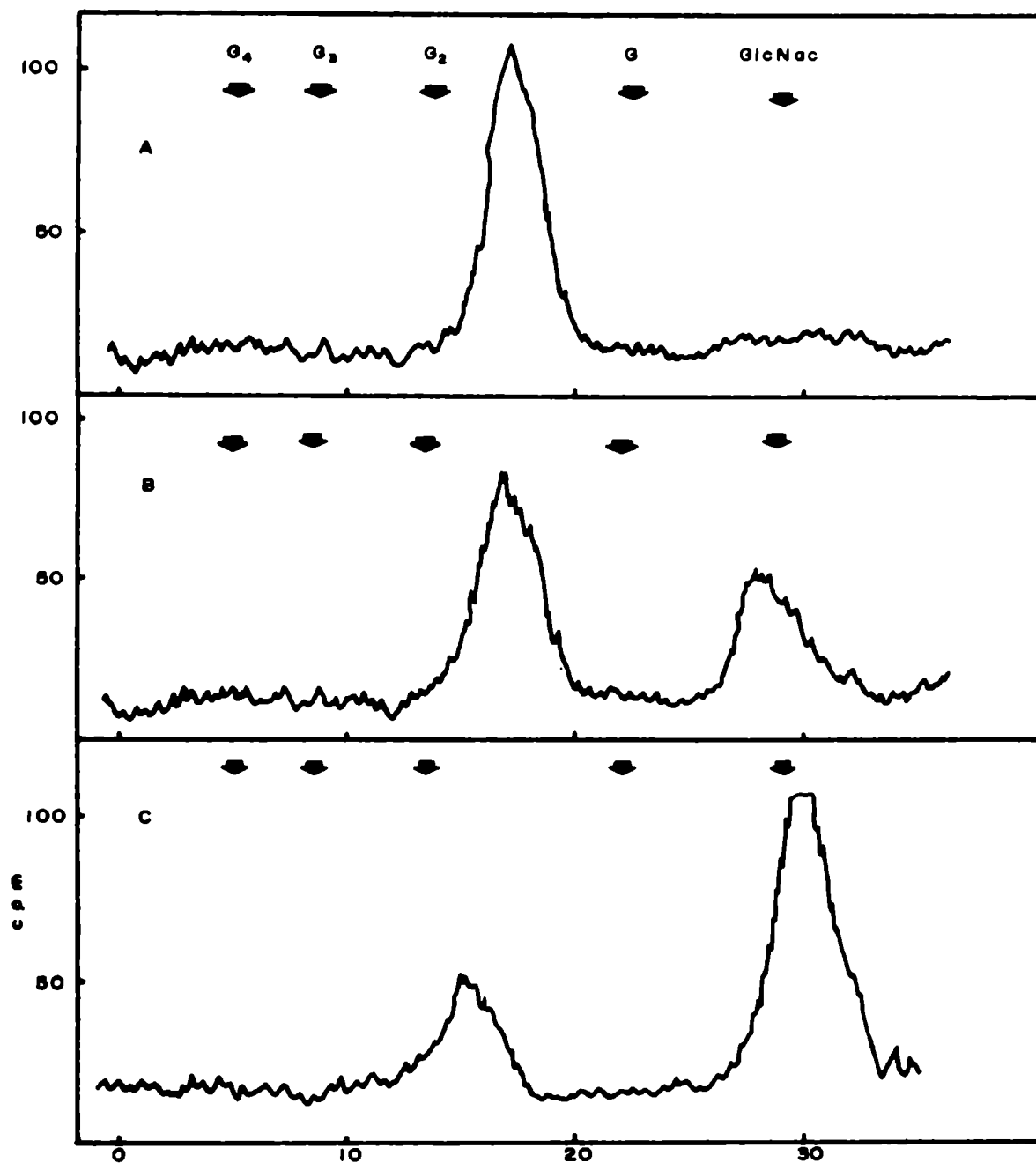


Fig. 13 - Acción de la β -N-acetilglucosaminidasa sobre la di-N-acetilquitobiosa.
A= control ; B= 46 h. de incubación; C= 87 h.; estas incubaciones fueron realizadas con enzima obtenida de saliva humana, (dador M).
Las condiciones de incubación se describen en Material y Métodos.

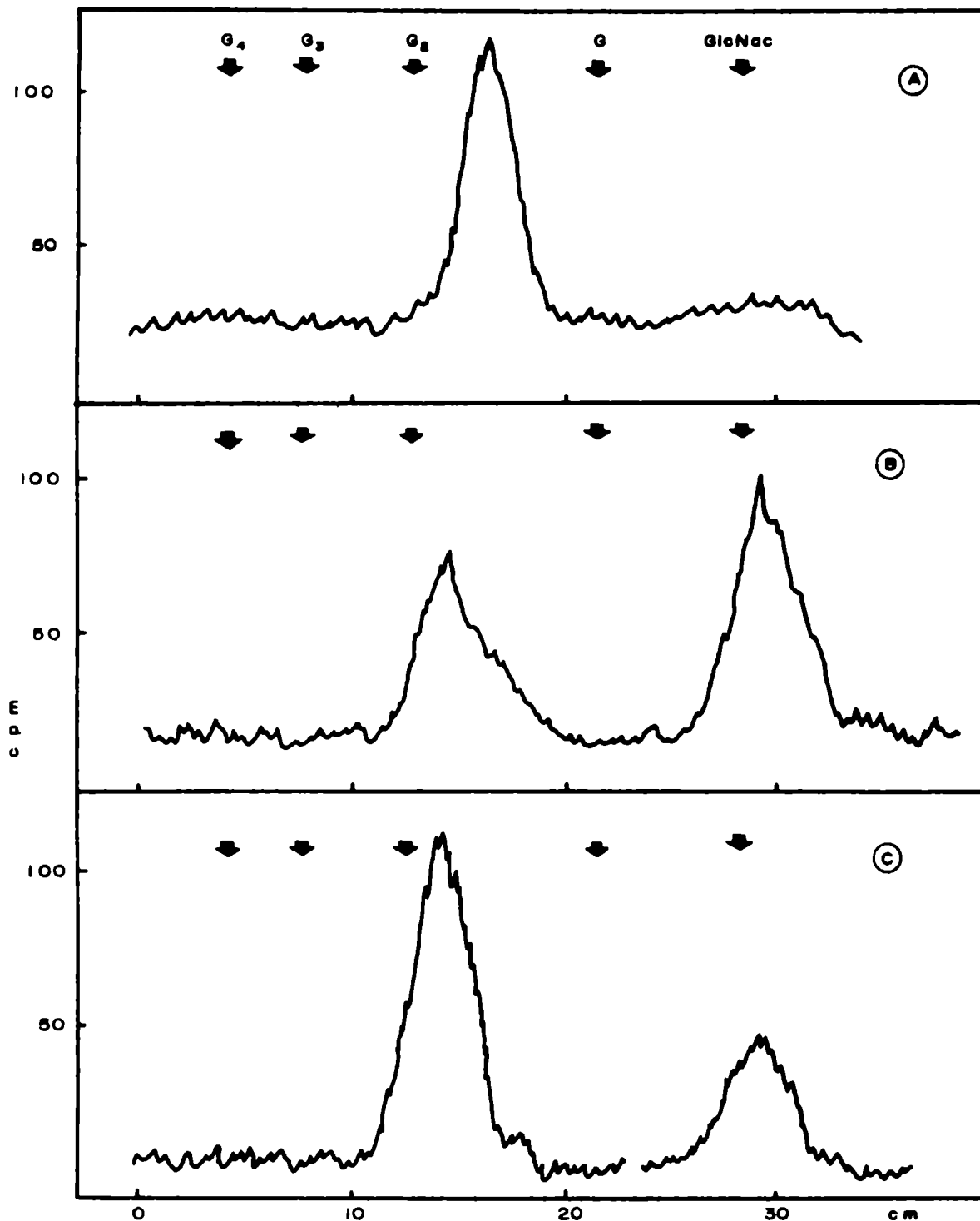


Fig. 14 - Acción de β -N-acetilglucosaminidasa sobre la di-N-acetilquitobiosas.

Se incubó alrededor de 1500 cpm del disacárido con glicosidasa obtenida de saliva humana, (dador M Tabla V).

A= incubación sin enzima;

B= 46 hr. de incubación con la glicosidasa, de saliva;

C= igual que B, pero con el agregado de 2-acetoamido-2-deoxi-D-gluconolactona;

Luego de la incubación la reacción se detuvo por calentamiento y el sobrenadante se cromatografió como se indica en Material y Métodos.

cen como sustratos una mezcla de estos compuestos. Esto hace más difícil la interpretación de los resultados.

La adición de dolicol-P a la mezcla de incubación no incrementa la formación del lípido-azúcar. Este efecto fue estudiado con dolicol-P purificado de hígado de cerdo y con dolicol fosforilado químicamente. Estos resultados estarían de acuerdo con el esquema de formación del lípido-di-N-acetilglucosamina que se describe en la ecuación I.

La Fig. 15 muestra los resultados obtenidos en función del tiempo de incubación. Como se puede observar la formación del lípido-azúcar aumenta de los 30 a los 60 minutos y se mantiene constante por lo menos hasta los 120 minutos. De acuerdo a estos resultados las reacciones se incuban 60 minutos.

La síntesis del lípido-disacárido es dependiente de la presencia de detergente en la mezcla de incubación. Se observó también que el valor óptimo de la concentración de DOC depende por un lado de la cantidad de enzima empleada y también del dolicol-P-P-N-acetilglucosamina presente en la mezcla de reacción.

La Fig. 16 muestra los resultados conseguidos para la formación del lípido-azúcar con diferentes concentraciones de detergente.

Por último se estudió el efecto del pH. El experimento expuesto en la Fig. 17, muestra la formación del lípido-disacárido en función del pH. Se trabajó generalmente con buffer Tris Maleato 0,1M. El máximo valor se obtuvo a pH 7,8.

Las preparaciones de microsomas de hígado de rata tienen en general una actividad enzimática alta y esta capacidad se mantiene cuando se conserva algunos meses a -70°C .

Se realizaron ensayos a distintas temperaturas encontrándose que la formación del lípido-azúcar es óptima a 30°C .

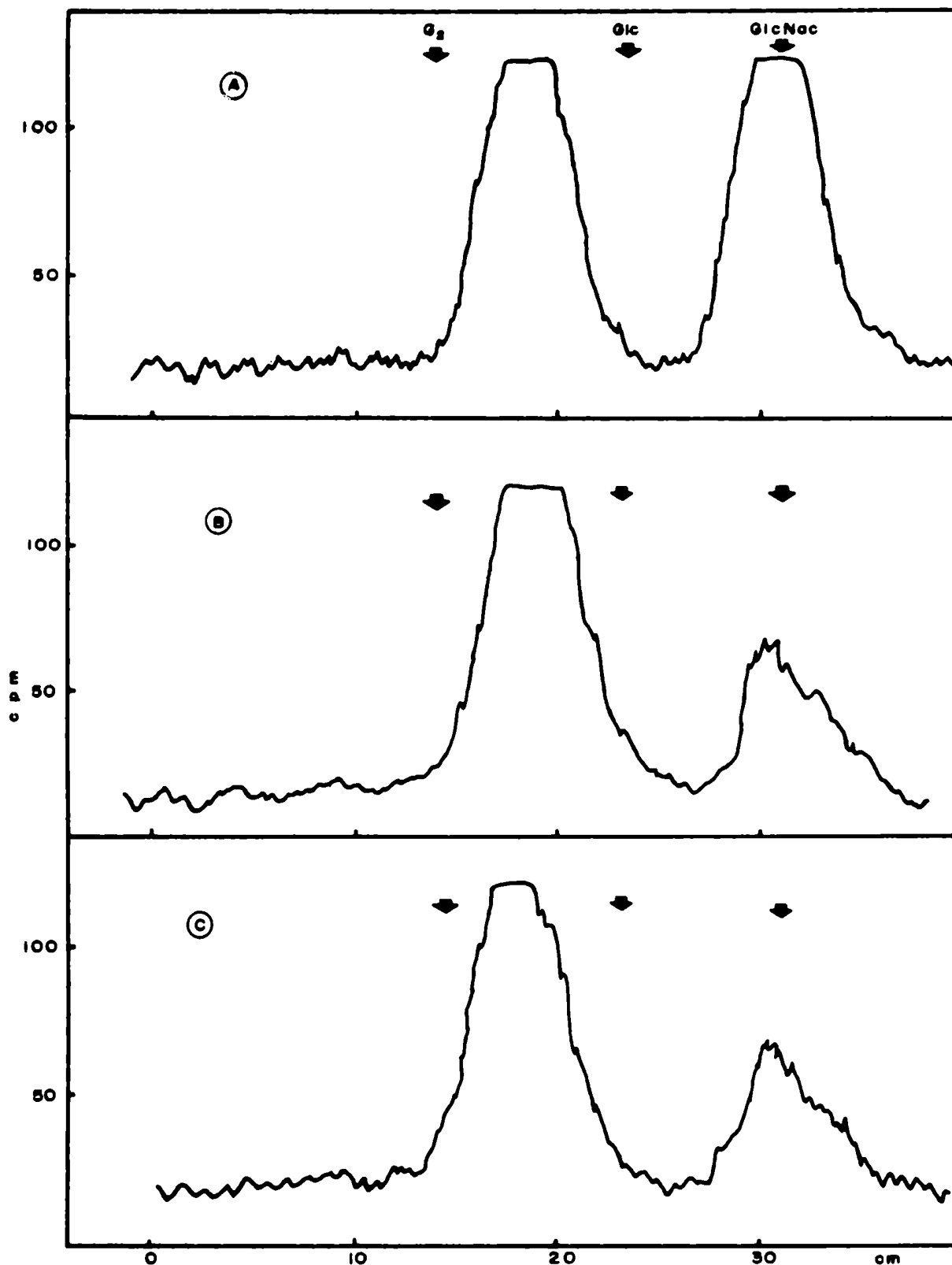


Fig. 15 - Formación del lípido-di-N-acetilquitobiosa en función del tiempo de incubación.

El lípido-disacárido fue sintetizado a partir de dolijcol-P-P-GlcNac radioactivo y UDPGlcNac no marcado como se indica en Material Y Métodos.

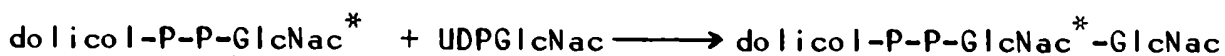
A= 30 min; B= 60 min; C= 120 min.

De acuerdo a estos estudios se ha utilizado la mezcla de incubación para la síntesis del lípido-disacárido, cuya composición y condiciones se describen en Material y Métodos. Esta mezcla ha resultado bastante eficiente para la síntesis del lípido-azúcar en escala preparativa.

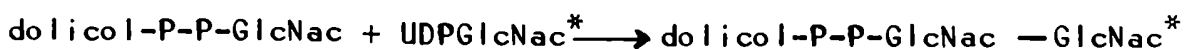
Preparación del lípido-di-N-acetilquitobiosa radioactivo

De acuerdo a la ecuación I la síntesis del dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa radioactivo puede realizarse marcando una de las acetilhexosaminas o ambas. Para mayor claridad se representan las ecuaciones correspondientes, donde se indica el azúcar radioactivo:

a) Marcación del azúcar en el extremo reductor.



b) Marcación del azúcar en el extremo no reductor.



Cuando la incubación se realiza con el lípido-N-acetilglucosamina marcado y UDPGlcNac no radioactivo, en el disacárido obtenido la N-acetilglucosamina marcada es la del extremo reductor, a). Si la incubación se realiza con el lípido-N-acetilglucosamina no radioactivo y con el nucleótido-azúcar marcado, la radioactividad, en el disacárido, se encuentra en la acetilglucosamina del extremo no reductor, b). En este trabajo se ensayó la síntesis del lípido-disacárido por ambos métodos.

En el primer caso, es decir a), el UDPGlcNac no estaba marcado. Los rendimientos generalmente fueron superiores al 80% del lípido-monosacárido radioactivo utilizado. En algunas preparaciones se alcanzó prácticamente el 100%.

En el segundo método, b), los rendimientos son muy bajos. Este resultado podría deberse a la menor concentración del nu-

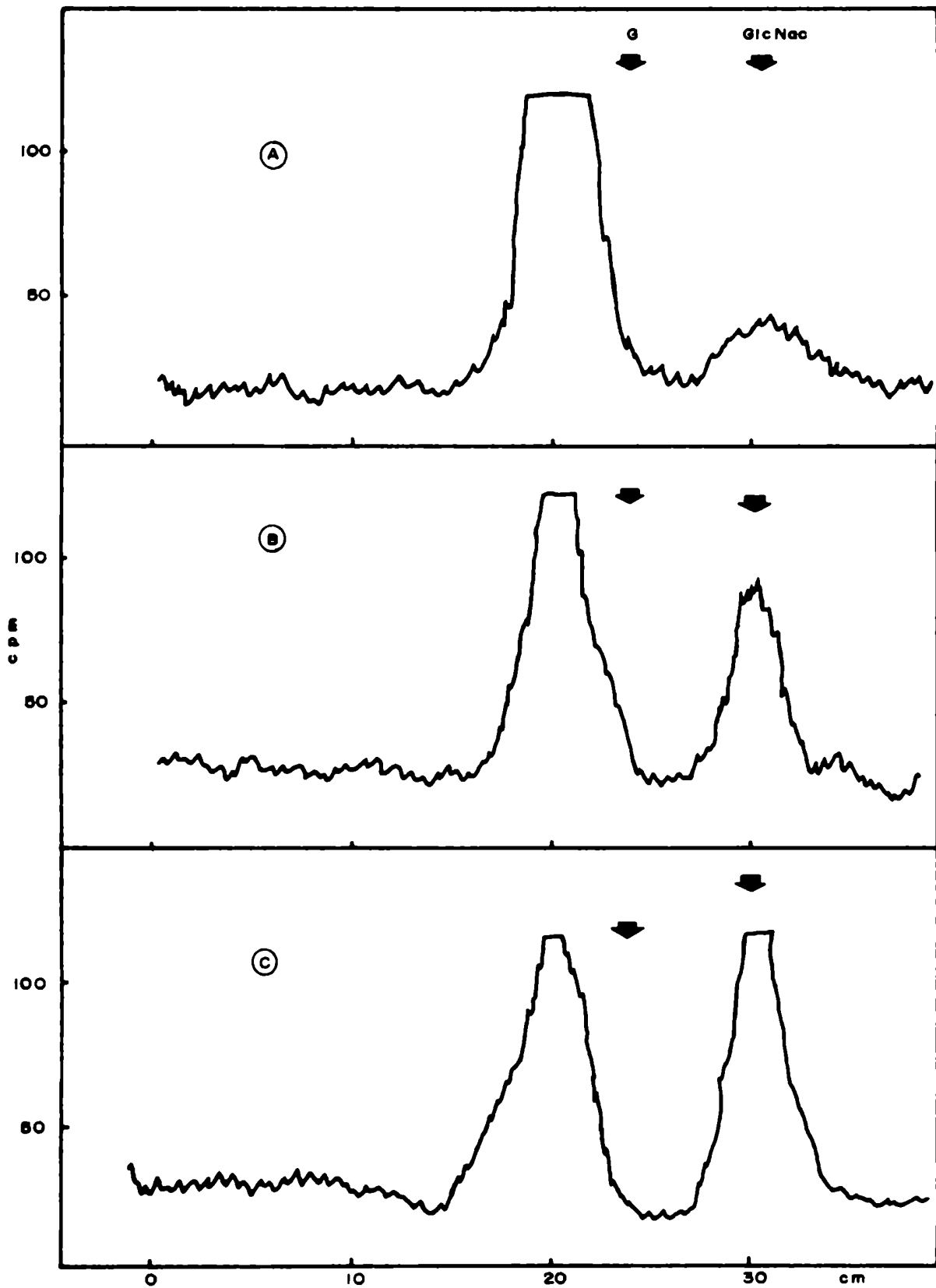


Fig. 16 - Efecto de variar la concentración de deoxicolato de sodio.
La mezcla de reacción se realiza como se indica en Material y Métodos, variando únicamente la concentración del detergente. A=0,5%; B=1%; C= 2%

cleótido-azúcar radioactivo usado.

Otro método alternativo para la síntesis de este lípido-disacárido es por incubación de una fracción lipídica de hígado de cerdo, purificada por DEAE-celulosa de acuerdo a Behrens y col. (111). Esta fracción parecería contener lípido-acetilglucosamina. Al incubar esta fracción lipídica con el nucleótido-azúcar radioactivo, los rendimientos obtenidos son generalmente muy bajos. La marca de N-acetilglucosamina, en el disacárido, se encuentra preferentemente en el extremo no reductor.

Por las razones expuestas más arriba se utilizó para la síntesis del lípido-disacárido en escala preparativa el primer método, donde el nucleótido-azúcar no es radioactivo. En Material y Métodos se describe con más detalle la parte experimental empleada en este trabajo.

Purificación de los lípido-azúcares

Dos métodos se han utilizado principalmente para la purificación de los lípido-azúcares radioactivos. Uno de ellos es por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa y el otro es por columnas analíticas de ácido silícico.

En el primer método el dolicol-pirofosfato-disacárido es adsorbido a una columna preparativa de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo-metanol-agua 10:10:3 (ver Material y Métodos). Después de la adsorción la columna se lava con 30 ml de la mezcla de equilibrio. La elución se efectúa haciendo pasar un gradiente lineal de formiato de amonio entre 0 y 30 mM, con la solución de equilibrio.

El perfil de elución cromatográfica de un experimento tipo se muestra en la Fig. 18. Como puede observarse, el único pico de radioactividad eluye de la columna con una concentra -

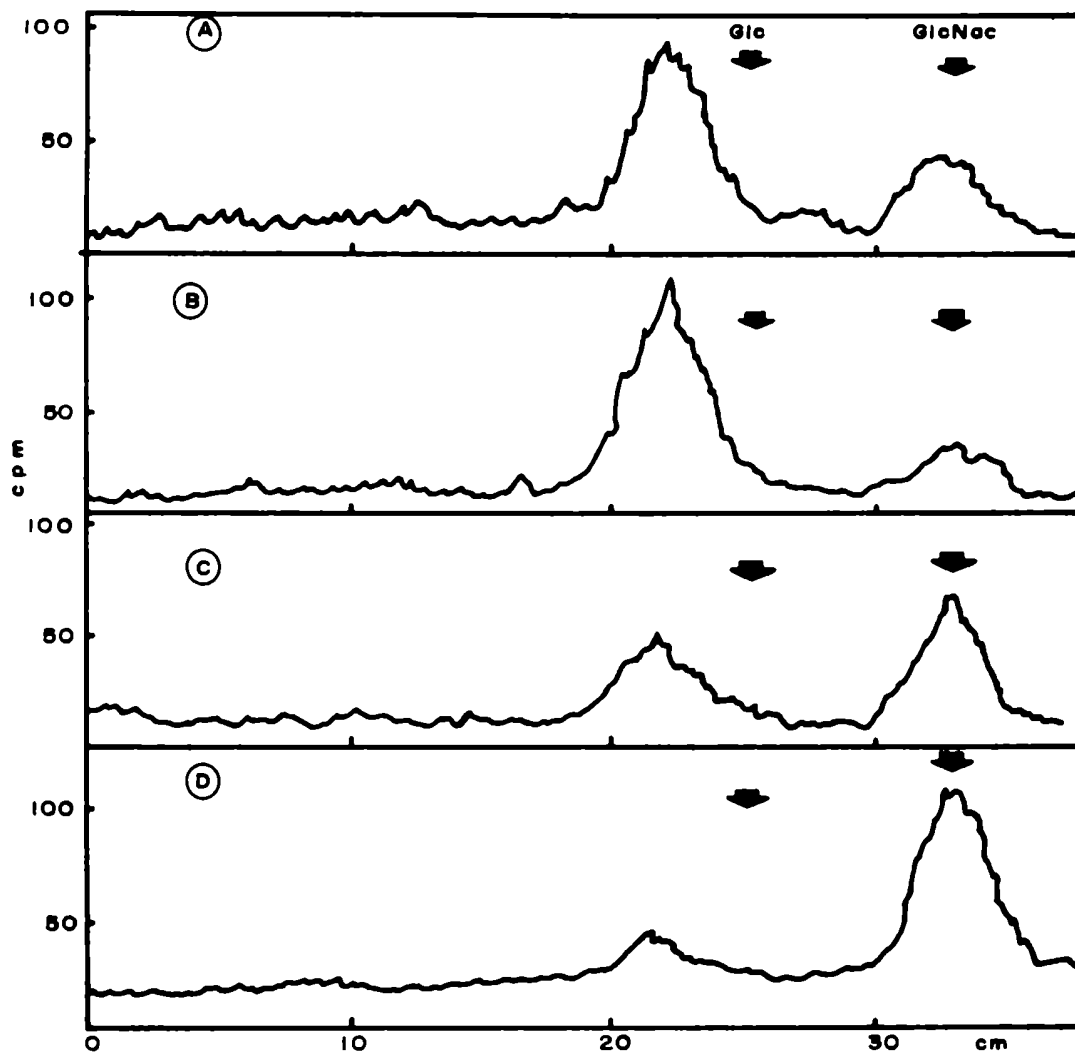


Fig. 17 - Estudio del efecto del pH en la formación del lípi-
do-disacárido .

El buffer usado en la mezcla de incubación es el
Tris-Maleato 0,1 M

A= pH 7,0 ; B= pH 7,8; C= pH 8,4; D= pH 9,0 (en es-
te caso se utilizó buffer carbonato).

ción de formiato de amonio 10 mM. A esta concentración se liberan los lípido-pirofosfato-azúcares(104)(106).

El dolicol-pirofosfato-N-acetilglucosamina tiene el mismo comportamiento cromatográfico que el lípido-disacárido y eluye junto a éste.

Otra forma alternativa, usada para purificar estos lípido-azúcares, es adsorberlos en columnas de DEAE-celulosa pero equilibrada con cloroformo-metanol 2:1. Luego de la adsorción del lípido-azúcar se lava con la solución de equilibrio, después con cloroformo-metanol 1:1, y finalmente se eluye con cloroformo-metanol-agua 10:10:3 con formiato de amonio 30 mM.

Este método tiene la ventaja de que es rápido y que los lípido-azúcares en general se eluyen en pocas fracciones, Fig. 18. Tiene el inconveniente de que no permite la separación de los lípido-P-P-monosacárido de los disacáridos. Por otra parte conviene destacar que este método en general permite obtener buenos rendimientos.

El segundo método utilizado para purificar los lípido-azúcares es el de la cromatografía en ácido silícico. Los lípido-azúcares se separan en pequeñas columnas analíticas de 5mm de diámetro por 15 mm de altura, de ácido silícico en cloroformo. La elución se realiza por un gradiente discontinuo de cloroformo-metanol. El dolicol-P-P-acetilglucosamina eluye con cloroformo-metanol 6:1, mientras que el lípido-disacárido con 2:1.

Este último método de purificación tiene la ventaja de permitir la separación de los lípido-azúcares, pero la recuperación de los mismos es en general variable y no siempre es muy reproducible, ya que es difícil conocer cual es el parámetro que se varía de un ensayo a otro. Por los motivos descrip-

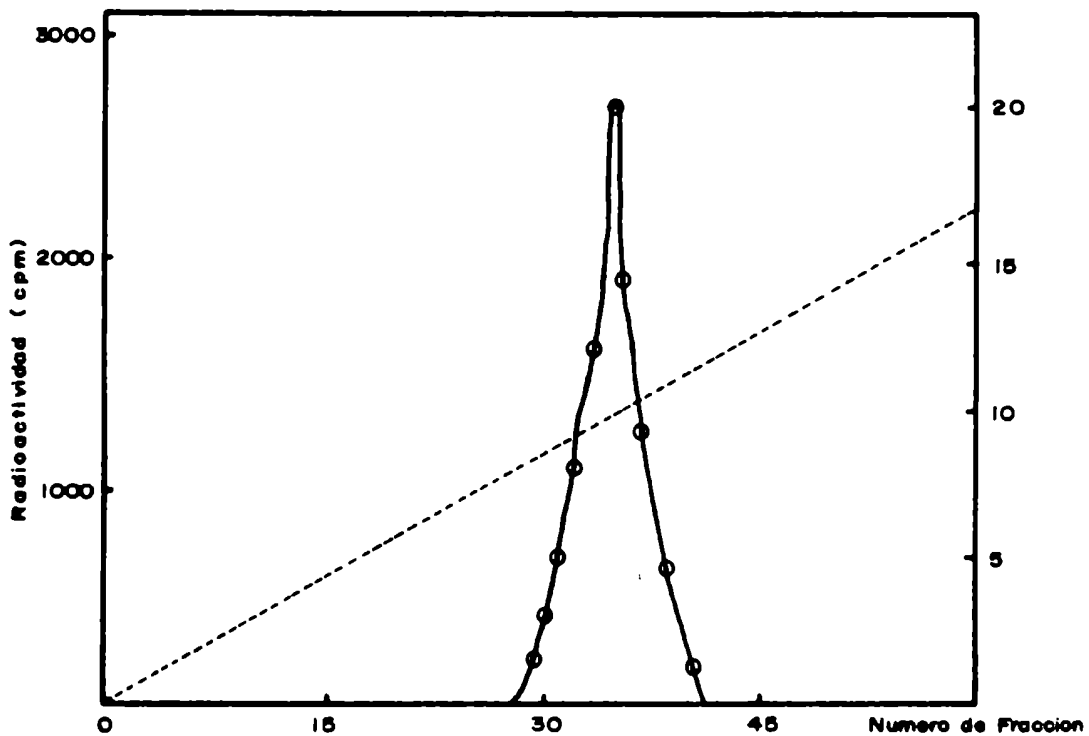


Fig. 18 - Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del lípi-do-disacárido. El lípido-di-N-acetilquitobiosa (alre-dedor de 120.000 cpm de radioactividad) fue purifica-do en columnas de DEAE-celulosa, forma acetato. Se eluyó con un gradiente lineal de formiato de amonio en cloroformo:metanol;água 10:10:3 . Se colectaron fracciones de 4 ml de las cuales se tomaron alícuo-tas de 0,2 ml a fin de determinar la medida de la radioactividad.

tos la purificación de los lípido-azúcares se llevó a cabo por cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo-metanol 2:1.

BIOSINTESIS DE UN LÍPIDO TRISACARIDO

Cuando se incubaba dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa radiactivo, purificado como se explicó en la sección anterior, y GDPMan no radioactivo, en presencia de Mg^{++} y detergente, con la fracción particulada de oviducto de gallina, se obtiene la formación de un nuevo lípido-azúcar.

Este nuevo compuesto, primero se lo extrae de acuerdo al método de Folch (103), encontrándose en el extracto cloroformo metanol. Este extracto luego de lavado y llevado a sequedad se le somete a una hidrólisis ácida suave y la porción no lipídica se separa por cromatografía en papel, como se indica en Material y Métodos.

La Fig. 19 muestra el perfil de radioactividad de la cromatografía de estos compuestos. Allí se puede observar que en el nuevo lípido-azúcar la porción hidrofílica es distinta de la di-N-acetilquitobiosa y la N-acetilglucosamina. En el solvente A este nuevo azúcar migra con respecto a los maltoligosacáridos estandar, casi como la maltotriosa. Ha sido denominado X_3 .

Condiciones experimentales de la mezcla de incubación

Entre el 60 y el 70% del dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa radiactivo presente en la mezcla de incubación, es utilizado en la síntesis del lípido- X_3 radiactivo. Es una condición fundamental para que se forme este nuevo compuesto que el lípido-disacárido haya sido previamente purificado por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa (ver Material y Métodos).

El rendimiento de la síntesis del lípido- X_3 es bastante constante, con una misma preparación enzimática. La actividad de éstas es en general estable y puede conservarse por algunas

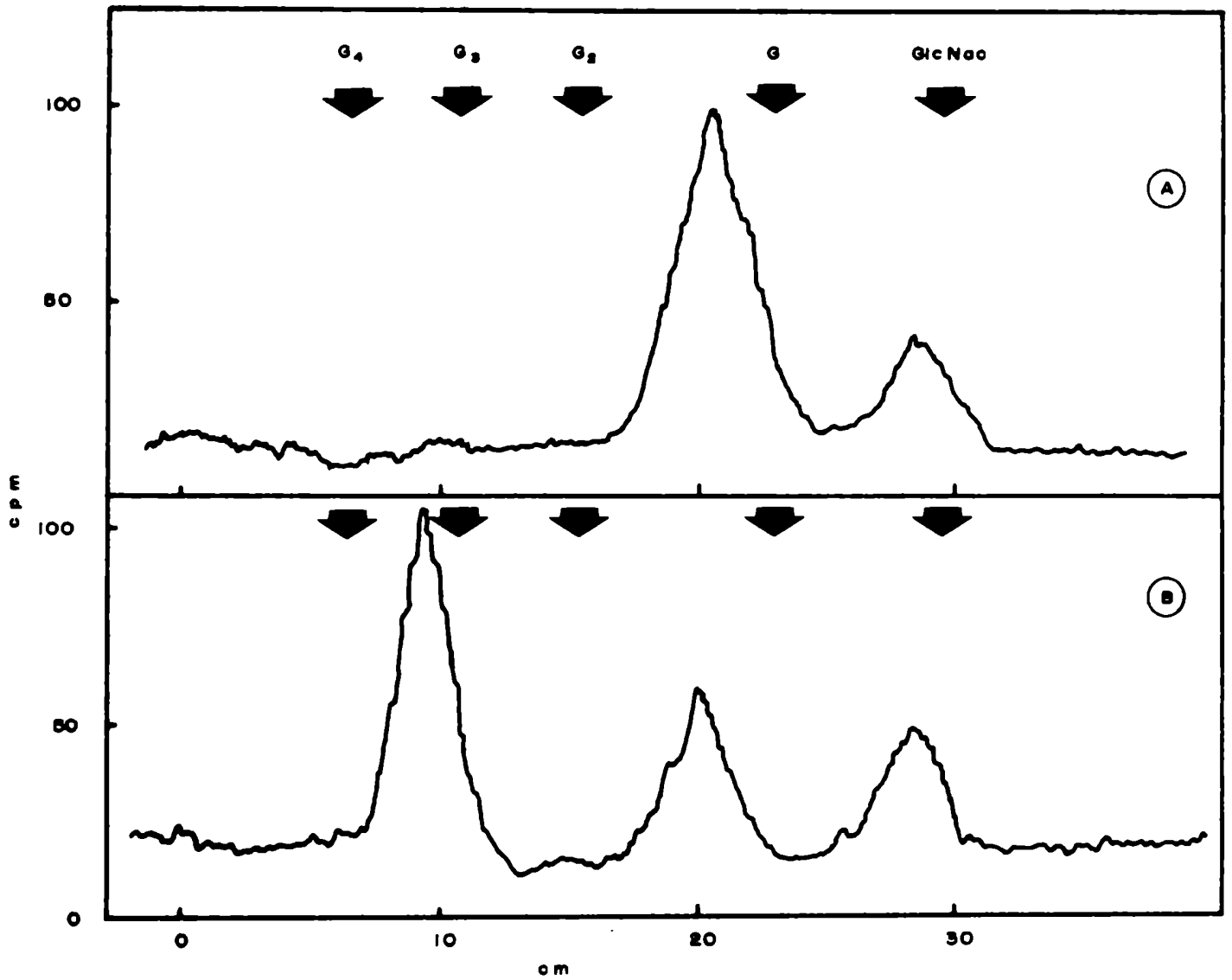


Fig.19 - Perfil cromatográfico de los productos de hidrólisis ácida suave del lípido-azúcar formado por la incubación de dol-P-P-(GlcNac)₂-radioactivo y GDP-Man no marcado. A=control B=incubación con preparaciones enzimáticas de oviducto de gallina.

semanas.

a) Especificidad del compuesto dador de manosa al lípido-disacárido

Para verificar cual es el compuesto dador de manosa en la formación del lípido-X₃ se realizaron incubaciones de dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa con GDPMan no radioactivo y con dolicol-P-manosa, también no radioactivo. Este manolípido fue sintetizado con microsomas de oviducto de gallina, como se describe en Material y Métodos.

En la Fig. 20 B-C , se muestra el resultado de estos experimentos. Se puede observar que practicamente no hay formación del lípido-X₃ a partir del dolicol-P-manosa. Estos hechos nos permiten suponer que la manosa se transfiere al dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa directamente del nucleótido-azúcar.

Como otro control a estos experimentos, dado que los microsomas de oviducto de gallina también sintetizan dolicol-P-manosa, se incubó el lípido-disacárido radioactivo con dolicol-P y GDPMan no radioactivo. La Fig. 20-D, muestra el resultado de este experimento, donde se puede observar que no hay ningún incremento en la cantidad de X₃ formado. Además se puede observar también la aparición de un compuesto radioactivo que no migra en estas condiciones. Este compuesto parece corresponder a un oligosacárido de mayor tamaño y será analizado en detalle más adelante.

Es necesario destacar, que por los resultados expuestos , se puede pensar que esta preparación de oviducto de gallina no tiene GDPMan endógeno. Esto no ha ocurrido con todas las preparaciones; algunas tienen un alto contenido de este nucleótido-azúcar.

b) Efecto de los distintos componentes de la mezcla de incubación.

En la Tabla VIII, se muestra los resultados obtenidos al omitir los distintos componentes de la mezcla de incubación. El efecto del dolicol-P fue estudiado más arriba, donde se observa que el agregado de este lípido-P no afecta la síntesis del lípido- X_3 . Es interesante destacar la dependencia de Mg^{++} de esta reacción y que además este catión no puede ser sustituido por Mn^{++} debido a que con éste la síntesis del lípido- X_3 se ve disminuída.

La síntesis de este lípido-azúcar es también dependiente de la presencia de detergente, debido a que éste solubiliza al dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa utilizado en la reacción. Además aquí también se verifica lo observado en la síntesis de los otros lípido-azúcares: la relación entre la concentración del detergente y la cantidad de enzima microsomal presente en la mezcla de incubación. La Fig. 21-A muestra el resultado obtenido al variar la concentración de DOC, que es el detergente usado preferencialmente. Con Triton X-100, se observa menor formación del lípido- X_3 .

En la Fig. 21-B, se observa el efecto del pH en la síntesis del lípido-azúcar. El pH óptimo coincide con el encontrado para la síntesis del lípido-disacárido. El buffer empleado en este experimento es también Tris-maleato 0,1 M.

En los experimentos mostrados en la Fig. 21, la radioactividad se determinó luego de eluir la zona correspondiente al X_3 ; después de cromatografiarlo en las condiciones que se detallan en Material y Métodos.

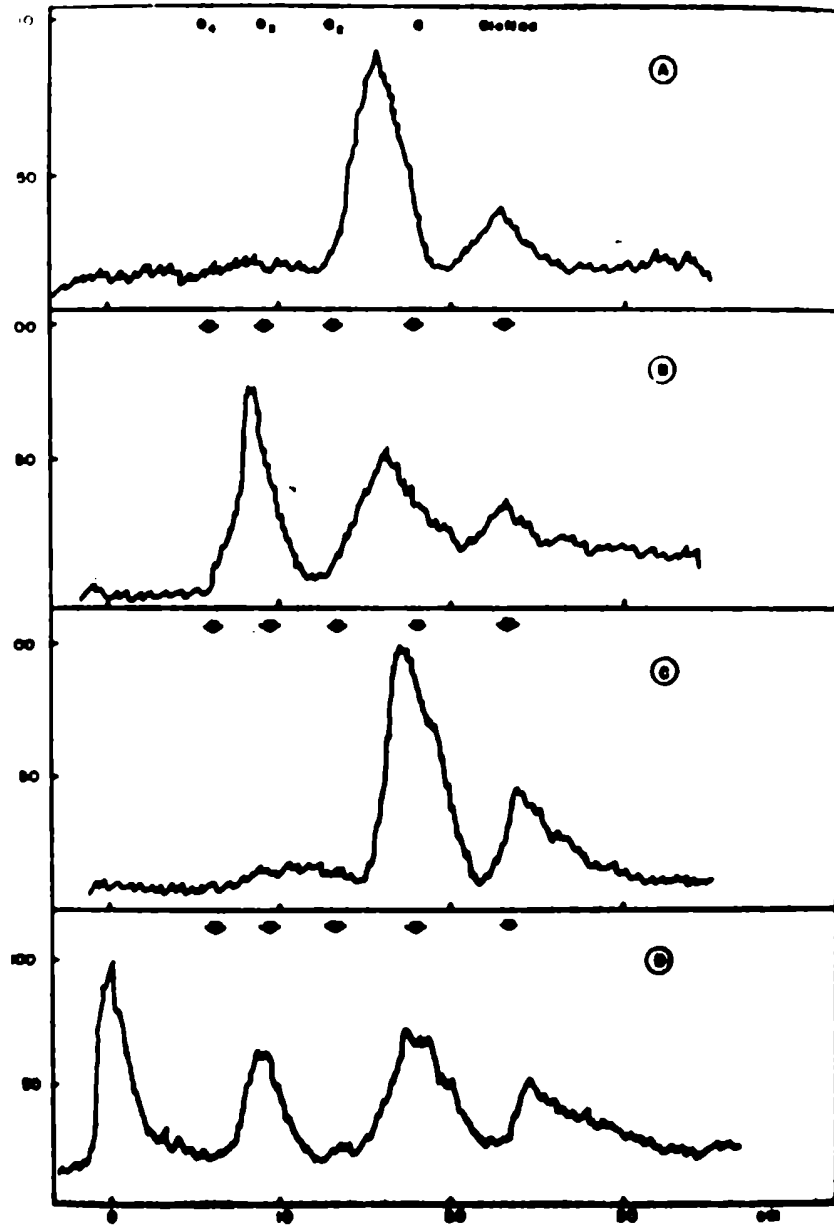


Fig. 20 - Determinación del dador de manosa al lípido-disacárido.

Dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa marcada fue incubado con microsomas de oviducto de gallina. A= Sin adiciones; B= GDPMan 0,3 μ moles; C= Dolicol-P-Man; D= GDPMan 0,3 μ moles y dolicol-P.

TABLA VIII

Transferencia de Man de GDP-Man al Dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa radioactiva.

Componente variado	conc. final	cpm
ninguno		1.600
-Dolicol-P-P-(GlcNac) ₂	-	-
+ Dol-P	30 μ g Pi total	1.400
- Mercaptoetanol	-	700
- DOC	-	400
- GDP Man	-	100
+ Mn ⁺⁺ en lugar de Mg ⁺⁺	15 μ moles	200
+ Enzima calentada (5 min. a 100°C)		110
No incubado		100

La mezcla estandar de incubación está formada por Dol-P-P-di-N-acetilquitobiosa (alrededor de 2.000 cpm) marcada en la GlcNac. Este compuesto se seca junto con 0,5 μ moles de Mg-EDTA y 0,5 μ moles de MgCl y se agrega entonces 0,1 M de mercaptoetanol, 0,1 M de Tris-Maleato pH 7,8, 0,5% de deoxicolato de sodio, 3mM de GDPMan y microsomas de oviducto de gallina (alrededor de 2 mg de proteína). El volumen final es de 50 μ l. Luego de 4 horas de incubación a 30°C, la reacción se detiene como ya se describió.

c) Efecto del tiempo de incubación en la síntesis del lípido- χ_3

En la Fig.22, se observa la formación del lípido- χ_3 en función del tiempo de incubación. Estos resultados muestran que la incorporación de manosa al lípido-disácarido, para sintetizar este nuevo lípido-azúcar, aumenta casi linealmente hasta las 4 horas de incubación. Esta reacción se realiza a 30°C con agitaciones frecuentes.

Es interesante destacar que con algunas preparaciones enzimáticas se observa la aparición de un compuesto que queda en el origen del papel de cromatografía en el solvente A. Este hecho podría deberse a un mayor contenido de dolicol-P y nucleótido-azúcar (GDPMan) en la preparación de microsomas de oviducto de gallina. Esto se va a estudiar más adelante.

Identificación de este nuevo lípido-azúcar

a) Propiedades que le confiere su porción hidrofóbica.

Este nuevo compuesto se comporta como un lípido-azúcar por su solubilidad en los solventes orgánicos. Se lo puede extraer con cloroformo-metanol, de acuerdo al método de Folch.

Por cromatografía en papel en el solvente A, tiene un comportamiento similar a otros lípidos-azúcares-derivados, migrando con el frente del solvente.

Este lípido-sacárido es muy lábil al tratamiento ácido suave al igual que los glicolípidos del tipo prenol-azúcar. En estas condiciones libera un resto hidrofílico, que como se describió más arriba se denomina χ_3 .

Puede ser también adsorbido a columnas de DEAE-celulosa, preparadas como se describe en Material y Métodos. Se lo puede eluir en forma similar al dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa. Es

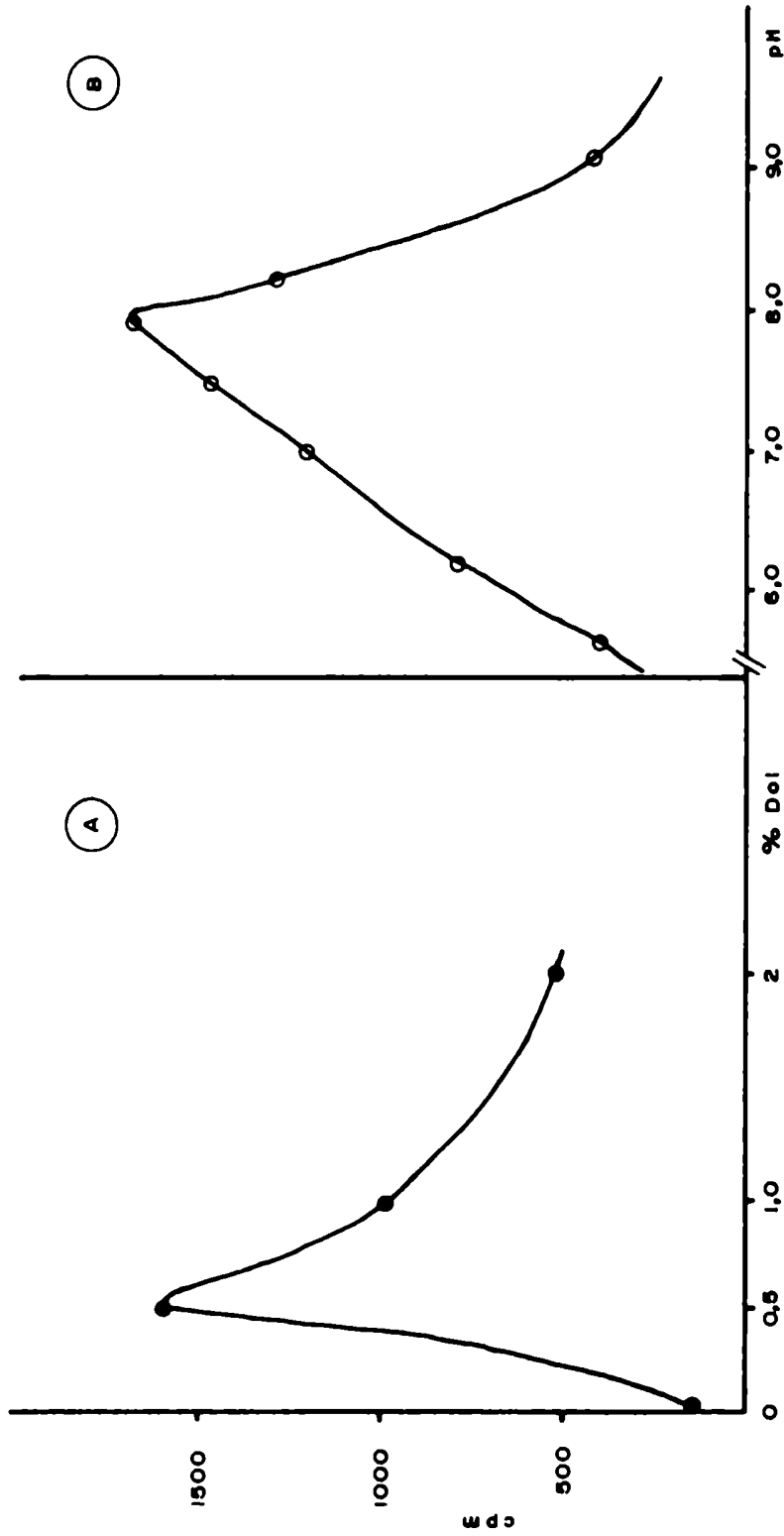


Fig. 21 -Estudio de las condiciones óptimas para la síntesis del lípido X₃.

A= Variación de la concentración de deoxicolato de sodio.

B= Efecto de la variación del pH.

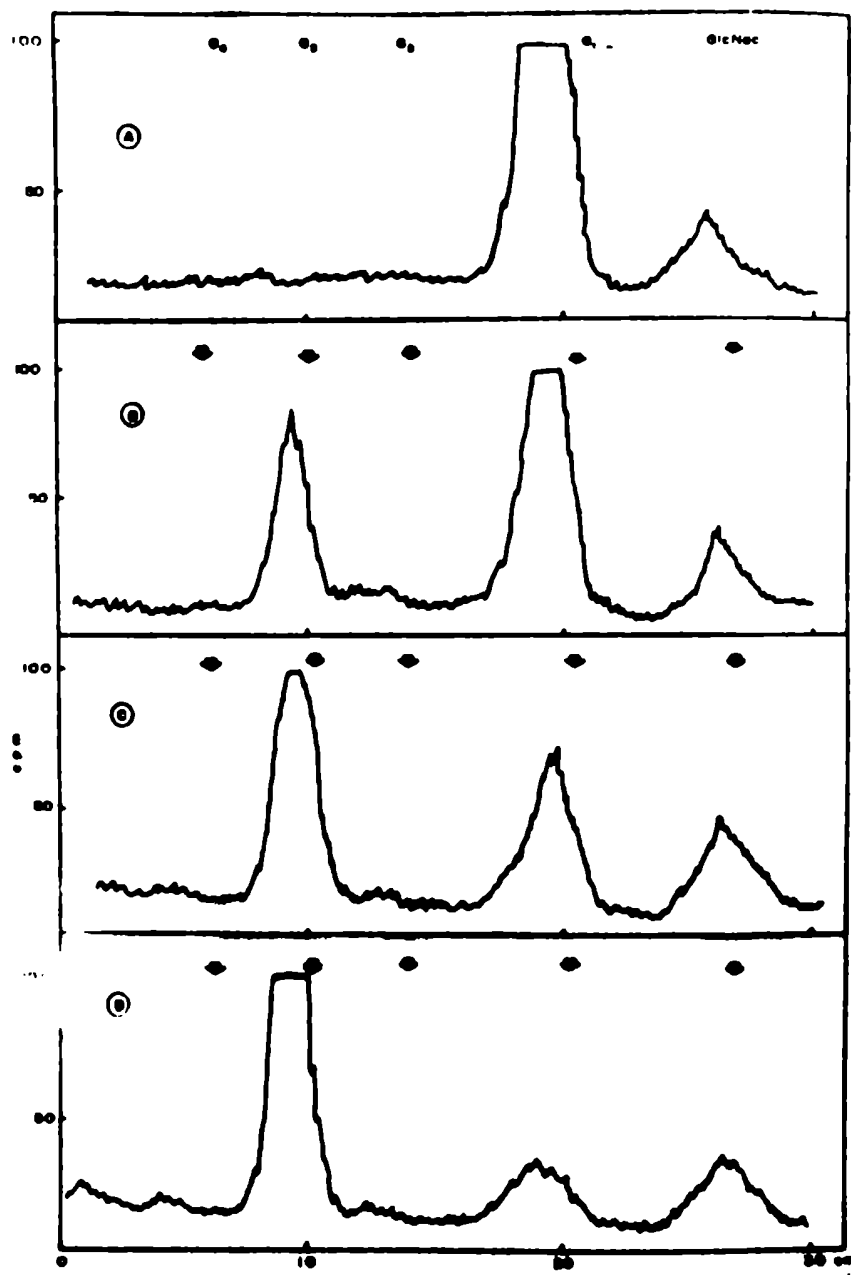


Fig.22 - Formación del lípido-X₃ en función del tiempo de incubación. La mezcla de reacción usada es la que se detalla en Material y Métodos. Luego de la incubación la fracción cloroformo-metanol se somete a hidrólisis ácida suave y se cromatografía en papel en el solvente A. A= incubación en ausencia de GDPMan; B= 1h. ;C= 3 h. ; D= 4 h.

to es un indicio de que la porción hidrofóbica podría ser la misma en ambos compuestos , como era de esperar, de acuerdo a la forma como es sintetizado este compuesto.

Otro hecho adicional sobre la naturaleza de la parte lípídica de este compuesto es su comportamiento en columnas analíticas de ácido silícico. La Fig. 23 muestra que el X₃ eluye con cloroformo-metanol 2:1 , al igual que el lípido-P-P-di-N - acetilquitobiosa.

b) Estudio de la estructura del resto hidrofílico.

La porción hidrofílica, de este nuevo lípido-azúcar, obtenida por cromatografía en papel en el solvente A, ha sido denominada X₃ , porque tiene un R_f bastante próximo a la maltotriosa.

Para determinar la estructura de este compuesto, tres enfoques distintos se realizaron:

- 1.- Se determinó su composición en azúcares.
- 2.- Se estudió su tamaño.
- 3.- Estudio del tipo de unión entre los azúcares que lo componen.

1.- Composición en azúcares.-

Para la determinación de la composición de azúcares del nuevo compuesto sintetizado se realizó una incubación, como se describe en Material y Métodos; en la cual ambos sustratos: GDPMan y dolicol-di-N- acetilquitobiosa estaban marcados con C¹⁴ . Luego de la incubación, la fase cloroformo- metanol de la extracción de Folch fue hidrolizada y cromatografiada en papel en la forma que ya se describió. Después de detectar la zona de radioactividad correspondiente al compuesto denominado X₃, ésta fue eluída con agua y se sometió a una hidrólisis ácida más fuerte (HCl 4N, 6 h. 100°C). El hidrolizado fue cromatografiado por

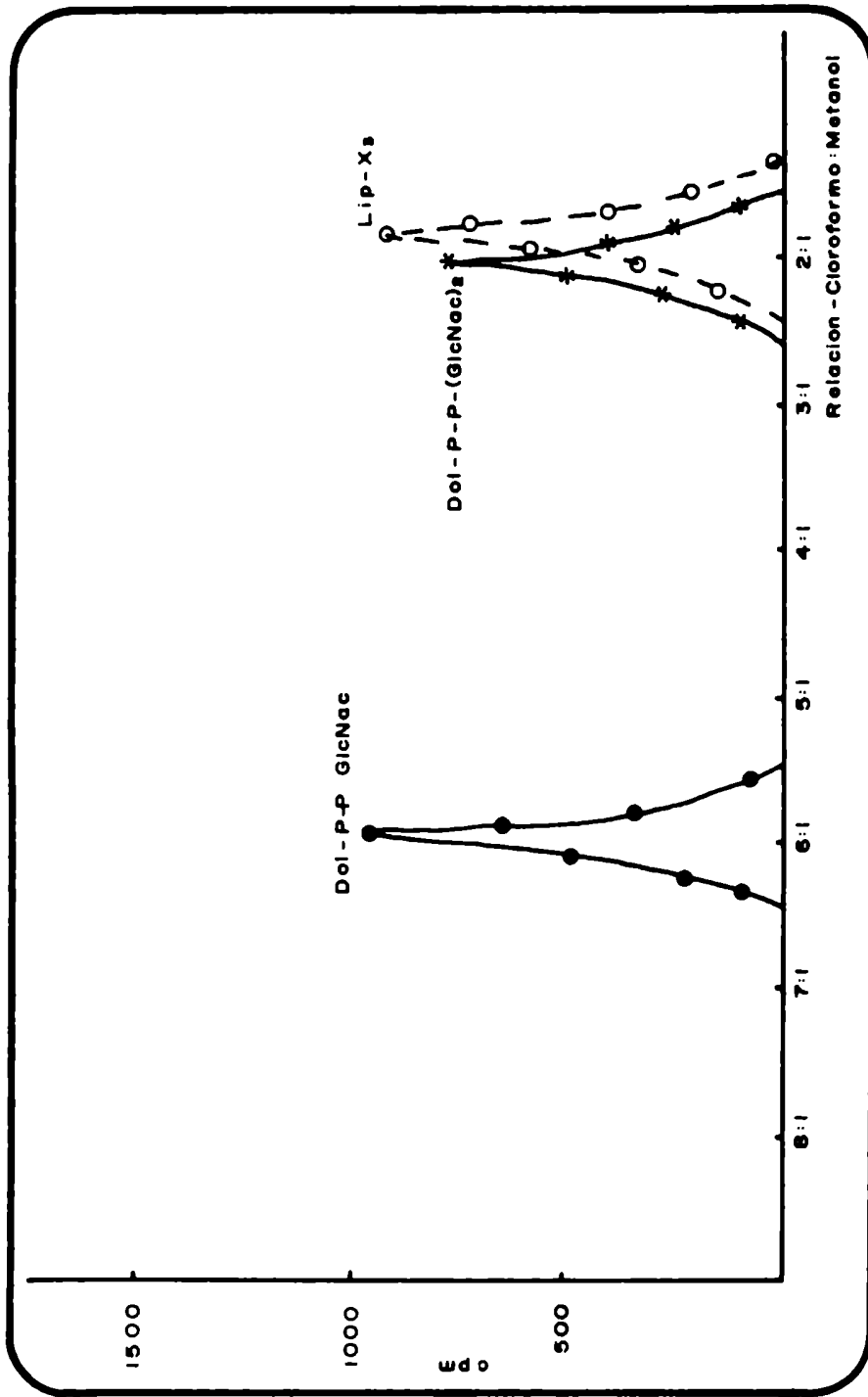


Fig. 23 - Cromatografía en columnas de ácido silícico. Lípido-X₃ (alrededor de 1000 cpm), fue purificado en pequeñas columnas (0,3 cm de diámetro por 1,2 cm de altura) de ácido silícico en cloroformo. La elución se llevó a cabo con mezclas de cloroformo-metanol en distintas porciones. Alícuotas de 200 μ l se tomaron para determinar la medida de la radioactividad.

una columna de Amberlita MB3, forma acetato. Se eluyó primero con HCl 0,1 N y luego con agua, recuperándose toda la radioactividad.

El eluido luego de concentrarlo se cromatografió en papel con el solvente A. Para esta separación cromatográfica el papel usado fue Whatman N° 1, impregnado con Zn como se describe en Material y Métodos. De esta manera se tuvo una buena separación y fueron encontrados dos picos de radioactividad. Estos migraban como la glucosamina y manosa estandar. Estos resultados confirman que el nuevo sacárido sintetizado contiene manosa y N-acetilglucosamina.

2. Estudio del tamaño de la porción hidrofílica.

Para determinar el tamaño del X₃ se usó cromatografía en papel con distintos solventes, a pesar de que no se contaba con buenos oligosacáridos de manosa y acetilglucosamina como estandar. Se prefirió este método con respecto a la separación por filtración molecular en columnas de Bio-gel o Sephadex, ya que es más económico y permite trabajar con pequeñas cantidades del nuevo compuesto.

Con el solvente A, y usando además como estandar maltoligosacáridos, este compuesto migra un poco menos que la maltotriosa como ya se describió anteriormente.

En la Tabla IX, se muestran los R-lactosa de este sacárido cromatografiado en los solventes C y D. Estos resultados se comparan con los datos obtenidos por el grupo de Lumblad, en Estocolmo, (135)(136)(137). Estos investigadores estudiaron, por cromatografía en papel, oligosacáridos de manosa y acetilglucosamina de orina de pacientes que sufrían de manosidosis. Como se puede observar en la Tabla IX, los R-lactosa del com -

puesto X_3 se encuentran en la región de los trisacáridos, diferenciándose perfectamente del grupo de los disacáridos y de los tetrasacáridos que se usaron como estandar. Esto da bastante confianza para pensar que este compuesto se trata de un trisacárido.

Por otro lado, estos resultados no nos permiten afirmar si este trisacárido está formado por dos moléculas de manosa y una de N-acetilglucosamina, como el trisacárido obtenido por el grupo de Lumblad, o si en cambio tiene una sola molécula de manosa y dos moléculas de N-acetilglucosamina.

3 - Estudio del tipo de unión entre los azúcares que lo componen.

Con los datos obtenidos, sobre la estructura del compuesto X_3 se puede decir que se trata de un trisacárido y que contiene manosa y N-acetilglucosamina.

El primer problema a estudiar era determinar su composición cuantitativa en azúcares.

Para este estudio se utilizó el trisacárido previamente purificado por cromatografía en papel. En este compuesto la marca se encontraba en la N-acetilglucosamina del extremo reductor.

Se trabajó con tres glicosidasas: α -manosidasa, β -manosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa, de diferentes fuentes. En cada preparación enzimática la actividad fue testada con los p-nitrofenilderivados de acuerdo al método de Levvy y col.(126). Una vez finalizada la incubación del X_3 con una glicosidasa, los productos de la reacción fueron cromatografiados en papel, como se describe en Material y Métodos.

TABLA IX

Cromatografía en papel del oligosacárido X₃ en distintos solventes.

Solventes	A	B	C
Sustancias	Movilidad con respecto a la lactosa		
GlcNac	2,8	1,6	4,5
Glc	2,05	1,38	2,9
Maltosa	1,21	1,19	1,30
Sacarosa	1,80	1,00	-
GlcNac-GlcNac	1,89	1,39	2,47
Glc-Glc-Glc	0,71	0,98	0,56
Man-Man-GlcNac	0,84*	0,93*	0,82*
X ₃	0,79	1,03	0,89
Glc-Glc-Glc-Glc	0,40	0,82	0,25
Man-Man-Man-GlcNac	0,39*	0,48*	0,46*
Man-Man-Man- Man-GlcNac	0,12*	0,20*	0,21*

* Resultados obtenidos por el grupo del Dr. Lumblad(137).

El X₃ fue sintetizado como se detalla en la Tabla III.

Luego de hidrólisis ácida suave fue purificado por cromatografía en papel.

a) Estudio con α -Manosidasas.

Dos preparaciones de α -manosidasa fueron utilizadas. Una de ellas fue purificada a partir de poroto (Canavalia ensi-forme) de acuerdo al método de Li (124). La otra enzima se purificó a partir de bromelina según la técnica de Li y Lee (123). Los detalles de estas preparaciones enzimáticas se encuentran en Material y Métodos.

En la Fig. 24 se observa que la α manosidasa de bromelina no tiene acción sobre el X₃. Resultados semejantes se obtienen con la glicosidasa obtenida de porotos. Como control de la actividad de estas preparaciones enzimáticas se realizó incubaciones con oligosacáridos que contenían manosa radioactiva. En la Fig. 24 se observa la liberación de manosa de estos substratos, por acción de la α -manosidasa de bromelina. Resultados semejantes se han obtenido con la glicosidasa de la otra fuente.

Estos oligosacáridos de manosa ¹⁴C se obtuvieron por hidrólisis ácida suave, seguida de cromatografía, de los lípidos oligosacáridos radioactivos. A su vez estos compuestos fueron sintetizados a partir de GDPMan radioactivo e incubados en presencia de microsomas de oviducto de gallina. En estas condiciones hay transferencia de manosa a lípidos endógenos, de acuerdo a lo que se describió en este Instituto con microsomas de hígado (III).

b) Estudio de la acción de la β -manosidasa.

Esta enzima fue obtenida a partir de saliva humana dializada, de distintos donadores. Se encontró que en saliva la actividad de las diferentes glicosidasas es muy variable y depende de los distintos donantes.

Para este estudio se eligió una preparación que tenía

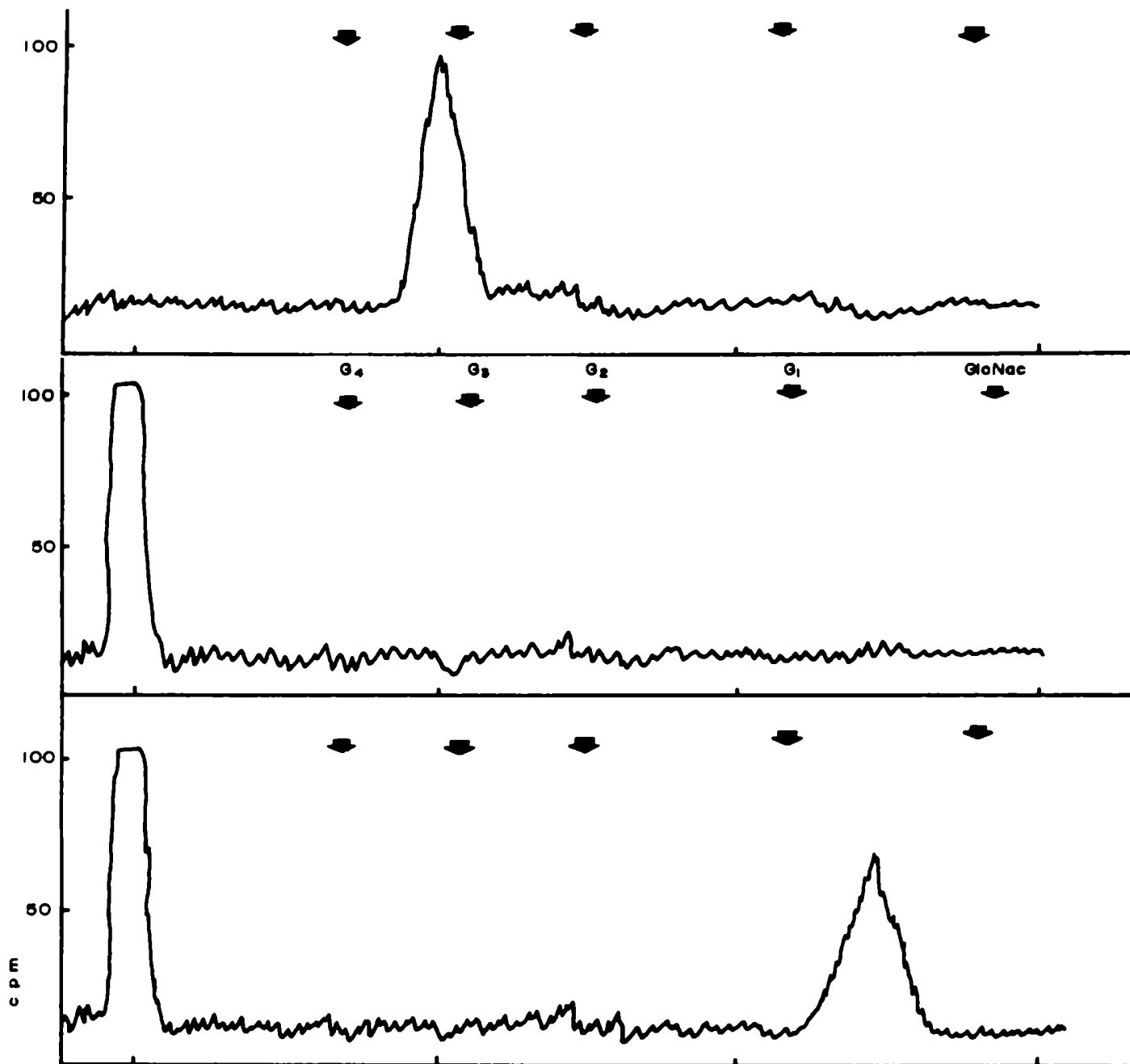


Fig. 24 - Acción de la α -manosidasa sobre X_3 . Como control se utilizó un oligosacárido de manosa radioactivo de oviducto preparado en forma similar a lo explicado en Resultados.

A= X_3 incubado con α -manosidasa de bromelina;

B= oligosacárido de manosa radioactivo no incubado;

C= igual a B pero incubado con α -manosidasa de bromelina.

Similares resultados se obtuvieron con α -manosidasa de Canavalia ensiforme.

una alta actividad de β -manosidasa, muy poca actividad de α -manosidasa, y actividad normal de β -N-acetilglucosaminidasa. (dador P).

La Fig. 25 A-B, muestra los resultados obtenidos de la acción de esta preparación enzimática sobre X_3 luego de 25 horas de incubación. Se muestra que parte del X_3 es hidrolizado obteniéndose un pico de radioactividad que corresponde a la N-acetilglucosamina. Este resultado puede ser explicado por la acción de la β -N-acetilglucosaminidasa que contamina esta preparación. Con el objeto de bloquear la acción de esta enzima se agrega a la mezcla de incubación, 2-acetoamido-2-deoxi-glucolactona, que es un fuerte inhibidor de la misma, (este fue preparado de acuerdo a Findlay y col.(75)).

El efecto de este inhibidor ya fue estudiado con esta misma preparación enzimática por su acción sobre la di-N-acetilquitobiosa.

En la parte C de la Fig. 25 se muestra el resultado de este experimento con el agregado de inhibidor. Se observa la formación de un nuevo compuesto que migra como un disacárido. Este compuesto fue identificado como di-N-acetilquitobiosa.

c) Estudio de la acción de la β -N-acetilglucosaminidasa.

La tercer glicosidasa utilizada fue la β -N-acetilglucosaminidasa de dos fuente distintas. Una de ellas se obtuvo de una preparación de saliva humana dializada de otro donante que contenía una alta actividad de esta enzima y muy baja de las α y β -manosidasas.

La Fig. 26, muestra que esta preparación enzimática no tiene acción sobre el trisacárido X_3 . Mientras que en las mismas condiciones de incubación se hidroliza parcialmente la

di-N-acetilquitobiosa. La otra preparación enzimática se obtuvo de oviducto de gallina y fue purificada como se detalla en Material y Métodos. Esta preparación no tenía actividad de α y β -manosidasas dentro de los límites de detección con el ensayo estandar.

La Fig. 26 muestra el resultado de la incubación de X_3 con la β -N-acetilglucosaminidasa purificada de oviducto de gallina, donde puede apreciarse que por su acción se libera únicamente N-acetilglucosamina. Este resultado es diferente a lo esperado.

Teniendo en cuenta estos resultados se planeó una serie de experimentos en los cuales el X_3 tuviera la marca radioactiva no en la N-acetilglucosamina del extremo reductor sino en la manosa. Para sintetizar el X_3 marcado en la manosa se realizó una incubación, de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos, pero a partir de dolicol-P-P-N-acetilquitobiosa no marcado y de GDPMan radiactivo. Luego se extrajo el lípido, se lo hidrolizó y purificó en la forma que se detalla anteriormente.

Si entonces se incuba X_3 marcado en la manosa con β -N-acetilglucosaminidasa de oviducto se obtiene la formación de un nuevo compuesto, Fig. 27. Este nuevo azúcar en el solvente A migra como la maltosa y ha sido denominado X_2 .

La Tabla X, muestra los R-lactosa de este compuesto obtenido por cromatografía en papel en tres diferentes solventes. Estos resultados apoyan la idea de que este nuevo compuesto se trata de un disacárido y que además es distinto de la di-N-acetilquitobiosa.

Se analiza con más detalle los datos obtenidos por cromatografía en papel con el solvente D de este nuevo compuesto

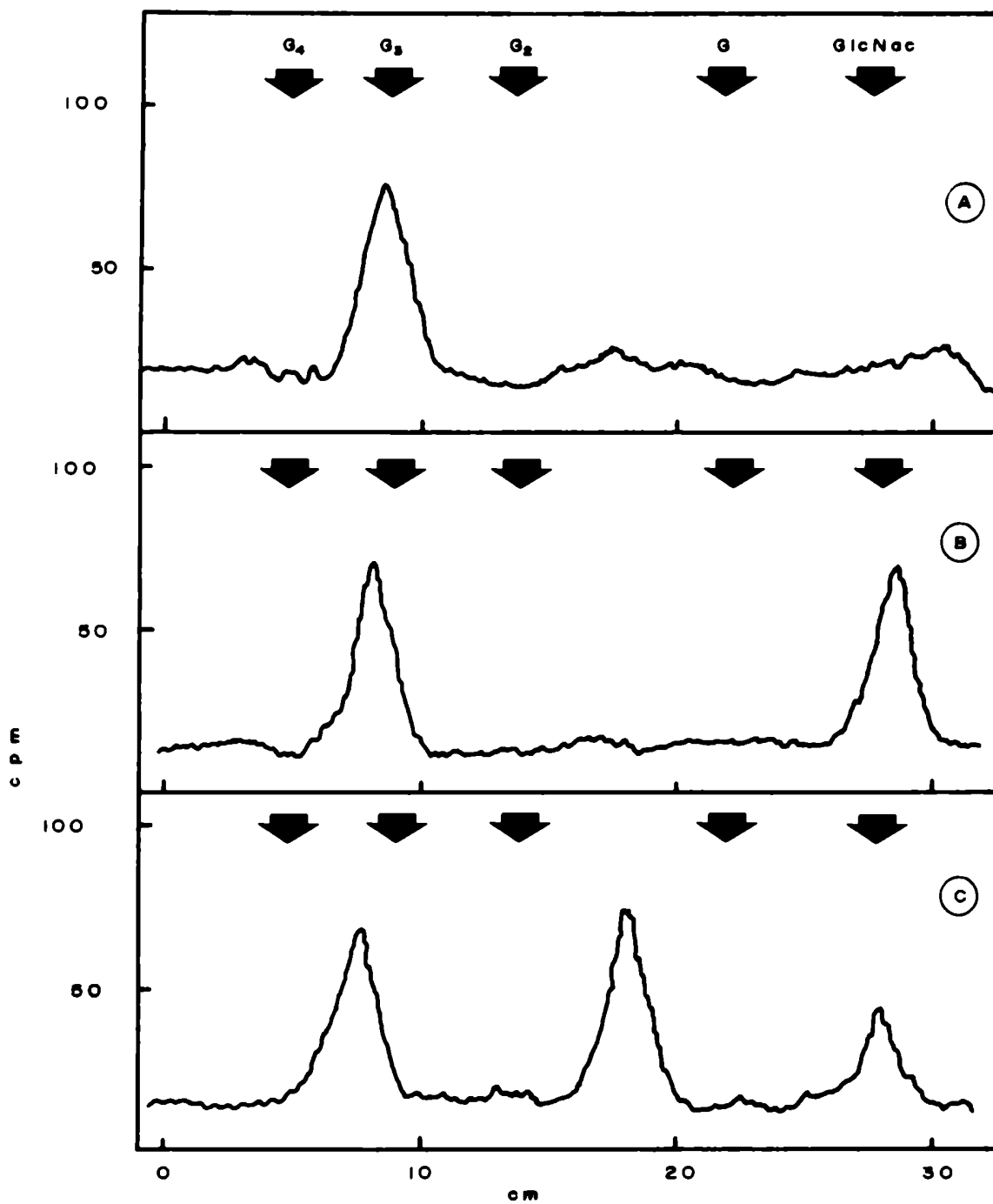


Fig. 25 - Acción de glicosidasas sobre X₃

A= control sin incubar.

B= incubado 25 horas con β -manosidasa más β -N-acetilglucosaminidasa de saliva humana, (dador P., Tabla V)

C= la misma incubación que en B pero en presencia de 2mg de 2-acetoamido-2-deoxigluconolactona.

y se lo compara con los R-lactosa de los oligosacáridos de manosa y N-acetilglucosamina obtenidos por el grupo de Lumblad (137) con este mismo solvente. Graficando los logaritmos de los R-lactosa de los oligosacáridos de manosa y acetilglucosamina, del grupo de Lumblad, en el solvente D, en función del número de restos azúcares, se obtiene una recta. Si ésta se continúa se puede determinar el valor del logaritmo del R-lactosa del disacárido formado por manosa y N-acetilglucosamina. Este valor calculado coincide con el logaritmo del R-lactosa del compuesto X_2 , obtenido experimentalmente en el solvente D. Fig 28.

Conviene destacar que estos resultados son una aproximación ya que se está comparando con una familia de compuestos lineales donde todos tienen una N-acetilglucosamina en el extremo reductor y manosa en posición α . No obstante, se puede pensar que este compuesto (X_2) es un disacárido y que estaría formado por manosa y N-acetilglucosamina.

d) Unión del trisacárido a una aglutinina de arveja.

Se buscó verificar los resultados obtenidos por el tratamiento con las distintas glicosidasas sobre el tipo de unión de la manosa a la di-N-acetilquitobiosa. Se estudió la unión del trisacárido a la concanavalina A y una aglutinina de arveja.

Debido a que no precipitaba el compuesto X_3 radioactivo con las aglutininas, se estudió su interacción con la técnica de filtración en columna de Bio-gel (108). A tal efecto se utilizó columnas de Bio-gel P-60 (16x0,8 cm) equilibradas en un buffer de tris-maleato 50 mM, pH 7,0 conteniendo $MgCl_2$ 4mM y NaCl 3M.

La Fig. 29 muestra el resultado de este experimento,

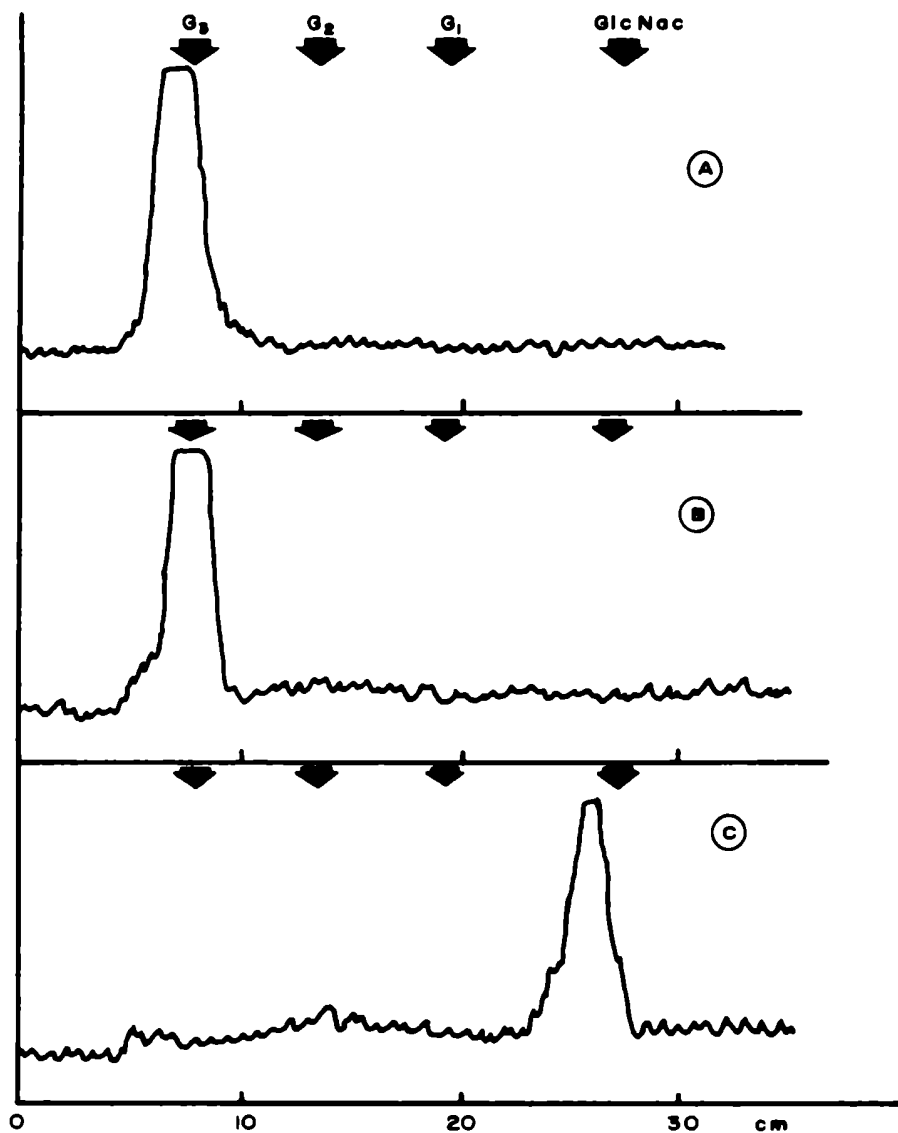


Fig. 26 - Estudio de la acción de la β -N-acetilglucosaminidasa sobre X_3 . (este compuesto está marcado en la GlcNac del extremo reductor).
A= control incubado sin enzima;
B= X_3 incubado con enzima obtenida de saliva humana; (dador M Tabla V).
C= X_3 incubado con la glicosidasa purificada de oviducto de gallina.

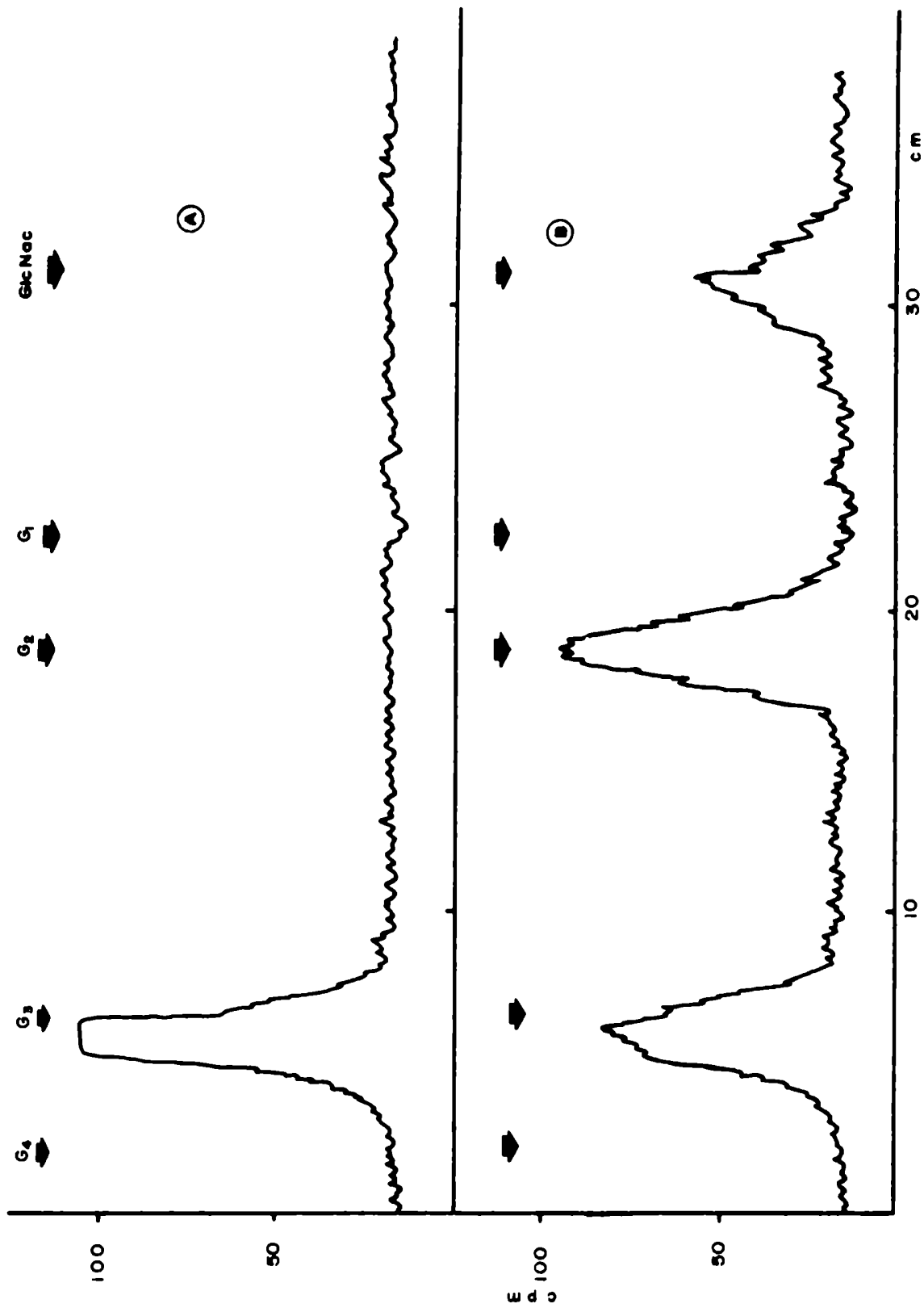


Fig. 27 -Acción de la β -N-acetilglucosaminidasa de oviducto de gallina sobre X₃.
(El trisacárido radioactivo usado en esta incubación estaba marcado en la manosa).
A= X₃ incubado sin enzima; B= X₃ incubado con glicosidasa purificada de oviducto de gallina. El nuevo compuesto obtenido se denomina X₂.

TABLA X

Cromatografía en papel del producto de la incubación de X₃, marcado con (¹⁴C) Man, con β -N-acetilglucosaminidasa de oviducto de gallina.

Solvente	A	C	D
Sustancias	Movilidad con respecto a la lactosa		
GlcNac	2.80	1.6	4.5
Glc.	2.05	1.38	2.9
Maltosa	1.21	1.20	1.3
Sacarosa	1.8	1.0	—
	1.20	1.20	1.84 X ₂
di-N-acetilquitobiosa	1.89	1.39	2.47
Maltotriosa	0.71	0.98	0.56
X ₃	0.79	1.03	0.89
Maltotetraosa	0.40	0.82	0.25

El compuesto denominado X₂ fue obtenido como se detalla en Resultados; por acción de la β -N-acetilglucosaminidasa de oviducto de gallina sobre X₃ sintetizado a partir de Dol-P-P-di-N-acetilquitobiosa y GDP (¹⁴C)Man. La movilidad de este compuesto (X₂) con respecto a la lactosa en distintos solventes permiten apoyar la idea de que se trata de un disacárido.

donde se puede observar que el trisacárido se incluye en la columna, de acuerdo a lo que se podía esperar por su bajo peso molecular. Similar resultado se obtiene cuando se agrega la mezcla donde el χ_3 se preincuba con concanavalina.A. En un experimento semejante, donde el trisacárido se preincuba con la aglutinina de arveja, eluye con el volumen muerto de la columna.

Síntesis del lípido-trisacárido en distintos tejidos.

El trisacárido obtenido por este mecanismo de síntesis es común a un gran número de glicoproteínas cuyo resto azúcar está unido a la asparagina. Este trisacárido se encuentra en todas estas glicoproteínas en la porción más interna de la cadena de azúcares (162). Entre estas glicoproteínas tenemos por ejemplo el oligosacárido de la ovoalbúmina.

Debido a estos hechos era de gran interés determinar si la formación de este compuesto ocurría únicamente con preparaciones de oviducto de gallina, o si éste es un mecanismo general para la síntesis de este trisacárido.

A tal efecto se hicieron preparaciones de microsomas de distintos tejidos, como se detalla en Material y Métodos. Se realizaron incubaciones en las mismas condiciones que con oviducto de gallina y se encontró que todas las preparaciones enzimáticas de los tejidos estudiados, entre ellos, bazo, riñón, tiroides, hígado, sintetizaban este compuesto. Luego de la incubación, los lípido-azúcares formados fueron extraídos por el método de Folch y se cromatografió en papel los productos hidrofílicos obtenidos por la hidrólisis ácida suave.

La Tabla XI, compara los valores de los R_g , de los compuestos sintetizados con microsomas obtenidos de los distintos tejidos estudiados.

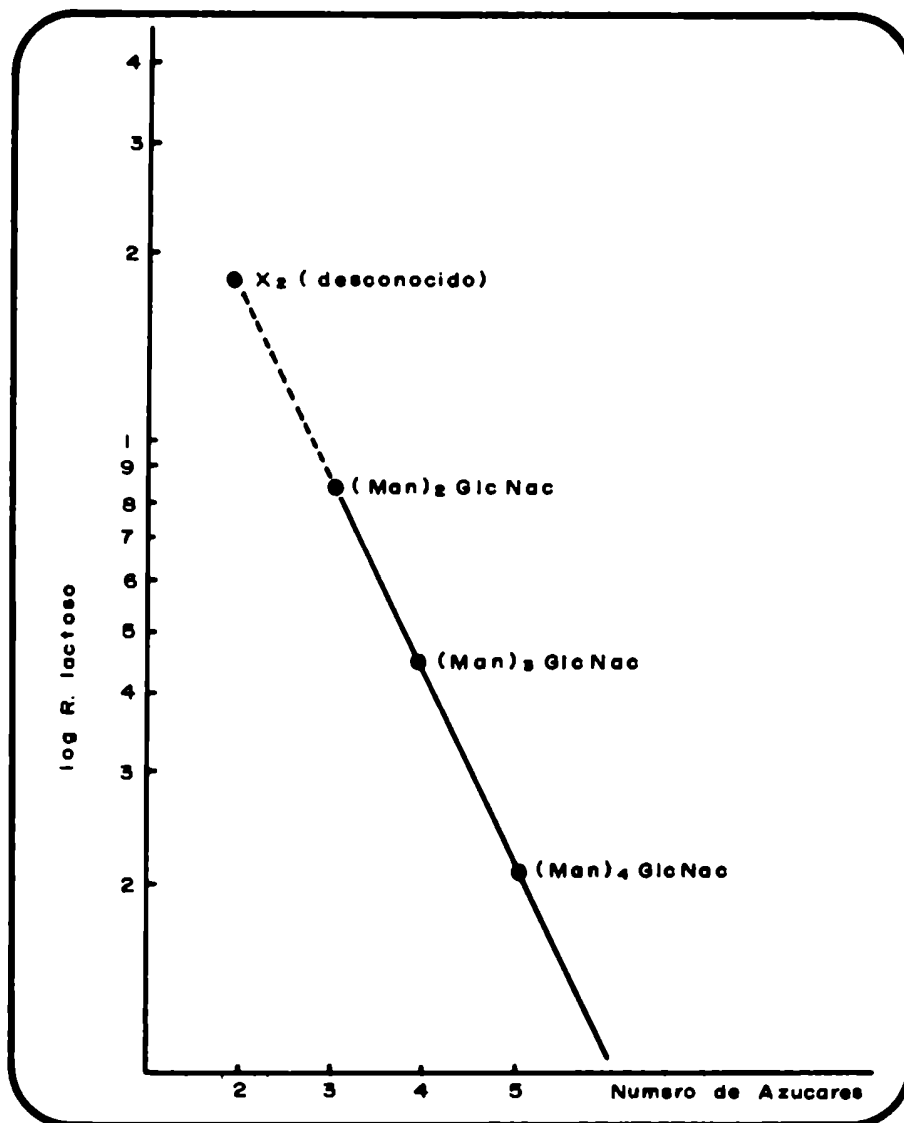


Fig. 28 - Log. de los R-lactosa de los oligosacáridos de manosa y N-acetilglucosamina obtenidos por Lumblad (136) y (137), en función del número de restos de azúcares.

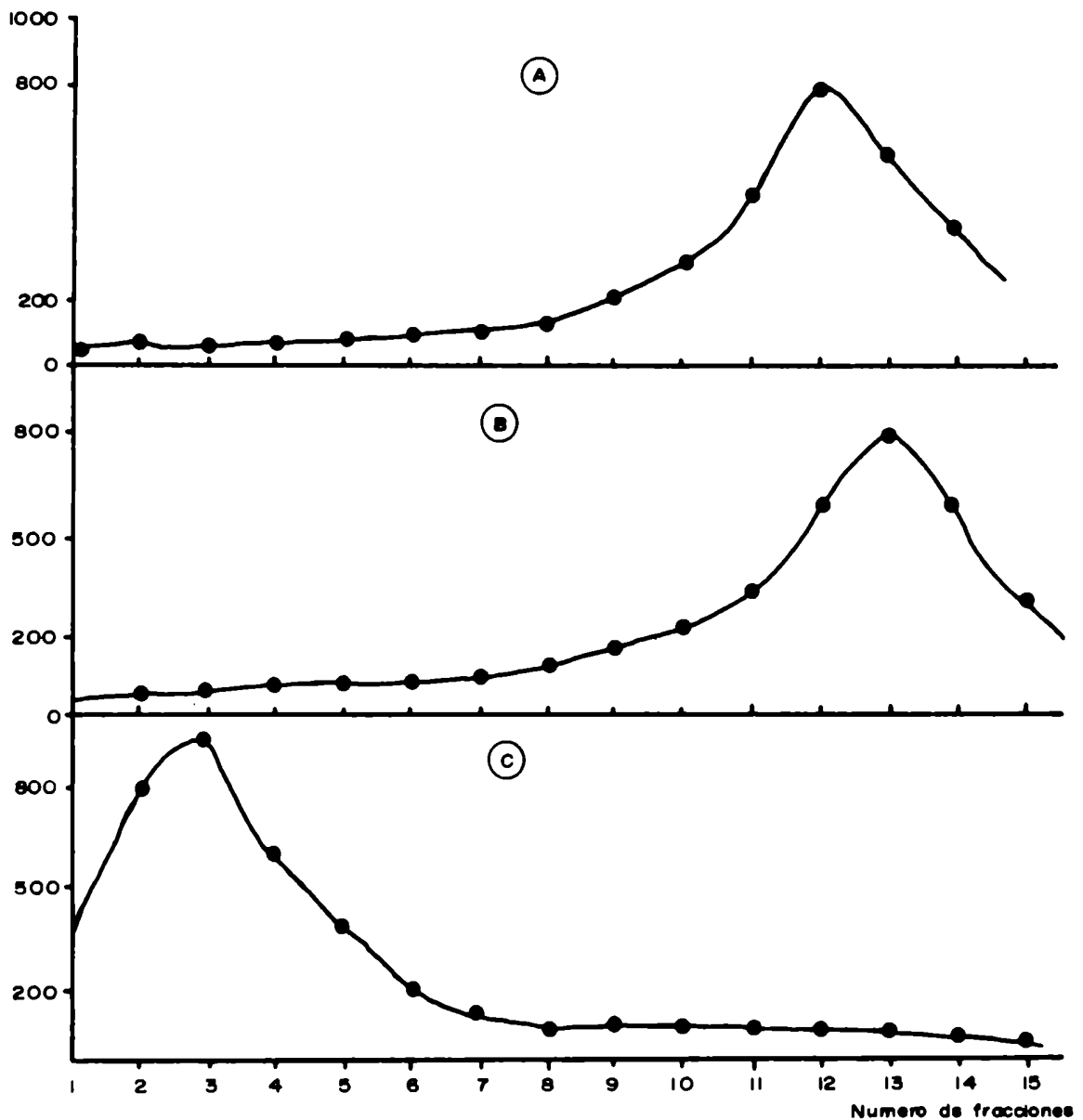


Fig. 29 - Filtración en gel del trisacárido incubado:
A= solo; B= en presencia de concanavalina A; C=en presencia de aglutinina de arveja.
Las muestras con o sin aglutinina fueron puestas en columnas de Bio-Gel P60. Fracciones de 0,5 ml fueron colectadas y medidas con solución de Bray en un contador de centelleo.

Formación de oligosacáridos mayores.

Cuando se incubaba dolicol-P-P-N-acetilquitobiosa radioactiva, en presencia de dolicol-P y GDPMan no marcado, con microsomas de oviducto de gallina se obtiene, por cromatografía en papel de los productos hidrofílicos, además de la formación de λ_3 , un compuesto que en estas condiciones permanece en el origen y que parece corresponder a un oligosacárido de mayor tamaño.

A fin de estudiar con mayor detalle la formación de este compuesto se incubó microsomas de oviducto de gallina, lípido-trisacárido radioactivo y dolicol-P, en presencia de Mg^{++} y detergente y además se agregó GDPMan no radioactivo. El lípido- λ_3 había sido previamente purificado por cromatografía en DEAE celulosa y contenía algo de lípido di-N-acetilquitobiosa, como impureza de la preparación enzimática.

Después de incubar 4 horas a $30^\circ C$, la reacción fue detenida y los productos lipídicos se extrajeron por el método de Folch. La fase orgánica fue lavada y la proteína de la interfase de la partición fue entonces extraída 3 veces con cloroformo-metanol-agua en la proporción 10:10:3. Esta mezcla cloroformo-metanol, casi saturada con agua, es bastante polar y permite la extracción de lípido-azúcares en los que la porción hidrofílica está formada por un gran número de monosacáridos; (como fue encontrado en el Instituto, para el caso del lípido oligosacárido que contiene glucosa (104).

Parte de estos compuestos se extraen en la fase orgánica del Folch y el resto se libera al tratar la proteína de la interfase con la mezcla recién descrita. Después se llevó a sequedad estos extractos y se efectuó una hidrólisis ácida suave.

TABLA XI

Cromatografía en papel del trisacárido sintetizado con microsomas preparados de distintos tejidos.

Solventes	A	C
Microsomas de:	Movilidad con respecto a la glucosa	
Riñón de rata	0,40	0,51
Hígado de rata	0,39	0,50
Oviducto de gallina	0,39	0,51
Bazo de rata	0,40	0,49
Tiroides de cerdo	0,39	0,49

Los resultados mostrados corresponden a la movilidad relativa con respecto a la glucosa de los trisacáridos sintetizados de acuerdo a la Tabla III, variando la fuente de enzima. Los X₃ utilizados fueron previamente purificados por cromatografía en papel, como ya se describió, (ver Material y Métodos).

Los productos hidrofílicos de esta incubación se los separó por cromatografía en papel en el solvente A.

La Fig. 30-B , muestra el resultado de este experimento donde se observa la aparición de compuestos radioactivos que no migran en estas condiciones. En cambio en las incubaciones en las cuales no se adiciona dolicol-P la formación de estos compuestos es mucho menor, como puede observarse en la Fig.30-C Por otro lado cuando el nucleótido-azúcar (GDPM_{an}) es reemplazado en la mezcla de incubación por el dolicol-P-manosa no radioactivo se observa incremento en la formación de oligosacáridos de mayor tamaño, Fig. 30-D.

Cuando el resto hidrofílico de este nuevo lípido oligosacárido se cromatografía en el solvente B se observa la aparición de 3 picos de radioactividad , Fig. 31.

El solvente B, (butanol, piridina, agua 4:3:4), da una muy buena separación de oligosacáridos de gran tamaño,(105).

El mayor pico de radioactividad coincide con los maltoligosacáridos de 9 unidades de glucosa, el otro con los de 5 a 6 unidades y el menor con los de 7 unidades.

Actualmente la estructura de la porción hidrofílica de estos compuestos está siendo estudiada en el laboratorio. Algunos ensayos preliminares con glicosidasas muestran que estos compuestos tienen algunas manosas en posición α .

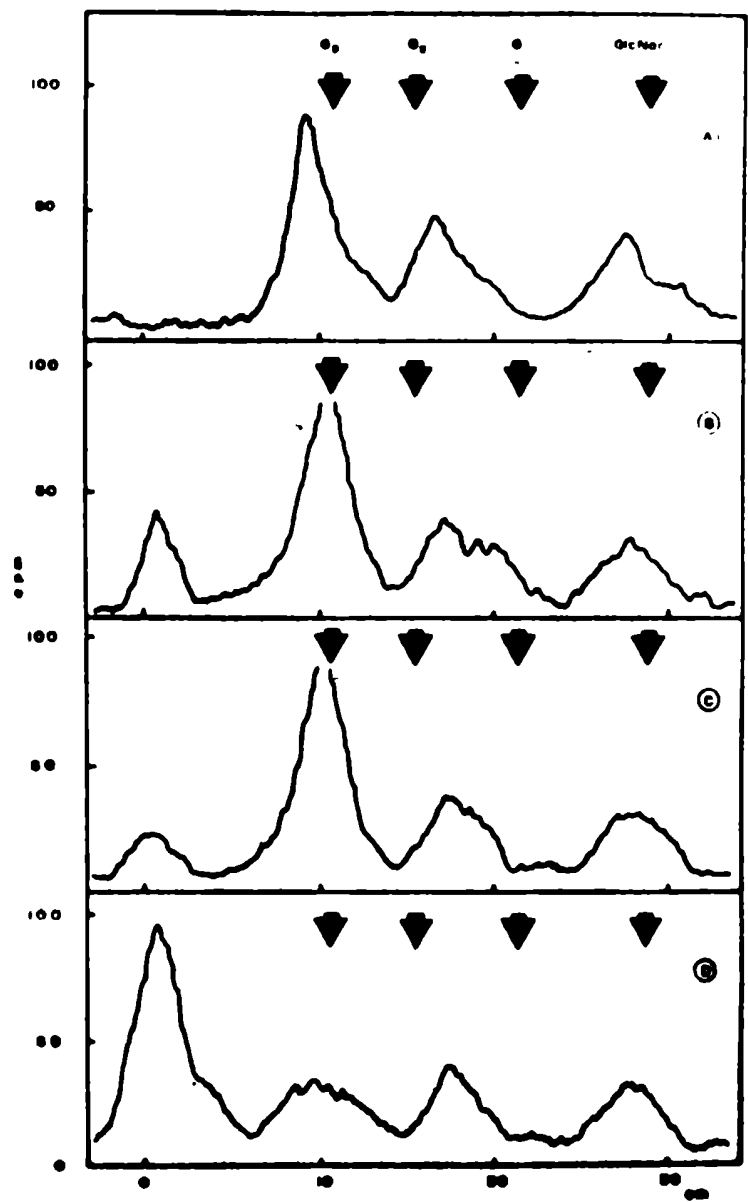


Fig. 30 - Incubación del lípido- X_3 radioactivo con microsomas de oviducto de gallina y: A= sin adiciones; B=GDPMan (0,3 μ moles) y dolicol-P; C= GDPMan(0,3 μ moles); D= dolicol-P-Man no radioactivo. El lípido- X_3 está marcado en la N-acetilglucosamina del extremo reductor.

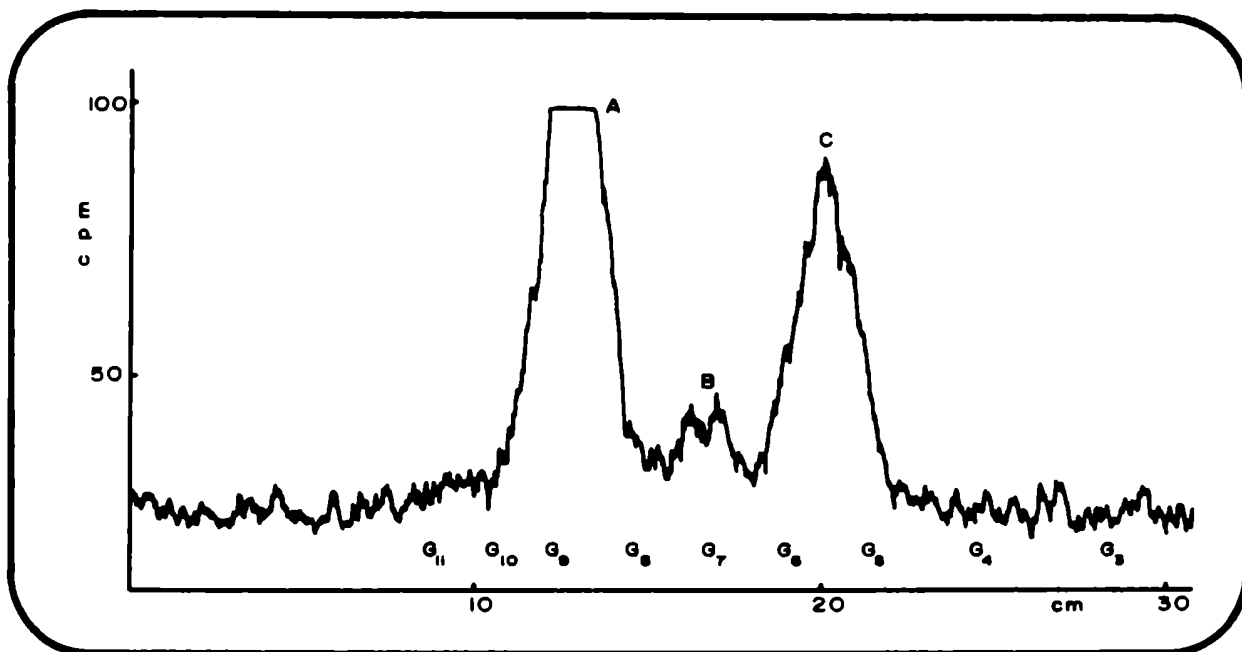


Fig. 31 - Perfil de cromatografía en papel del oligosacárido sintetizado a partir del lípido- χ_3 y dolicol-P-Ma_nosa.

El pico de radioactividad correspondiente a este oligosacárido obtenido por cromatografía en papel en el solvente A fue eluído con agua y recromatografiado en el solvente B, como se muestra en esta figura.

IV DISCUSION

En este trabajo se ha estudiado la síntesis de un lípido-trisacárido y su rol en la biosíntesis de la cadena de azúcares de las glicoproteínas cuyo tipo de unión es asparragina-N-acetilglucosamina. La síntesis de este compuesto tiene especial interés porque estos tres azúcares forman la porción más interna del oligosacárido de un muy importante grupo de glicoproteínas (162).

Como se puntualizó al mencionarse los objetivos de esta Tesis, tenía mucho interés estudiar la biosíntesis de estos tres azúcares unidos al lípido (en particular la transferencia de manosa) y se eligió el oviducto de gallina, por ser un tejido muy activo, fabricando ovoalbúmina en forma preferencial(el 70% de las glicoproteínas solubles). Conviene recordar que esta glicoproteína es del tipo asparragina, cuya estructura, que es relativamente sencilla, ha sido dilucidada recientemente (179).

El interés de estudiar la biosíntesis de estos lípido-oligosacáridos, radica en el hecho de que ya se había encontrado en el Instituto, que son directos precursores de glicoproteínas al transferirle " en bloque" la cadena de azúcares.

Como la transferencia de las N-acetilglucosaminas al lípido habían sido descritas por primera vez en el hígado(100)era fundamental verificar si también ocurrían en el oviducto, por lo que se estudiaron cada una de las etapas de transferencia de estos tres azúcares por separado y con cierto detalle.

Otro problema que hubo que encarar en el transcurso de esta Tesis, fue el de obtener cada uno de estos lípido-azúcares en cantidades preparativas y lo menos contaminados entre ellos.

Con el dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa obtenido fue entonces posible estudiar la transferencia de manosa a este compuesto. Se obtuvo de esta manera un nuevo lípido-azúcar que parece ser el eslabón a ubicar en la serie de etapas que componen el modelo propuesto en el Instituto para la glicosilación de las proteínas. (Esto se discutirá más adelante).

Se estudiaron las condiciones de síntesis de este lípido-trisacárido, los azúcares que lo forman, la secuencia de los mismos, el tipo de unión entre ellos y la universalidad de este mecanismo de síntesis.

Para mayor claridad en la exposición de los distintos resultados obtenidos en esta investigación, éstos serán discutidos en forma separada.

BIOSÍNTESIS DE LÍPIDO-AZÚCARES QUE CONTIENEN N-ACETILGLUCOSAMINA

Los resultados muestran que preparaciones particuladas de oviducto de gallina (como ya había sido descrito en hígado) catalizan la formación de dolicol-P-P-N-acetilglucosamina y dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa.

La síntesis de ambos compuestos requiere además de la preparación de enzima, detergente y Mg^{++} . Este catión, al igual que en la síntesis de otros lípido-azúcares como el dolicol-P-Glc y dolicol-P-Man, no puede ser sustituido por el Mn^{++} (23) (24).

En la síntesis del dolicol-P-P-N-acetilglucosamina es además necesario el agregado de dolicol-P exógeno (ver Tabla VI). El dolicol-P agregado, proviene de hígado. En oviducto no se ha estudiado la presencia de este poliprenol. No obstante hay evidencias indirectas de su presencia (o de un lípido muy similar) en preparaciones enzimáticas obtenidas de este tejido.

Además el dolicol-P-P-N-acetilglucosamina sintetizado con preparaciones de oviducto se comporta como el obtenido de hígado de rata y lo mismo sucede con los otros poliprenol-P-P-azúcares. Por otro lado, los lípido-azúcares sintetizados en hígado son intercambiables para estas reacciones con los obtenidos de oviducto. Esto nos permite suponer que si los restos lipídicos no son iguales por lo menos deben ser muy parecidos.

En vegetales recientemente se ha encontrado un lípido semejante al dolicol, que parece ser de distinto tamaño, pero que puede formar lípido-azúcares con las enzimas de hígado (173).

En cuanto a la segunda etapa, es decir a la formación del dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa se haría por la transferencia de la N-acetilglucosamina del nucleótido-azúcar y no a partir del lípido-azúcar. Esto se estudió en hígado (110) (como se verá más adelante) y hay varias evidencias de que también esto ocurre en la reacción catalizada por las enzimas de oviducto.

Un indicio lo podría dar el requerimiento de Mg^{++} . Se ha visto que en otras transferencias del azúcar de un lípido-azúcar a otro lípido-aceptor, (como por ejemplo el dolicol-monofosfato-glucosa al lípido-oligosacárido en el hígado (104), no se necesita este catión. Además en este trabajo se ha observado que con las preparaciones de oviducto al igual de lo que ocurre en hígado, la síntesis del lípido-disacárido no se estimula por el agregado de dolicol-P, mientras que sí, depende de la presencia del nucleótido-azúcar. Este argumento puede ser discutible por la presencia de dolicol-P endógeno en las preparaciones enzimáticas; sin embargo conviene recordar que con las mismas preparaciones se puede observar estimulación del dolicol-P agregado en la primera reacción, es decir en la formación de dolicol-P-P-N-acetilglucosamina (ver Fig. 9).

En el caso de la síntesis del lípido-disacárido con microsomas de hígado, Leloir y col., han estudiado más exhaustivamente este problema (110). Prepararon el lípido-disacárido a partir de dolicol-P-P-N-acetilglucosamina ^{14}C y de nucleótido azúcar no radioactivo. Después de una hidrólisis ácida suave redujeron el disacárido radioactivo con borohidruro de sodio. Por hidrólisis ácida fuerte obtuvieron solamente glucosaminitol ^{14}C . En cambio, cuando la di-N-acetilquitobiosa está marcada en la hexosamina no reductora, se obtiene únicamente glucosamina radioactiva.

Esta distribución desigual de la radioactividad luego del tratamiento con borohidruro y posterior hidrólisis ácida fuerte les permitió demostrar que la N-acetilglucosamina se transfiere directamente del UDPGlcNac al dolicol-P-P-azúcar. De lo contrario ambas hexosaminas deberían estar igualmente marcadas.

Otro indicio que apoyaría este hecho surge al considerar la configuración de los azúcares. Aunque los casos que actualmente se conocen no son muchos, se puede suponer que la reacción de transferencia de un azúcar a un lípido ocurre con inversión de su configuración anomérica. Por ejemplo, se conoce que en el caso de los nucleótido-azúcares la configuración del azúcar es α . En cambio en el dolicol-P-Glc se ha observado que luego de un tratamiento alcalino se forma el 1,6-anhidroglucosano, lo que indicaría que la configuración sería β . Este hecho señalaría que al glicosilarse el poliprenol, habría una inversión en la configuración del azúcar (23). Lo mismo sucede con el dolicol-P-Man (111).

La N-acetilglucosamina de la porción más interna de la di-N-acetilquitobiosa posiblemente sea α , dado que se transfiere junto con el fosfato del nucleótido. La segunda hexosami

na, (la del extremo no reductor) debería ser β si fuese transferida directamente del nucleótido-azúcar . Esto es lo que ocurre en el caso de este compuesto. Este hecho fue confirmado por la acción de la β -N-acetilglucosaminidasa.(ver Fig. 13).

Una vez dilucidado el problema de la síntesis del lípido di-N-acetilquitobiosa en oviducto, se planteó la necesidad de obtenerlo en cantidades suficientes, marcado radioactivamente . Para ello se estudiaron las condiciones óptimas de la mezcla de incubación (ver Resultados). Se lograron condiciones de síntesis en las cuales la formación del lípido-di-N-acetilquitobiosa ^{14}C era superior al 80% del lípido de N-acetilglucosamina radioactivo presente en la reacción y en algunas preparaciones se alcanzó el 100%. Por otro lado también se estudió la síntesis de este compuesto en distintos tejidos. Se observó que los microsomas de hígado de rata eran los más eficientes. Este resultado está de acuerdo con el hecho de que el hígado sintetiza un gran número de glicoproteínas (132) (133). Muchas de éstas son las del tipo de unión aminoácido-azúcar que corresponde a la asparragina-N-acetilglucosamina. Por este motivo las preparaciones en escala mayor del prenoI-disacárido se llevaron a cabo con microsomas preparados a partir de hígado de rata.

BIOSINTESIS DEL LÍPIDO-DIFOSFATO-TRISACARIDO

Como este problema es el más importante de este trabajo y significó el aporte más original de esta Tesis, gran parte del esfuerzo realizado se centró en el mismo. Los resultados presentados demuestran la presencia de una manosil transferasa en preparaciones enzimáticas de oviducto de gallina que cataliza la transferencia de manosa al dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiossa.

El producto formado es muy similar al lípido-disacárido, dado que no puede ser separado de éste por cromatografía en columnas de ácido silícico, así como tampoco en DEAE-celulosa. En estas últimas columnas el compuesto eluye en la zona correspondiente a la de los prenol-pirofosfatos.

El nuevo lípido-azúcar, al igual que los prenol-azúcares estudiados, libera su resto glicosídico por hidrólisis ácida suave (110) (23). El producto hidrosoluble obtenido por este tratamiento puede diferenciarse en cromatografía en papel de los obtenidos a partir del dolicol-P-P-N-acetilglucosamina o di-N-acetilquitobiosa. Con el solvente A migra además en forma semejante a la maltotriosa utilizada como azúcar de referencia. Por dicho motivo, ese oligosacárido fue denominado X_3 , nomenclatura usada en todo este trabajo.

Behrens y col. (111) como ya se mencionó, estudiaron en hígado de rata, la transferencia de manosa a un lípido aceptor endógeno que tenía lugar a partir de GDP_{Man} o dolicol-P-Man.

Dos posibilidades (o ambas) podían darse en este caso: a) que la transferencia del azúcar fuera directamente a partir del nucleótido azúcar; b) que la transferencia fuera a partir del dolicol-P-Man, el cual a su vez se sintetizaría a partir del dolicol-P y GDP_{Man} . En el caso del oviducto, ambas posibili

dades pueden darse en la síntesis del lípido- X_3 , ya que se comprobó que en estas condiciones hay también síntesis del dolicol-P-Man. Los resultados experimentales obtenidos indican que en la formación del lípido X_3 , el dador de manosa es el nucleótido azúcar. (ver Fig. 20). Las evidencias se pueden resumir:

- a) Al agregar GDPMan a la mezcla de reacción se obtiene la formación del lípido- X_3 (ver Fig. 20-B).
- b) Cuando se sustituye el nucleótido-azúcar por el dolicol-P-manosa no hay transferencia.
- c) Además, el agregado de dolicol-P a la mezcla de reacción en presencia del nucleótido azúcar no produce estimulación en la formación del lípido X_3 .
- d) Esta síntesis es dependiente de Mg^{++} , al igual como ocurre en la formación de otros prenol-azúcares en que el dador es el nucleótido-azúcar.
- e) Todos estos hechos muestran que el compuesto dador para la síntesis del lípido X_3 es el nucleótido de manosa.

ESTUDIO DE LA PORCION HIDROFILICA DEL LIPIDO- χ_3

Distintos estudios fueron realizados para determinar el resto glicosídico del lípido- χ_3 . Los resultados obtenidos pueden ser agrupados en la siguiente forma, (ver Tabla XII):

1.-Las incubaciones realizadas con el lípido de quitobiossa y GDPMan, ambos con ^{14}C , muestran claramente que los azúcares que componen este nuevo compuesto son únicamente manosa y N-acetilglucosamina.

2.-Los resultados obtenidos por cromatografía en papel con distintos solventes y la comparación de los R-lactosa de este compuesto con los oligosacáridos de manosa y N-acetilglucosamina, obtenidos por el grupo de Lundblad (137), nos permiten suponer que este azúcar se encuentra probablemente en el grupo de los trisacáridos (ver Tablas IX, X).

3.-Este sacárido (χ_3) fue sometido a la acción de distintas glicosidasas a fin de confirmar exactamente los azúcares que lo componen y determinar el tipo de unión entre los mismos.

La α -manosidasa obtenida de dos fuentes distintas no tiene acción sobre el trisacárido, mientras que este compuesto es hidrolizado por la β -manosidasa. Esta enzima fue obtenida de saliva humana y está contaminada con β -N-acetilglucosaminidasa y α -manosidasa. (Hay que destacar que el trisacárido estaba marcado en la hexosamina del extremo reductor.) El producto radioactivo obtenido fue N-acetilglucosamina. Cuando se agregó a la enzima de saliva un inhibidor específico de la β -N-acetilglucosaminidasa, se obtuvo la formación de di-N-acetilquitobiossa, además de N-acetilglucosamina. Este hecho es muy importante porque indica que la manosa estaría unida a

la di-N-acetilquitobiosa por una unión tipo β . Cuando el X_3 es incubado en presencia de β -N-acetilglucosaminidasa, de dos fuentes diferentes, los resultados obtenidos son distintos.

Cuando la enzima proviene de saliva humana no tiene acción hidrolítica sobre el X_3 , aunque hidroliza la di-N-acetilquitobiosa. Ello indica que en el X_3 la unión β de las N-acetilglucosaminas está protegida de la acción hidrolítica de esta enzima. Esto apoyaría la idea de que la manosa ocuparía el extremo no reductor y estaría de acuerdo también con el resultado obtenido con las manosidasas.

Em cambio con la enzima purificada de oviducto se observó liberación de N-acetilglucosamina radioactiva (la marca en el X_3 está como ya se mencionó en la hexosamina del extremo reductor). Este resultado es un poco difícil de interpretar, pero se podría suponer que esta enzima tiene acción de endoglicosidasa; es decir, podría hidrolizar al trisacárido por el extremo reductor. Por estos datos no se puede saber si este raro efecto hidrolítico lo hace con igual eficiencia que la hidrólisis del azúcar del extremo no reductor. Como control se incubó con di-N-acetilquitobiosa observándose hidrólisis y liberación de la N-acetilglucosamina del extremo reductor.

Esta interpretación se ve también apoyada por los resultados del grupo de Maley (141) quienes estudiaron este trisacárido obtenido de otra glicoproteína (la ribonucleasa). Cuando el trisacárido está unido a la asparragina, la β -N-acetilglucosaminidasa no lo hidroliza, pero sí libera N-acetilglucosamina cuando previamente se ha sacado la asparragina con la glicosil-asparraginasa, dejando por lo tanto libre el extremo reductor.

Cuando se incuba el trisacárido (X_3) marcado únicamente

TABLA XII

Resumen de los resultados obtenidos con la fracción hidrofílica del lípido-X₃ , obtenido por incubación del dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa y GDPMan con preparaciones enzimáticas de oviducto de gallina.

1. EXPERIMENTO DOBLE MARCA: tiene Manosa y N-acetilglucosamina
2. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL : es un trisacárido.
3. ACCIÓN DE GLICOSIDASAS :

Enzima	Reacción de Hidrólisis del X ₃ (**)	Producto formado
a) α - manosidasa	negativa	---
b) α - manosidasa + β - GlcNac-asa (*)	negativa	---
c) β - GlcNac-asa(*) (dador M)	negativa	---
d) β - GlcNac-asa(*) (oviducto)	positiva	GlcNac
e) β - GlcNac-asa(*) (oviducto)	positiva	" X ₂ "
f) β - manosidasa + β - GlcNac-asa(*) (dador P)	positiva	GlcNac
g) β - manosidasa + β - GlcNac-asa(*) (dador P) + Inhibidor de GlcNac-asa(*)	positiva	Q + GlcNac

4. INTERACCION CON LECTINAS:

- a) Concanavalina A : no interacciona
- b) Aglutinina de arveja: si interacciona

5. FORMULA PROPUESTA:

β - manosil - β -N-acetilglucosaminil-(1 - 4)-N-acetilglucosamina.

(*) GlcNac-asa β -N-acetilglucosaminidasa; Q= di-N-acetil - quitobiosa

(**) La marca radioactiva en el X₃ en todos los casos está en la hexosamina del extremo reductor con excepción del experimento (e) donde el X₃ está marcado en la Man.

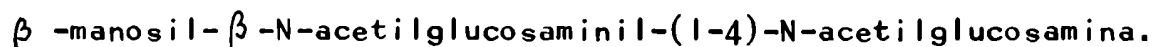
en la molécula de manosa, con la β -N-acetilglucosaminidasa purificada de oviducto, se libera un compuesto radioactivo que por cromatografía en papel con el solvente A migra como la maltosa. Este pico radioactivo ha sido denominado " χ_2 ". Debido a la poca cantidad que había de este compuesto no se pudo estudiar su estructura con detalle, pero se vió que puede ser diferenciado de la di-N-acetilquitobiosa por su comportamiento en cromatografía en papel con distintos solventes. Como se describió en Resultados, con ciertas limitaciones, se puede pensar que es un disacárido de manosa y N-acetilglucosamina.

Recientemente Chen y col. (158) confirmaron estos resultados trabajando con el oligosacárido de un lípido-azúcar, sintetizado con preparaciones de oviducto de gallina, que contiene manosa y N-acetilglucosamina. Primero lo reducen con borohidruro de sodio y liberan N-acetil-glucosaminitol por acción de una endo β -N-acetilglucosaminidasa. Al resto del oligosacárido lo tratan con α y β -manosidasa y obtienen N-acetilglucosamina y manosa. Si lo incuban únicamente con β -manosidasa obtienen el disacárido formado por manosa y N-acetilglucosamina que tiene una unión β -(1-4) y se libera también manosa.

4.- Los resultados obtenidos con la Concanavalina A y la aglutinina de arveja permiten sugerir también que la unión de la manosa a la di-N-acetilquitobiosa es de configuración β . El trisacárido interacciona con la aglutinina de arveja que reconoce a la manosa y no lo hace con la Concanavalina A que tiene especificidad por α -D-glucopiranoósidos o α -D-manopiranoósidos (155), (156).

Teniendo en cuenta todos estos resultados se puede proponer que la porción hidrofílica del lípido-azúcar sintetizado

con enzimas de oviducto de gallina a partir de dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa y GDPMan tendría la siguiente fórmula:



MODELO DE LA SINTESIS DE LA PORCION AZUCAR EN GLICOPROTEINAS DEL TIPO ASPARRAGINA

El modelo propuesto en el Instituto(23),(110),(111), para la síntesis de la porción azúcar de las glicoproteínas que tienen la unión asparragina, involucraría distintas reacciones de transferencias que se pueden reunir en tres grupos:

- 1.-Formación de lípido-azúcares intermediarios
- 2.-Adición de otros azúcares, sintetizándose el oligosacárido completo o casi completo pero siempre unido al lípido.
- 3.-Transferencia del oligosacárido del poliprenol a la proteína aceptora.

Como se mencionó en la Introducción el primer lípido-azúcar intermediario fue sintetizado, en el Instituto, por los Dres. Behrens y Leloir (23). Estudiaron la transferencia de glucosa, catalizada por microsomas de hígado de rata, desde el UDPGlc a un aceptor lipídico. La molécula lipídica fue identificada por datos indirectos como dolicol-P, lo cual fue posteriormente confirmado en otro laboratorio(24). Otros dolicol-azúcares fueron también sintetizados por mecanismos semejantes, entre ellos el dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa. Conviene hacer mención el hecho de que este disacárido al cual está unida una molécula de manosa en el extremo no reductor, parece tener, mucha importancia porque se encuentra en la región más interna de todas las glicoproteínas (cuya estructura ha sido estudiada)

del tipo asparragina con una excepción de una inmunoglobulina como se aclaró en la Introducción.

En este trabajo se muestra el mecanismo de formación de este trisacárido; el cual es sintetizado por adiciones sucesivas de azúcares (provenientes de los nucleótido azúcares) sobre el dolicol-P.

Esta síntesis se realiza en tres etapas:

- a) Formación del dolicol-P-P-N-acetilglucosamina a partir de dolicol-P- y UDPGlcNac.
- b) Transferencia de otra molécula de hexosamina, a partir del UDPGlcNac, para la formación del dolicol-P-P-di-N-acetilquitobiosa.
- c) Transferencia de manosa a partir de GDPMan para formar el dolicol-P-P-trisacárido.

La síntesis de este trisacárido fue estudiada, como se describió, con preparaciones particuladas de oviducto de gallina. Este puede ser también sintetizado con microsomas preparados a partir de otros tejidos (ver Tabla XI). Este hecho es de gran importancia porque permite pensar que éste sería el mecanismo general para la síntesis de la región más interna de los oligosacáridos de este tipo de glicoproteínas, y sería un eslabón más a ubicar en el modelo propuesto (Fig. 7).

De acuerdo a este esquema luego de sintetizado este lípido-trisacárido se podría adicionar otros azúcares. Estos podrían venir directamente del nucleótido-azúcar en una sola etapa de transferencia (como ocurre en la formación de X₃) o por un camino un poco más largo, en dos etapas de transferencia con formación intermedia de un lípido-fosfato-azúcar. Este compuesto cedería su azúcar al oligosacárido que se va formando y que permanece unido al dolicol por un puente pirofosfato.

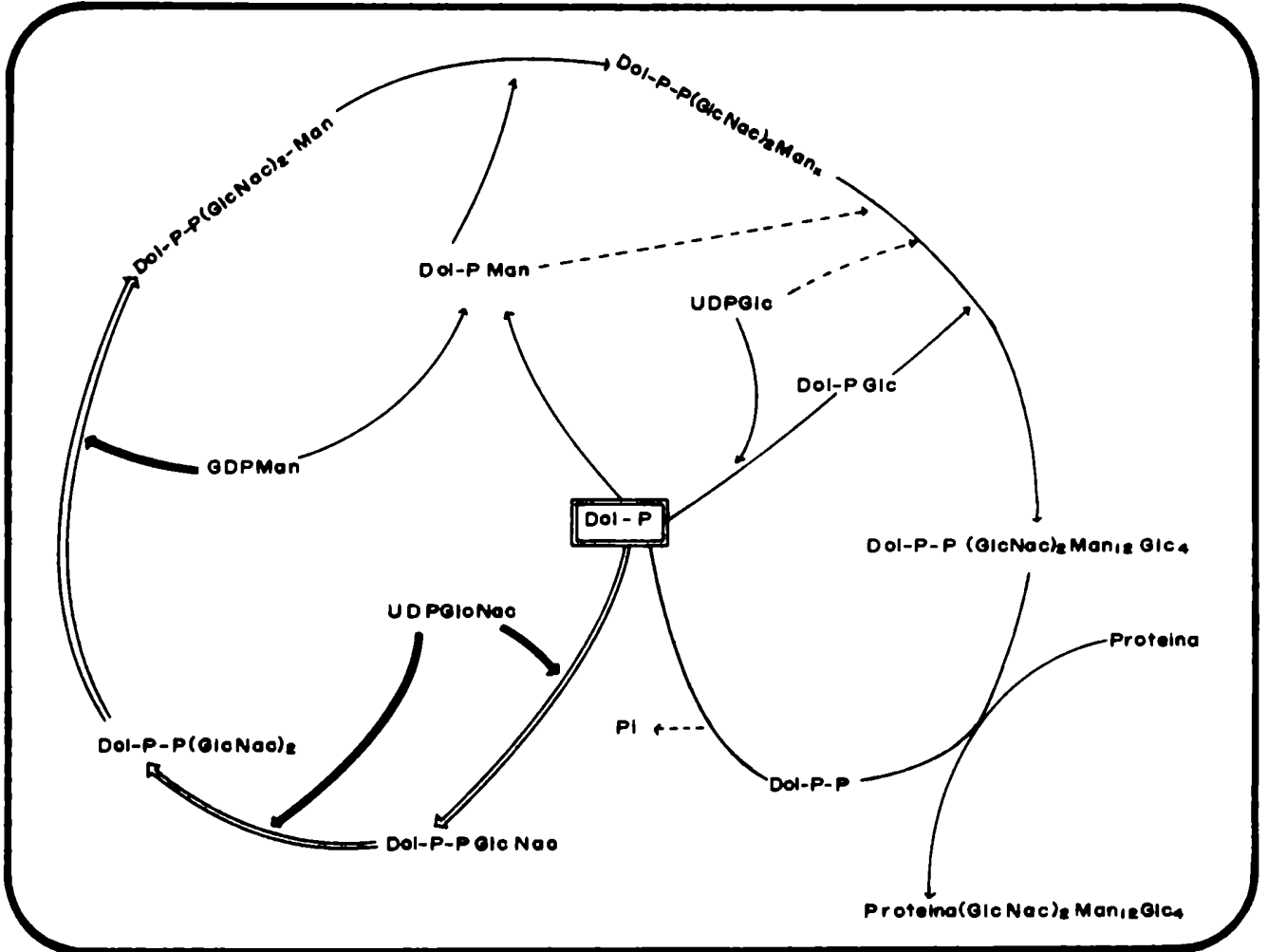


Fig.32 - Esquema de la biosíntesis de GEA y de una glicoproteína, propuesto por Behrens (112), en el cual se incluye la formación del lípido-trisacárido.

Si se supone también que en cada transferencia de azúcar hay una inversión en su configuración anomérica (y en los casos conocidos parece confirmarse ésto), entonces se podría predecir el tipo de unión del azúcar en el oligosacárido según provenga directamente del nucleótido-azúcar (sería β) o de otro lípido-azúcar (sería α).

Anteriormente en este Instituto se describió la adición de glucosas terminales en el oligosacárido de GEA, a partir del dolicol-P-Glc, y también la transferencia de manosa a una familia de lípido-oligosacáridos endógenos de hígado que ocurre en algunos casos a partir del dolicol-P-Man (III).

Los resultados presentados en este trabajo muestran la formación de un lípido oligosacárido en el que las manosas pro vendrían del dolicol-P-Man y por consiguiente su configuración anomérica sería α (ver Fig.30). Esto estaría de acuerdo con la hidrólisis parcial de este compuesto por la α -manosi dasa. También estaría de acuerdo con la estructura de la cadena de azúcares de la ovaalbúmina (ver Tabla II).

Recientemente Caminatti y col.(164) y Chen y col.(158), en forma independiente y con un enfoque parecido, obtuvieron la transferencia de este oligosacárido a una proteína. Resultados similares fueron descritos por Heath y col.(144) con preparaciones de mieloma de ratón.

La última etapa del modelo sería entonces la transferencia del oligosacárido, completo o casi completo, a la proteína aceptora. Esta etapa, como se ha indicado en la Introducción , también fue demostrada por Behrens y col. con el oligosacárido de GEA (112) y posteriormente con los oligosacáridos de MEA (111).

En la Fig.32 se muestra, de acuerdo al modelo propuesto, el

esquema de biosíntesis del lípido-oligosacárido (GEA) y su transferencia a una proteína microsomal aceptora. En él se incluye también la formación del lípido-trisacárido, el cual podría corresponder a una de las primeras etapas de la síntesis del oligosacárido transferido a la proteína. Conviene aclarar que no hay pruebas directas que en el hígado el lípido trisacárido, descrito en este trabajo, sea un precursor del GEA, aunque es bastante probable que lo sea. En la Fig. 32 se lo ha colocado en forma tentativa en base al hecho de que es precursor del oligosacárido de la glicoproteína estudiada en oviducto y que microsomas de hígado lo sintetizan activamente.

Aunque no se indique en forma explícita en este esquema, no se excluye la posibilidad de que otros azúcares más externos del oligosacárido, como el ácido siálico, galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa, etc., puedan ser agregados directamente a partir de los nucleótido-azúcares a la cadena glicosídica unida a la proteína.

Al considerar el modelo propuesto surge el interrogante de explicar el motivo por el cual en la célula son necesarios dos mecanismos de síntesis de la cadena de azúcares de las glicoproteínas: 1) transferencia directa a partir del nucleótido-azúcar; 2) transferencia en dos o más etapas con formación intermedia de lípidos azúcares.

Por ejemplo, en el caso de las glicoproteínas que poseen distintas cadenas de azúcares, como la tiroglobulina que tiene oligosacáridos de diferente tipo, el mecanismo de biosíntesis debería ser distinto para cada uno de ellos, lo cual hace más complejo al problema.

En este momento la información que se posee sobre la función de los lípido-intermediarios es limitada. Sin embargo es-

tudiando la distribución subcelular de las enzimas involucradas en la formación de los lípido-azúcares se observa que se encuentran fundamentalmente en la fracción microsomal, (70)(143) Es decir, son enzimas particuladas, lo que permite pensar que están asociadas a membranas.

Lennarz (142), propone como hipótesis de trabajo que los lípidos intermediarios serían los encargados de llevar los azúcares a las proteínas nacientes las cuales estarían asociadas al retículo endoplásmico rugoso. Dado el carácter no polar de los poliprenoles, éstos se introducirían, y al transportar el oligosacárido se facilitaría la glicosilación de la proteína. De cualquier forma, en esta hipótesis quedan muchos puntos oscuros sin aclarar.

La dilucidación de la biosíntesis y función de este tipo de glicoproteínas es uno de los campos de la Biología Molecular más interesante y es posible pensar que a medida que se progresa en el conocimiento de este tema se van a poder contestar muchas de las interrogantes que sobre el problema de las relaciones entre las células (comportamiento social de las mismas) se han planteado en los últimos años.

Luciano

que a

BIBLIOGRAFIA

- 1) Sharon, N., Rehovot, Winter, 1972-73.
- 2) Gross, J., *Comp.Biochem.*, 5, 307 (1963)
- 3) Heide, K. and Schwick, H.G., *Angew.Chem.internat.Edit.*,
12, 721 (1973)
- 4) Morrell, A.G., Gregoriadis, G. and Scheinberg, I.H., *J.Biol. Chem.*, 246, 1461 (1971)
- 5) Jamieson, G.A., *J.Biol.Chem.*, 240, 2019 (1965)
- 6) Hadding, U. and Muller-Eberhard, H.J., *Immunology*, 16, 719 (1969)
- 7) Watson, J. and Prichard, J., *J. Immunol.*, 108, 1215 (1972).
- 8) Spiro, R.G., *Adv.Prot.Chem.*, 27, 350 (1973)
- 9) Clauser, H., Herman, G., Rossignol, B. and Harbon, S., in *Glyco proteins* (A.Gottschalk, ed.) p.1151 (1972), Elsevier, Amsterdam.
- 10) Roseman, S., *Chem. Phys.Lipids*, 5, 270 (1970)
- 11) Roseman, S., in *Biochemistry of glycoproteins and related substances*, Proceedings of the 4th International Conference of Cystic Fibrosis of the Pancreas (Mucoviscidosis), (Rossi, E., and Stoll, E., ed.) (1968) Karger, S., New York.
- 12) Marshall, R.D., *Ann.Rev. Biochem.*, 41, 673 (1972).
- 13) Marshall, R.D. and Neuberger, A., in *Glycoproteins*, (A.Gottschalk, ed.) chap. 4-2-(1972) Elsevier, Amsterdam.
- 14) Marshall, R.D. and Neuberger, A., *Adan.Carbohyd.Chem.Biochem.* 25, 2278 (1971).
- 15) Shainkin, R. and Perlman, E.E., *J. Biol.Chem.*, 246, 2278 (1971)
- 16) Jackson, R.L. and Hirs, C.H., *J.Biol. Chem.*, 245, 624 (1970)
- 17) Schater, H., Jabrai, I., Hudgin, R.L., Pinteric, L., McGuire, E. and Roseman, S., *J.Biol.Chem.*, 245, 139 (1969)
- 18) Morre, D.J., Mollenhauer, H.H. and Bracker, C.E., in *Origen and Continuity of Cell Organelles*, (Reinert, J. and Ursprung, H., ed.) 82, (1971) Heidelberg:Springer Verlag.

- 19) Davwalder, M., Whaley, W.G. and Kephart, J.E., in *Origin and Continuity of Cell Organelles*, (Reinert, J. and Ursprung H., ed.), 82, (1971) Heidelberg Springer Verlag.
- 20) Redman, C.M. and Cherian, M.G., *J.Cell.Biol.*, 52, 231 (1972).
- 21) Wagner, R.R. and Cynkin, M.A., *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 35, 139 (1969).
- 22) Caccan, J.F., Jackson, J.J. and Eylar, E.H., *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 35, 505 (1969).
- 23) Behrens, N.H. and Leloir, L.F., *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 66, 153 (1970).
- 24) Richards, J.B. and Hemming, F.W., *Biochem. J.*, 130, 77 (1972).
- 25) Molnar, J., Chao, H. and Ikehara, Y., *Biochem.Biophys.Ac-ta*, 239, 401 (1971).
- 26) Neutra, M. and Leblond, C.P., *J.Cell.Biol.*, 30, 137 (1966).
- 27) Jett, M. and Jamieson, G.A., *Carbohyd.Res.*, 18, 466 (1971).
- 28) Spiro, R.G., *J.Biol. Chem.*, 244, 602 (1969).
- 29) Spiro, R.G., *Ann. Rev. Biochem.*, 39, 599 (1970).
- 30) Spiro, R.G., *J.Biol. Chem.*, 242, 4813 (1967).
- 31) Fukshi, S. and Spiro, R.G., *J.Biol.Chem.*, 244, 2041 (1969).
- 32) Spiro, R.G. and Fukushi, S., *J.Biol.Chem.*, 244, 2049 (1969).
- 33) Spiro, R.G. and Spiro, M.J., *Fed.Proc.*, 27, 345 (1968).
- 34) Spiro, M.J. and Spiro, R.G., *Abstr. Am.Chem. Soc.*, 158th Meet, New York, 46, (1969).
- 35) McGuire, E. and Roseman, S., *J.Biol. Chem.*, 242, 3745 (1967).
- 36) Carlson, D.M., *J.Biol. Chem.*, 241, 5804 (1966).
- 37) Hearn, V.M., Smith, Z.G. and Watkins, W.M., *Biochem.J.*, 109, 315 (1968).
- 38) Race, C., Ziderman, D. and Watkins, W.M., *Biochem. J.*, 107, 733 (1968).

- 39) Chester, M.A. and Watkins, W.M., *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 34, 835 (1969)
- 40) Stoolmiller, A.C. and Dorfman, A., in *Comprehensive biochemistry*(Florkin, M. and Stotz, E.H., ed.), 17, 241 (1969), *American Elsevier New York*.
- 41) Stoolmiller, A.C., Horwitz, A.L. and Dorfman, A., *J.Biol.Chem.*, 247, 3525 (1972)
- 42) Grebner, E.E., Hall, C.W. and Neufeld, E.F., *Arch.Biochem.Biophys.*, 116, 391 (1966).
- 43) Robinson, H.C., Telser, A. and Dorfman, A., *Proc.Nat.Acad. Sci. USA*, 56 , 1859 (1966).
- 44) Hallgren, P., Lundblad, A. and Svensson, S., *J.Biol.Chem.*, 250, 5312 (1975).
- 45) Marshall, R.D. and Neuberger, A., *Biochemistry*, 3, 1596 (1964).
- 46) Marks, G.S., Marshall, R.D. and Neuberger, A., *Biochem.J.*, 87 , 174 (1963).
- 47) Forsee, W.T. and Elbein, A.D., *J.Biol.Chem.*, 248, 2858 (1973) .
- 48) Bray, B.A., Laki, K., *Biochemistry*, 7 , 3119 (1968).
- 49) Spiro, R.G., *J.Biochem.*, 237, 382 (1962).
- 50) Lee, Y.C. and Scocca, J.R., *J.Biol.Chem.*, 247, 5753 (1972).
- 51) Lee, Y.C., *Fed. Proc.*, 30 , 1223, (1971).
- 52) Baenziger, J., and Kornfeld, S., *J.Biol.Chem.*, 249, 7270 (1974)
- 53) Bahl, O.P., *J.Biol.Chem.*, 244, 575 (1969).
- 54) Spiro, R.G., *J.Biol.Chem.*, 240 , 1603 (1965).
- 55) Rosevear, J.W. and Smith, E.L., *J.Biol.Chem.*, 236,425 (1961).
- 56) Dawson, G. and Clamp, J.R., *Biochem. J.*, 107, 341 (1968).
- 57) Clamp, J.R. and Putnam, F.W., *J.Biol.Chem.*, 244, 3233, (1964).
- 58) Becker, R.R., Halbrook, J.L. and Hirs, C.H.W., *J.Biol. Chem.* , 248,7826 (1973).

- 59) Huang, C., Mayer Jr., H.E. and Montgomery, R., Carbohydr. Res., 13, 127 (1970).
- 60) Arima, T. and Spiro, R.G., J.Biol.Chem., 247, 1836 (1972).
- 61) Bray, G.A., Anal. Biochem., 1, 279 (1960).
- 62) O'Brien, P.J. and Neufeld, E.F., in Glycoproteins, (A. Gottschalk, ed.) p. 1170 (1972), Elsevier, Amsterdam.
- 63) Nikaido, H. and Hassid, W.Z., Advan. Carbohydr. Chem. Biochem. 26, 461 (1971).
- 64) Osborn, M.J., Ann. Rev. Biochem., 38, 501 (1969).
- 65) Kent, J.L. and Osborn, M.J., Biochemistry, 7, 4419 (1968).
- 66) Wright, A., Dankert, M. and Robbins, P.W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 235 (1965).
- 67) Hemming, F.W., Biochem. Soc. Sympos., (Goodwin, T.W., ed.) 29, 105 (1970), London; Academic Press.
- 68) Burgos, J., Hemming, F.W., Pennock, J.F. and Morton, R.A., Biochem. J., 88, 470 (1963).
- 69) Hemming, F.W., in Biochemistry, Series 1, Biochemistry of lipids, (Goodwin, T.W., ed.) 4, 39 (1973), University Park Press, Baltimore, Maryland.
- 70) Dallner, G., Behrens, N.H., Parodi, A.J. and Leloir, L.F., Febs, Lett., 24, 315 (1972).
- 71) Colvin, J.R., Nature, 183, 1135 (1959).
- 72) Anderson, J.S., Matsushashi, M., Haskin, M.A. and Strominger, J.L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 881 (1965).
- 73) Wright, A., Dankert, M., Fennesey, P. and Robbins, P.W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1798 (1967).
- 74) Weiner, I.M., Higuchi, T., Rothfield, L., Andrews, S., Osborn M.J., and Horecker, B.L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 228 (1965).

- 75) Findlary, J., Levvy, G.A. and March, C.A., *Biochem. J.*, 69 467, (1958).
- 76) Higashi, Y., Strominger, J.L. and Sweeley, C.C., *Proc.Nat. Acad. Sci. USA*, 57 , 1878 (1967).
- 77) García, R.G., Recondo, E. and Dankert, M., *Eur. J.Biochem.*, 43, 93 (1974).
- 78) Kauss, H., *Febs Lett.* 5, 81 (1969).
- 79) Villemez, C.L. and Clark K, A.F., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 36, 57 (1969).
- 80) Edstrom, R.D. and Heath, E.C., *J.Biol.Chem.*, 242, 4125(1967).
- 81) Kent, J.L. and Osborn, M.J., *Biochemistry*, 7, 4396 (1968).
- 82) Sutherland, I.W., *Biochemistry*, 9, 2180 (1970).
- 83) Troy, F.A., Fremman, F.E. and Heath, E.C., *J.Biol.Chem.*, 246 118, (1971).
- 84) Kocourek, J. and Ballou, C.E., *J.Bacteriol.*, 100, 1175 (1969).
- 85) Tanner, W., *Biochem. Biophys.Res. Commun.* 35, 144 (1965).
- 86) Baddiley, J., *Accounts. Chem.Res.*, 3 , 98 (1970).
- 87) Brooks, D. and Baddiley, J., *Biochem. J.*, 115, 307 (1969).
- 88) Robbins, P.W. and Uchida, J., *Biochem.*, 1 , 323 (1962).
- 89) Robbins, P.W. and Uchida, J., *J.Biol.Chem.*, 240, 375 (1965).
- 90) Luderitz, O., *Angew. Chem.*, 9 , 649 (1971).
- 91) Luderitz, O., Jann, R. and Wheat, R., in *Comprehensive Biochemistry*, (Florkin, M., and Stotz, E.M., ed.), 26A, 105(1968) American Elsevier Publishing Co., New York.
- 92) Nikaido, B., *Adv. Enzymol.*, 31, 77 (1968).
- 93) Robbins, P.W., Wright, A., and Bellows, J., *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, 52 , 1302 (1964).
- 94) Zatz, M. and Barondes, S.H., *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 36 511 (1969).
- 95) Tetas, M., Chao, H. and Molnar, J., *Arch.Biochem.Biophys.*, 138, 135 (1970).

- 96) Ikehara, Y., Molnar, J. and Chao H., *Biochem.Biophys.Acta*, 247, 486 (1971).
- 97) Bray, D. and Robbins, P.W., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 28, 334 (1967).
- 98) Cramer, F., and Böhm, H.J., *Angew.Chem.* 71, 755 (1959).
- 99) Popjack, G., Cornforth, J.W., Ryhage, R. and Goodman, D.S., *J.Biol. Chem.*, 237, 56 (1962).
- 100) Behrens, N.H., Parodi, A.J., Leloir, L.F. and Krisman, C.R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 375 (1971).
- 101) Scher, M. and Lennarz, W.J., *J.Biol.Chem.*, 244, 2777 (1969).
- 102) Evans, P.J. and Hemming, F.W., *Febs.Lett.*, 31, 335 (1973).
- 103) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H., *J.Biol.Chem.*, 226, 497 (1957).
- 104) Behrens, N.H., Parodi, A.J. and Leloir, L.F., *Proc.Nat.Acad. Sci. USA*, 68 , 2857 (1971).
- 105) Leloir, L.F., Parodi, A.J. y Behrens, N.H., *Revta.Soc.Argent. Biol.*, 47, 108 (1971).
- 106) Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. and Dankert, M., *Biochem. Biophys. Acta*, 270, 529 (1972).
- 107) Parodi, A.J., Behrens, N.H, Leloir, L.F. and Carminatti, H., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 3268 (1972).
- 108) Parodi, A.J., Staneloni, R., Cantarella, A., Leloir, L.F. Behrens, N.H., Carminatti, H. and Levy, J.A. *Carbohyd, Res.*, 26, 393, (1973).
- 109) Sutherland, I.W., *Advan.Microbiol. Physiol.*, 8, 143 (1972).
- 110) Leloir, L.F., Staneloni, R., Carminatti, H. and Behrens, N: H., *Biochem. Biophys, Res. Commun.*, 52, 1285 (1973).
- 111) Behrens, N.H., Carminatti, H., Staneloni, R., Leloir, L.F. and Cantarella, A., *Proc.Mät.Acad.Sci.USA*, 70, 3390 (1973).

- 112) Behrens, N.H., in *Biology and Chemistry of the Eucaryotic Cell Surface*, (Lee, E.Y.C. and Smith, E.E., ed.), 7, 159 (1974), Academic Press, New York.
- 113) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randalt, R. J., *J.Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 114) Peterson, E.A. and Sober, H.A., in *Methods in Enzimology* , (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., ed.), V, 6 (1962), Academic Press, New York.
- 115) Jeanes, A., Wise, C.S. and Dimler, R.J., *Anal. Chem.*, 23 , 415 (1951).
- 116) Sanderson, A.R., Creswell, P., and Welsh, K.I., *Nature New Biol.*, 230, 8 (1971).
- 117) Shimada , A. and Nathenson, S.G., *Biochemistry*, 8,4048(1969).
- 118) Sutherland, E.W. and Wosilait, W.O., *J.Biol. Chem.*, 218 , 459 (1956).
- 119) Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrison, J.S., *Nature*, 166, 444 (1950).
- 120) Moule, Y., Chauveau, J. and Rouiller, C., *J.Biophys.Biochem. Cytol.*, 7, 547 (1960).
- 121) Rouser, G., Kritcheusky, G. and Yamamoto, A., in *Lipids Chromatographic Analysis*, (Marinetti, G.V., ed.), 1, 99 (1967) M. Dekker Inc., N. York.
- 122) Thoma, J.A. Wright, H.B. and Freich, D., *Arch.Biochem. Biophys.*, 85, 452 (1959).
- 123) Li, Y.T. and Lee, Y.C., *J.Biol. Chem.* 247, 3677 (1972).
- 124) Li, Y.T., *J.Biol. Chem.*, 242, 5474 (1967).
- 125) Sukeno, T., Tarentino, A.L., Plummer Jr., T.H. and Maley,F., *Biochemistry*, 11, 1493 (1972).
- 126) Levvy , G.A. and Conchie, J., in *Methods in Enzymology*,(Colowick, S.P. and Kaplan,N.O., ed.),VIII, 571,(1966)Acad.Pres. New York.

- 127) Tetas, M., Chao, H. and Molnar, J., Federation Proc., 28 , 902 (1969).
- 128) Scher, M., Lennarz, W.J. and Sweeley, C.C., Proc.Nat.Acad. Sci. USA, 59, 1313 (1968).
- 129) Lennarz, W.J., and Talamo, B., J.Biol.Chem., 241, 2707(1966).
- 130) Tanner, W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 144 (1969).
- 131) Tanner, W., Jung, P. and Linden, J.C., in The Biochemistry of the Glycosidic Linkage, (Piras, R. and Pontis, H.G., ed) 227, (1972) , Academic Press , New York.
- 132) Gottschalk, A., Glycoproteins, Their Composition Structure and Function, (2nd. Edit., B.B.A. Library), 5(1972), Elsevier, Amsterdam.
- 133) Schultze, H.E. and Heremans, J.F., Molecular Biology of Human Proteins. I (1966), Elsevier, Amsterdam.
- 134) Waechter, C.J., Lucas, J.J. and Lennarz, W.J., J.Biol.Chem., 248 , 7570 (1973).
- 135) Norden, N.E., Lundbland, A., Svensson, S., Ockerman, P., and Autio, S., J.Biol. Chem., 248 , 6210 (1973).
- 136) Norden, N.E. Lundbland, A., Ockerman, P.E., and Jolly, R.D., Febs Lett., 35 , 209 (1973).
- 137) Norden, N.E., Lundbland, A., Svensson, S., and Autio, S., Biochem., 13, 871 (1974).
- 138) Clark, A.F. and Villemez, C.L. Febs Lett., 32, 84 (1973).
- 139) Alam, S.S., Barr, R.M., Richards, F.B. and Hemming, F.W., Biochem. J., 121, 19p (1970).
- 140) Richards, J.B. and Hemming, F.W. Biochem., J., 128, 1345(1972)
- 141) Tarentino, A.L., Plummer Jr, T.H., and Maley, F., J.Biol.Chem. 245, 4149 (1970).
- 142) Lennarz, W.J., Science, 188, 986 (1975).

- 143) Hsu, A.F., Baynes, J.W. and Heath, E.C., Proc. Nat.Acad. Sci. USA, 71, 2391 (1974).
- 144) Heath, E.C., Baynes, J.W. and Hsu, A.F., in Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces, (Lee, E.Y.C. and Smith, E.E., ed.) 7, 181 (1974), Academic Press, New York.
- 145) Ghalambor, M.A., Warren, C.D. and Jeanloz, R.W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 407 (1974).
- 146) Wedgood, J.F., Warren, C.D., Jeanloz, R.W. and Strominger, J.L., Proc. Nat.Acad.Sci.USA, 71, 5022 (1974).
- 147) Lindgreen, B.D., Acta.Scand., 19, 1317 (1965).
- 148) Dumphy, P.J., Kerr, J.D., Pennock, J.F., Whittle, K.J. and Feeney, J., Biochem.Biophys.Acta, 136, 136 (1967).
- 149) Wellburn, A.R., Stevenson, J., Hemming, F.W. and Morton, R. A., Biochem.J., 102, 313 (1967).
- 150) Stone, K.J., Butterworth, P.H. and Hemming F.W., Biochem . J., 102, 443 (1967).
- 151) Levy, J.A. Carminatti, H, Behrens, N., Leloir, L.F. and Tabora, E., Xº Reunión de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas, pag.3, (1974).
- 152) Levy, J.A., Cantarella, A., Carminatti, H., Behrens, N., Leloir L.F. and Staneloni, R., IXº Reunión de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas, pag. 14, (1973).
- 153) Levy, J.A., Carminatti, H., Cantarella, A., I., Behrens, N.H., Leloir, L.F. and Tabora, E., Biochem.Biophys.Res.Comm., 60, 118 (1974).
- 154) Rowland, R.L., Latimer, P.H. and Giles, J.A., J. Ann. Chem . Soc., 78, 4680 (1965).
- 155) Goldstein, I.J., Methods Carbohyd.Chem., 6, 106 (1972).
- 156) Allan, D., Auger, J. and Crumpton, M.J., Nature New Biol., 236, 23 (1972).

- 157) Pless, D.D., and Lennarz, W.J., J.Biol.Chem., 250, 7014 (1975)
- 158) Chen, W.W., Lennarz, W.J., Tarentino, A.L. and Maley, F., J. Biol. Chem., 250, 7006 (1975).
- 159) Sukeno, T., Tarentino, A.L., Plumber, T.H. and Maley, F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 219 (1971).
- 160) Bohák, Z., J.Biol. Chem., 244, 4638 (1969).
- 161) Plummer, T.H. Jr., and Hirs, C.H., J.Biol.Chem., 239, 2530 (1964).
- 162) Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Jr. and Maley, F., J.Biol. Chem., 248, 5547 (1973).
- 163) Haupti, H. and Heide, K., Clin.Chem. Acta, 12, 419 (1969).
- 164) Carminatti, H. and Idoyaga, V., Comunicación Personal
- 165) Spiro, R.G., J.Biol. Chem., 235, 2860 (1960).
- 166) Lio, H., Sharon, N. and Katchalski, E., J.Biol.Chem., 241 684 (1966).
- 167) Tabora, E. y Behrens, N.H., Comunicación Personal.
- 168) Kisiel, W. and Hanahan, D.J., Biochem. Biophys. Acta, 304 , 103, (1973).
- 169) Alpert, E., Schür, P., Drysdale, J. and Isselbacher, K., Fed. Proc., 30, 301 (1971).
- 170) Bahl, O.P., J.Biol.Chem., 244, 575 (1969).
- 171) Cahill, C.L., Shetlar, M.R., Payne, R.W., Endecott, B. and Li, Y.T., Biochem. Biophys. Acta, 154, 40 (1968).
- 172) Tai, T., Ia Mashita, K., Ogata, Arakawa, M., Koide, N., Muramatiu, Iwashita, S., Inowe, J., and Kobata, A., J. Biol. Chem., 250, 8569 (1975).
- 173) Pont Lezica, R., Brett, C.T., Romero Martinez, P and Dankert, M.A., Biochem. Biophys Res Commun. 66, 980 (1975).