

Tesis de Posgrado

Prenol-fosfo-azúcares en la biosíntesis de polisacáridos y/o glicoproteínas

Couso, Roberto O.

1980

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:

Couso, Roberto O.. (1980). Prenol-fosfo-azúcares en la biosíntesis de polisacáridos y/o glicoproteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1643_Couso.pdf

Cita tipo Chicago:

Couso, Roberto O.. "Prenol-fosfo-azúcares en la biosíntesis de polisacáridos y/o glicoproteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1643_Couso.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

“PRENOL - FOSFO - AZUCARES EN LA BIOSINTESIS
DE POLISACARIDOS Y/O GLICOPROTEINAS”

Autor: ROBERTO OSCAR COUSO
Director: MARCELO ALBERTO DANKERT
Lugar de Trabajo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
“FUNDACION CAMPOMAR”

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1643
E = 2
✓

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo A. Dankert por su constante guía y sentido crítico brindados a lo largo de este trabajo.

A los Dres. Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini por haberme brindado la posibilidad de realizar mis tareas en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al Dr. Carlos E. Cardini, Consejero de estudios, por su valiosa orientación en los comienzos de mi carrera científica.

A Carlos R. García, Luis Ielpi, Nora Iñon y Pedro Romero, compañeros de laboratorio, por los gratos momentos compartidos durante estos años.

A todos los colegas y amigos del I.I.B. por sus valiosos consejos, críticas y apoyos brindados.

A Soledad de Jimenez y Francisco Irusta por su eficiente colaboración.

A mi amigo Carlos A. Lafuente por haberse ocupado de la impresión de este trabajo.

ABREVIATURAS

abe	abecuesa
ác glnico	ácido glucurónico
ADP	5' adenosina difosfato
AMP	5' adenosina monofosfato
Asp	asparragina
{C ₂	
{cel	celobiosa
C ₂ ol	celobitol
CDPgli	5' citidina difosfato glicerol
cm	centímetros
CMP	5' citidina monofosfato
cpm	cuentas por minuto
D-ala	D-alanina
DEAE-celulosa	dietil amino etil celulosa
D-glu	D-glutámico
D-gluNH ₂	D-glutamina
DPN	difosfato piridin nucleótido
E	estaquiosa
EDTA	ácido etilén diamin tetraacético
EtN	etanól amina
FMP	ficaprenol monofosfato
Fr	frente
fuc	fucosa
fuc-NAc	N-acetil fucosamina
G ₂	genciobiosa
gal	galactosa
gal-NAc	N-acetil galactosamina
GDP	5' guanosina difosfato
GDPman	5' guanosina difosfato manosa
gli	glicerol
glnitol	glucuronitol

glnolact	glucuronolactona
{ G	
{ glu	glucosa
gluN	glucosamina
glu-NAC	N-acetil glucosamina
glu-6P	glucosa seis fosfato
GMP	5' guanosina monofosfato
GP	glucosa uno, dos fosfato cíclico
GTP	5' guanosina trifosfato
G1P	glucosa uno fosfato
Hep	heptosa
KDO	ácido ceto deoxioctulosónico
K ₂ ol	kojibitol
L-ala	L-alanina
L-lis	L-lisina
LPS	lipopolisacárido
L-NACPne	L-N-acetil pneumosamina
M ₂	maltosa
M ₃	maltotriosa
mAmp	mili amperios
man	manosa
man-NAC	N-acetil manosamina
M ₂ ol	maltitol
meso-DPM	meso diamino pimélico
MSH	mercapto etanol
mur-NAC	N-acetil murámico
NDP-Az	nucleótido difosfato azúcar
neu-NAC	N-acetil neuramínico
nm	nanometros
nmoles	nanomoles
Or	origen
Pi	fosfato inorgánico
pmoles	picomoles

p-nitro-fenil-manósido	para-nitro-fenil-manósido
{ R	
{ raf	rafinosa
ram	ramnosa
R _f	relación de movilidad del compuesto respecto del frente del solvente
R _{glu}	relación de movilidad del compuesto respecto de la glucosa
RPM	revoluciones por minuto
{ S	
{ sac	sacarosa
Sol	sorbitol
S _{2ol}	soforitol
TDP	5' deoxitimidina difosfato
TDPram	5' deoxitimidina difosfato ramnosa
TPN	trifosfato piridín nucleótido
TPNH ⁺	trifosfato piridín nucleótido reducido
Treo	treonina
tri-2P	trisacárido dos fosfato
Tri-P	trisacárido fosfato cíclico
Tris	Tris (hidroximetilamino) metano
UDP	5' uridina difosfato
UDPglu	5' uridina difosfato glucosa
UDPglnico	5' uridina difosfato glucurónico
UMP	5' uridina monofosfato
volts	voltios
uCi	micro Curies
ug	microgramos
ul	microlitros
umoles	micromoles

INDICE

	<u>PAG.</u>
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	
1.1. Generalidades	4
1.2. Cubierta o pared celular	6
1.3. Estructura de los principales polisacáridos asociados a la pared celular	8
1.3.1. La mureina	8
1.3.2. El lipopolisacárido	10
1.3.3. Los ácidos teicoicos	13
1.4. Función de los lípidos intermediarios en la síntesis de polisacáridos de pared	14
1.4.1. Síntesis del polisacárido O	14
1.4.1.1. Formación de la unidad repetitiva	15
1.4.1.2. Polimerización de la unidad repetitiva	15
1.4.1.3. Transferencia del polisacárido O al "core" del lipopolisacárido	17
1.4.1.4. Cierre del ciclo mediante una fosfatasa	17
1.4.1.5. Formación de ramas laterales	17
1.4.2. Función de los P-prenol y los P-P-prenol	19
1.4.3. Síntesis de la mureina	20
1.4.4. Síntesis de ácidos teicoicos	22
1.5. Exopolisacáridos	24
1.5.1. Síntesis de exopolisacáridos	24

	<u>PAG.</u>
1.5.2.Síntesis de un exopolisacárido en <i>A. aerogenes</i>	25
1.5.3.Unidades repetitivas propuestas para exopolisacáridos	27
1.6.Lípido-fosfo-azúcares descritos hasta el momento	35
1.7.Lípidos intermediarios en la síntesis de glicoproteínas en bacterias	39
2.ANTECEDENTES RECIENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	
2.1.Antecedentes	41
2.1.1.Formación de exopolisacáridos	43
2.2.Objetivos	46
3.MATERIALES Y METODOS	
3.1.Cultivo de bacterias y preparación de enzimas	47
3.1.1.Medio de cultivo	47
3.1.2.Condiciones de crecimiento	47
3.1.3.Obtención de células con la cepa B42	48
3.1.4.Preparación de enzimas	49
3.2.Sistemas de incubación	50
3.2.1.Incubación estandar	50
3.2.1.1.Método A	51
3.2.1.2.Método B	52
3.2.2.Incubación en dos etapas	52
3.2.2.1.Método C	52
3.2.3.Incubación utilizando lípido-azúcares como sustratos exógenos	53
3.3.Tratamientos degradativos	54
3.3.1.Hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares	54

	<u>PAG.</u>
3.3.2. Hidrólisis parciales de oligosacáridos	54
3.3.3. Reducción catalítica	55
3.3.4. Tratamiento con fenol	55
3.3.5. Tratamiento alcalino del lípido glucurónico	56
3.3.6. Acetólisis	56
3.3.7. Oxidación con periodato	57
3.3.8. Hidrólisis alcalina	58
3.4. Tratamientos enzimáticos	58
3.4.1. Fosfatasa alcalina	58
3.4.2. β -glucosidasa	59
3.4.3. α -glucosidasa	59
3.4.4. α -manosidasa	59
3.4.5. β -glucuronidasa	59
3.5. Cromatografías	60
3.5.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	60
3.5.1.1. DEAE-celulosa para soluciones lipofílicas	60
3.5.1.2. DEAE-celulosa para soluciones acuosas	61
3.5.2. Cromatografía en columna de geles	61
3.5.3. Cromatografía y electroforesis en papel	62
3.6. Medida de la radioactividad	63
3.6.1. Contaje diferencial de radioactividad de (^{14}C) y (^3H) en una misma muestra	64
3.7. Preparación de compuestos radioactivos	64
3.7.1. Obtención de p-nitro-fenil- (^{14}C) glucurónico	64
3.7.2. Obtención de UDP (^{14}C) glucosa	65

	<u>PAG.</u>
3.7.3.Obtención de UD(³² P)glucosa	65
3.7.4.Obtención de TDP(¹⁴ C)glucosa	66
3.7.4.1.Obtención de TDPglucosa-pirofosforilasa	67
3.7.5.Obtención de TDP(¹⁴ C)ramnosa	68
3.7.5.1.Obtención de TDPramnosa óxido-reductasa	69
3.7.6.Obtención de UDP(¹⁴ C)glucurónico	70
3.7.6.1.Obtención de UDPglucosa deshidrogenasa	70
3.7.7.Obtención de GDP(¹⁴ C)manosa	71
3.7.7.1.Preparación de GDPman pirofosforilasa	71
 4.RESULTADOS	
4.1.Incorporación de glucosa	73
4.2.Incorporación de manosa	79
4.2.1.Generalidades	79
4.2.1.1.Análisis del material liposoluble marca <u>a</u> do con (¹⁴ C)manosa	80
4.2.1.2.Cromatografía en DEAE-celulosa	82
4.2.2.Estudio estructural del compuesto I	83
4.2.2.1.Hidrólisis ácida suave	83
4.2.2.2.Tratamiento con fenol 50%	83
4.2.2.3.Efecto del P-ficaprenol en la formación del compuesto I	85
4.2.2.4.Configuración anomérica de la manosa en el manosa-P-prenol	86
4.2.2.5.Reacción de síntesis del manosa-P-prenol	88
4.2.3.Estudio estructural del compuesto II	89
4.2.3.1.Número de monosas del oligosacárido	89

	<u>PAG.</u>
4.2.3.2. Confirmación de la unión difosfato entre la porción lipídica y el trisacárido	91
4.2.3.3. Tratamiento con fenol 50%	93
4.2.3.4. Azúcares que componen el trisacárido	95
4.2.3.5. Relación glucosa/manosa en el trisacárido	98
4.2.3.6. Determinación de la configuración anémica de la manosa en el trisacárido	100
4.2.3.7. El trisacárido manosil-celobiosa, ¿es lineal o ramificado?	102
4.2.3.8. Determinación de la unión manosa-celobiosa	105
4.2.3.9. Dador de la manosa del trisacárido	108
4.3. Incorporación de ácido glucurónico	114
4.3.1. Generalidades	114
4.3.2. Obtención de (glnico) _n -X-P-P-prenol con marca en otros azúcares	117
4.3.2.1. Obtención del compuesto con marca en manosa	117
4.3.2.2. Obtención del compuesto con marca en glucosa	121
4.3.3. Estructura del (glnico) _n -manosil-celobiosa	123
4.3.3.1. Hidrólisis ácida parcial de (glnico) _n -man-glu-glu	126
4.3.3.2. Determinación de la unión del ácido glucurónico a la manosa	130

	<u>PAG.</u>
4.3.3.3. Obtención de (glnico) _n -(¹⁴ C)manosil-celobiosa-P-P-prenol a partir de UDP glnico y (¹⁴ C)manosil-celobiosa-P-P-prenol	132
4.4. Incorporación de glucosa, 2 ^a serie	135
4.4.1. Generalidades	135
4.4.1.1. Análisis del compuesto obtenido	136
4.4.1.2. Obtención del lípido-X ₆ con marca en ácido glucurónico	139
4.4.1.3. Presencia de manosa en X ₆	141
4.4.2. Propiedades del lípido-X ₆	143
4.4.2.1. Condiciones óptimas de obtención	143
4.4.2.2. Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa	145
4.4.3. Estructura del lípido-X ₆	150
4.4.3.1. Determinación de la unión entre la parte lipídica y el oligosacárido X ₆	150
4.4.3.2. Tamaño del oligosacárido X ₆	156
4.4.3.3. Cálculo del número de nuevas glucosas que entran por cada molécula de ácido glucurónico	157
4.4.3.4. Hidrólisis ácida parcial de (¹⁴ C)(glu) ₂ -glnico-man-glu-glu	160
4.4.3.5. Estudio del compuesto (¹⁴ C)gluY ₂	162
4.4.3.6. Hidrólisis ácida parcial de (¹⁴ C)glnicoX ₆ y (¹⁴ C)manX ₆	165
4.4.3.7. Confirmación de la estructura de X ₂	167

	<u>PAG.</u>
4.4.4. Determinación de la unión del disacárido gen- ciobiosa al oligosacárido X_4	170
4.4.4.1. Acetólisis parciales sobre el hexasa- cárido con marca en manosa, glucosa o en ácido glucurónico	171
4.4.5. Obtención de $X_6-(^{32}\text{P})\text{-P-prenol}$	178
4.4.6. Obtención de $(^{14}\text{C})\text{man}X_6\text{-P-P-prenol}$ a partir de $(^{14}\text{C})\text{man-celobiosa-P-P-prenol}$	180
4.5. Incorporación de ramnosa	182
4.5.1. Generalidades	182
4.5.1.1. Análisis del compuesto obtenido	183
4.5.2. Estructura de $(^{14}\text{C})\text{ram}X_7$	184
4.5.2.1. Hidrólisis ácida parcial de $(^{14}\text{C})\text{ram}X_7$	184
4.5.2.2. Estudio sobre la unión ramnosil-gen- ciobiosa	187
4.5.2.3. Obtención de $(^{14}\text{C})\text{ram-glu-glu-glnico-}$ $\text{man-glu-glu-}(^{32}\text{P})\text{-P-prenol}$	190
4.6. Incorporación de ácido glucurónico, 2ª parte	193
4.6.1. Obtención de lípido-glucurónico	193
4.6.1.1. Efecto de UDP y UMP en la síntesis de lípido-glucurónico	196
4.6.2. Propiedades del lípido-glucurónico	198
4.6.2.1. Cromatografía y electroforesis en pa- pel	198
4.6.2.2. Tratamientos degradativos	201
DISCUSION Y CONCLUSIONES	205
BIBLIOGRAFIA	224

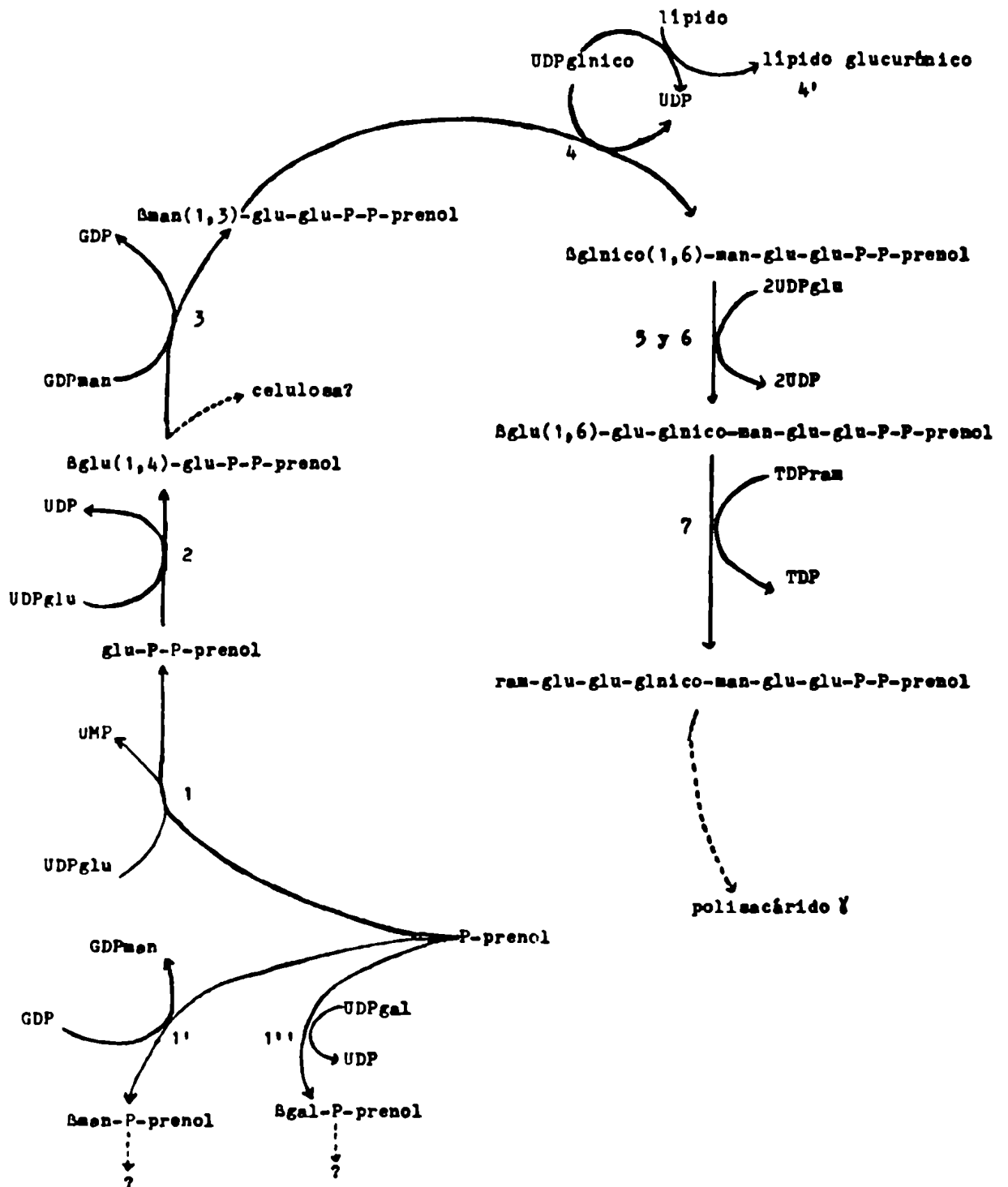
RESUMEN

En nuestro laboratorio, trabajando con *A. xylinum* se había descrito la formación in vitro de lípido-azúcares de acuerdo a las siguientes reacciones:

- a) $\text{UDPgal} + \text{P-prenol} \text{ ---}\rightarrow \text{gal-P-prenol} + \text{UDP}$
- b) $\text{UDPglu} + \text{P-prenol} \text{ ---}\rightarrow \text{glu-P-P-prenol}$
 $\qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \searrow \text{---}\rightarrow \text{cel-P-P-prenol}$
- c) $\text{UDPglu} + \text{"ceptor lipídico"} \text{ ---}\rightarrow \text{glu-oligosacárido-"ceptor lipídico"}$
- d) $\text{UDPglnico} + \text{"ceptor lipídico"} \text{ ---}\rightarrow \text{glnico-oligosacárido-"ceptor lipídico"}$
- e) $\text{UDPglnico} + \text{"lípidico"} \text{ ---}\rightarrow \text{glnico-"lípidico"}$

Por otra parte además de la celulosa (el principal polisacárido que sintetiza *A. xylinum*) se habían aislado de los sobrenadantes de los medios de cultivo, dos polisacáridos aniónicos que poseían en su estructura: glucosa, manosa y ácidos urónicos. Uno de ellos poseía además ramosa.

En esta Tesis utilizando preparados enzimáticos de *A. xylinum* y distintos dadores de azúcares, se estudian en detalle las reacciones b), c), d) y e), la interrelación que existe entre los distintos lípido-azúcares involucrados en ellas, así como con los que se encontraron durante este trabajo. Los compuestos analizados, se pueden resumir en el siguiente cuadro:



Se determinó la estructura de los lípido-azúcares formados en las reacciones 1', 3, 4, 5-6 y 7 (las reacciones c) y d) están incluidas en 4, 5 y 6) siguiendo las técnicas corrientes para la resolución de este tipo de problemas. La mayoría de los mismos se pudieron sintetizar a partir de los nucleótido-azúcares necesarios no radioactivos y el precursor lipídico marcado.

Compuestos con marca en (^{32}P) se obtuvieron únicamente cuando se utilizó como nucleótido radioactivo $\text{UD}(^{32}\text{P})\text{glu}$, pues la reacción 1 es la única en que se transfiere P como P-glucosa.

No se encontró relación entre el celobiosa-P-P-prenol y la celulosa, aparentemente todos estos compuestos están involucrados en la síntesis del polisacárido γ .

La función del β -man-P-prenol y el lípido glucurónico no pudo ser establecida pero no parecen estar involucrados en la formación de los componentes del ciclo que poseen dichos azúcares.

1. INTRODUCCION

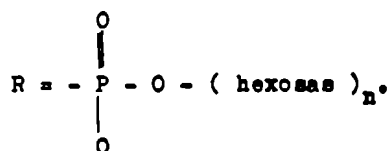
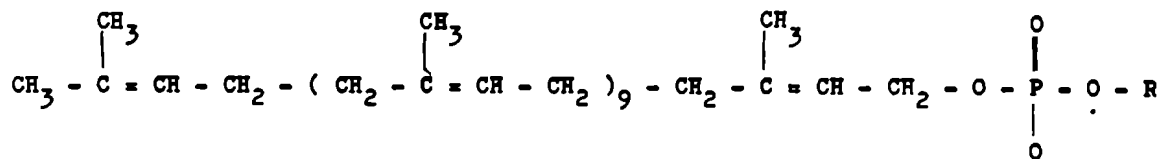
1.1. Generalidades

El concepto de "lípidos intermediarios" en la síntesis de polisacáridos surgió a mediados de la década pasada (1-3).

Si bien en un principio su función fue establecida en procariotes, específicamente en la síntesis de polisacáridos complejos bacterianos, posteriormente se vio que su radio de acción alcanzaba también a los eucariotes (4-6).

La estructura de estas moléculas es mixta: poseen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. La primera está constituida por un alcohol de los denominados poliisoprenoles (polímero lineal de isopreno con una función alcohólica en el extremo no ramificado). Unida al mismo mediante un fosfato o un pirofosfato se encuentra la parte hidrofílica que consiste en uno o más azúcares (Fig. N° 1).

La unión de alta energía que poseen estos compuestos les permite actuar como dadores de azúcares a aceptores celulares.



R = Hexosa.

Figura 1: Estructura general de los prenil-fosfo-azúcares descritos en bacterias.

La diferencia con los nucleótido-azúcares, que también cumplen esta función en las células, radica en que debido a su lipofili-
 cidad pueden actuar perfectamente a nivel de membrana.

Vamos a circunscribirnos en esta Introducción únicamente a los lípidos intermediarios descritos en bacterias y que inter-
 vienen en la síntesis de polisacáridos de pared, de exopolisacá-
 ridos, o de glicoproteínas.

1.2. Cubierta o pared celular

Es algo ambigua la nomenclatura empleada para designar a esta porción de las bacterias. Nosotros llamaremos cubierta o pared celular a todas las estructuras localizadas por fuera de la membrana citoplasmática y estrechamente ligadas a ella.

Esta cubierta es responsable del comportamiento antigénico, de la susceptibilidad a bacteriofagos y de la respuesta diferencial a la tinción de Gram. Esta última propiedad permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas, es decir que se tiñen con el colorante y Gram negativas, que no se tiñen.

Si bien la estructura de la cubierta es diferente, ambos grupos poseen un componente común, la mureina (también llamada mucopéptido o péptido-glicano) o pared celular propiamente dicha (7), que es la responsable de la forma de la bacteria.

En la figura 2 se observa un esquema muy simple, con la distribución en ambos grupos de bacterias, de los principales componentes de la pared o cubierta celular (8-12).

Las bacterias Gram negativas poseen una estructura que para hacer las cosas todavía un poco más ambiguas se ha dado por llamar de doble membrana (13); la parte interna corresponde a la membrana citoplasmática de la célula; la externa está constituida por lipopolisacárido (polímero que le confiere las propiedades antigénicas) y lipoproteína. Entre ambas se encuentra la mureina que representa de un 5 a un 25% del total de pared o cubierta, y

está separada a su vez de la membrana citoplasmática por un pequeño espacio periplásmico (12).

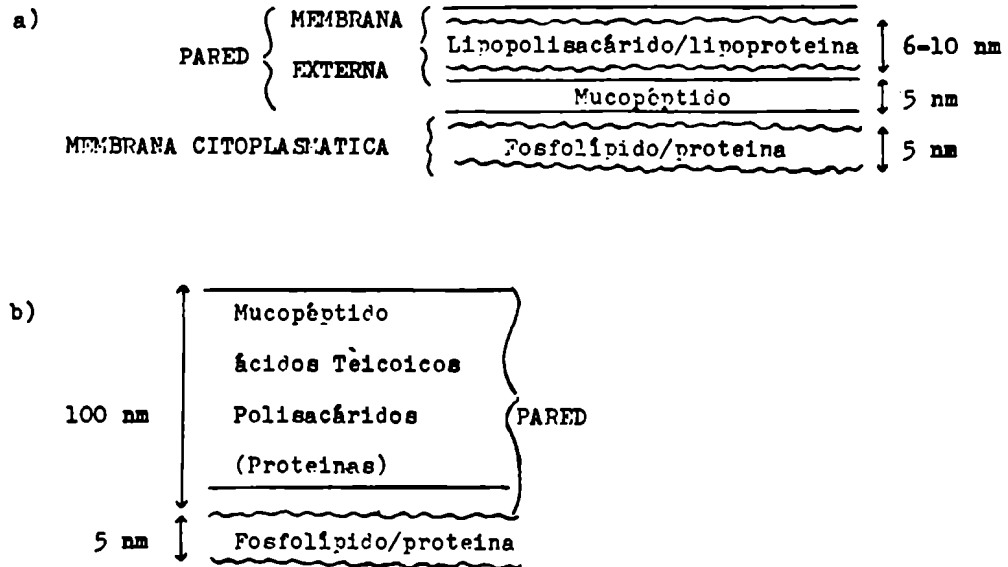


Figura 2: Esquema de cubierta celular en bacterias Gram negativas (a) y Gram positivas (b).

Las bacterias Gram positivas poseen una cubierta que representa un alto porcentaje del peso seco de las mismas. Está separada de la membrana citoplasmática por un espacio periplásmico bien definido. La mureína o pared propiamente dicha es el componente más importante; el resto está formado por una variedad de polisacáridos cargados negativamente que incluyen ácidos teicoicos (que poseen los determinantes antigénicos) y proteínas, en algunas especies.

1.3. Estructura de los principales polisacáridos asociados a la pared celular

Los polisacáridos presentes en ambos tipos de pared, poseen estructura química diferente y frecuentemente son físicamente separables. Se ha establecido la estructura de los componentes individuales en un gran número de especies bacterianas y se ha estudiado la síntesis de los mismos. Vamos a referirnos aquí a los tres principales polímeros: la mureina, el lipopolisacárido y los ácidos teicoicos.

1.3.1. La mureina

Las mureinas conocidas hasta el momento poseen una cadena de hidratos de carbono donde se alternan sucesivamente mediante uniones β 1,4 N-acetil-glucosamina y su O-lactil éter, el ácido N-acetilmurámico.

A partir del carboxilo de los N-acetilmurámicos, se proyectan cadenas cortas de aminoácidos, generalmente cuatro, alternándose de la serie L y D. La secuencia más corriente es L-alanina, D-glutámico, un diaminoácido y finalmente D-alanina. En todas las Gram negativas el diaminoácido es mesodiaminopimélico.

En los casos más sencillos los péptidos están entrecruzados entre el amino ω de un residuo de el diaminoácido y el carboxilo de una D-alanina de una cadena adyacente. Pero se han descrito estructuras muy complejas en las que intervienen más de diez aminoácidos y forman una red tridimensional (14 - 15).

De esta manera la mureina constituye una macromolécula en

forma de bolsa o jaulita que rodea a toda la célula bacteriana (7), (Fig.3).

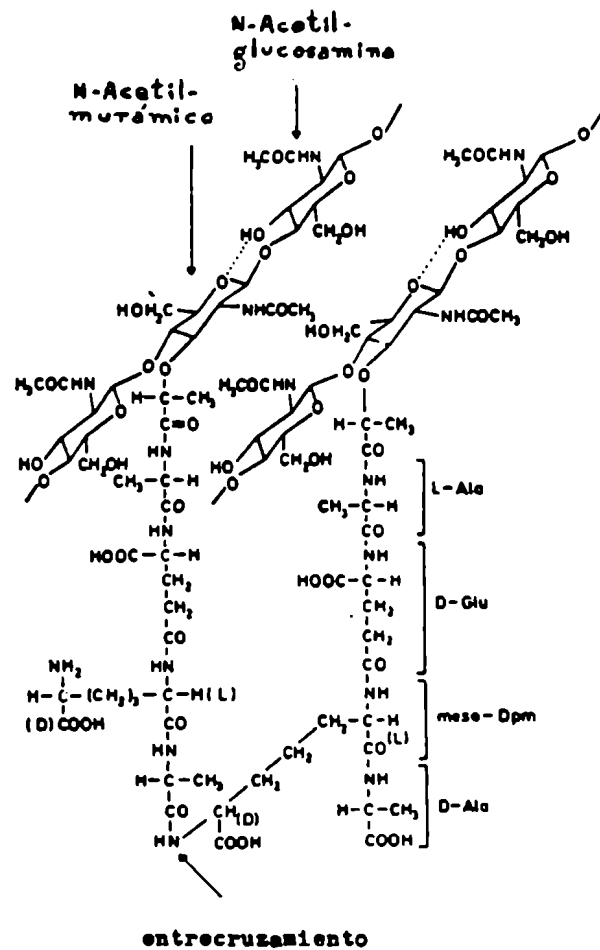


Figura 3: Fragmento de la estructura primaria de la mureina de Escherichia coli (16).

1.3.2. El lipopolisacárido

El lipopolisacárido, componente de la pared de las bacterias Gram negativas, ha sido muy estudiado en varias especies de *Salmonella* y en *E. coli*, siendo la estructura similar en ambas (17-18).

El lipopolisacárido de las Enterobacteriaceae consta de tres partes bien diferenciadas: el lípido A, la región central o "core" y el polisacárido O (Fig. 4).

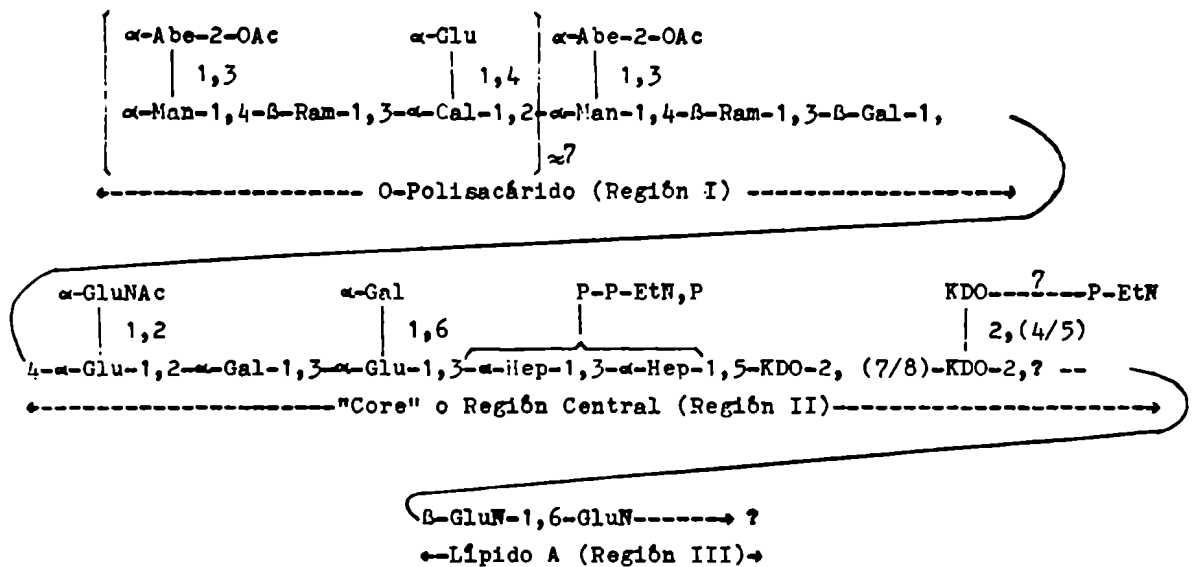
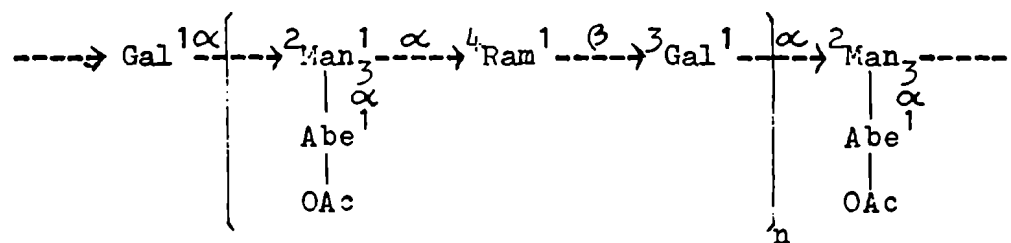


Figura 4: Estructura del lipopolisacárido de Salmonella: Estructura tentativa propuesta para el lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* (19) (sumario de resultados).

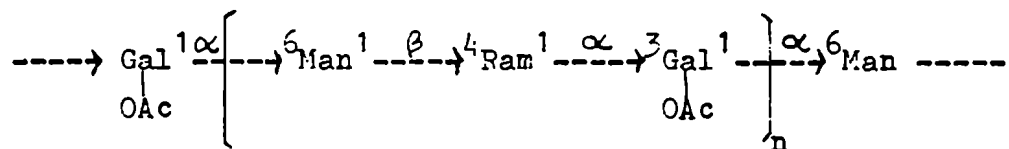
El lípido A no está perfectamente caracterizado (19-22); se sabe que consiste en un disacárido de glucosamina con ácidos grasos de cadena larga en uniones éster o amida. Unida al mismo por intermedio de 2-ceto-3-deoxioctulosonato (KDO), se encuentra la región central, constituida por una secuencia de azúcares.

El polisacárido O, también conocido como antígeno O (2, 20-24), está formado por una secuencia de tres o cuatro azúcares que se repiten a lo largo de toda la cadena (18). La clasificación de las Salmonellas según el esquema de Kauffmann-White, asignándoles distintos tipos inmunológicos, es un reflejo de las diferencias de estructura del polisacárido O presente en cada cepa (25). (Fig.5).

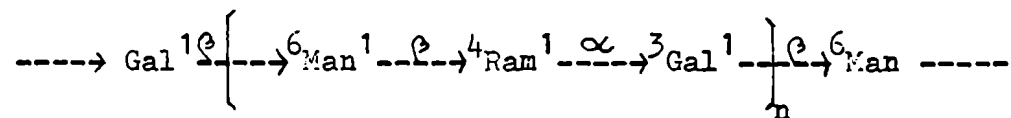
Salmonella typhimurium (grupo B, tipo 1,4,5,12)



Salmonella anatum (grupo E, tipo 3,10)



Salmonella newington (grupo E, tipo 3,15)



Salmonella minneapolis (grupo E, tipo 3,11,34)

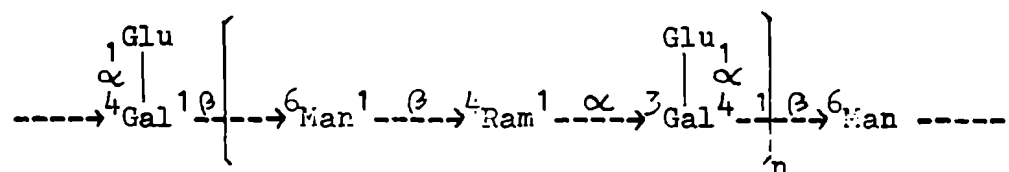
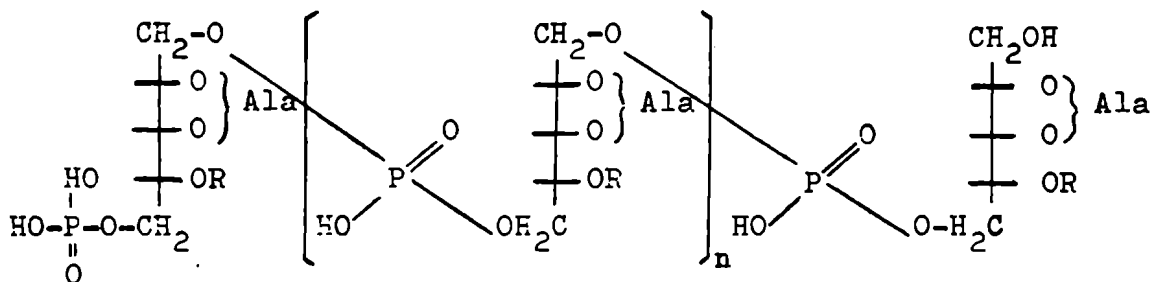


Figura 5: Unidades repetitivas del polisacárido O de algunas cepas de Salmonella (19).

1.3.3. Los ácidos teicoicos

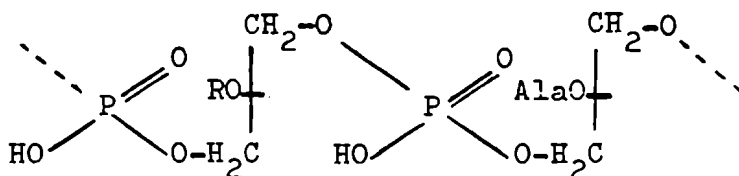
Los ácidos teicoicos son polímeros solubles de características aniónicas. Estructuralmente están constituidos por unidades de ribitol-P y/o glicerol-P con uniones fosfodiéster (26-29). Son de complejidad variable y a menudo tienen intercaladas moléculas de glucosa, NAcglucosamina, etc. (Fig. 6).

a)



R=glicosil.

b)



R=glicosil.

Figura 6: Esquema de la estructura de ácidos Teicoicos ribitol-P a) y glicerol-P b).

1.4. Función de los lípidos intermediarios en la síntesis de polisacáridos de pared

1.4.1. Síntesis del polisacárido O

Vamos a describir con mayor detalle y en primer término la función de los lípidos intermediarios en la síntesis del polisacárido O de Salmonella realizado por Robbins y col. (3,30), porque nos provee un panorama completo de la forma de actuar de estos compuestos (Fig. 7).

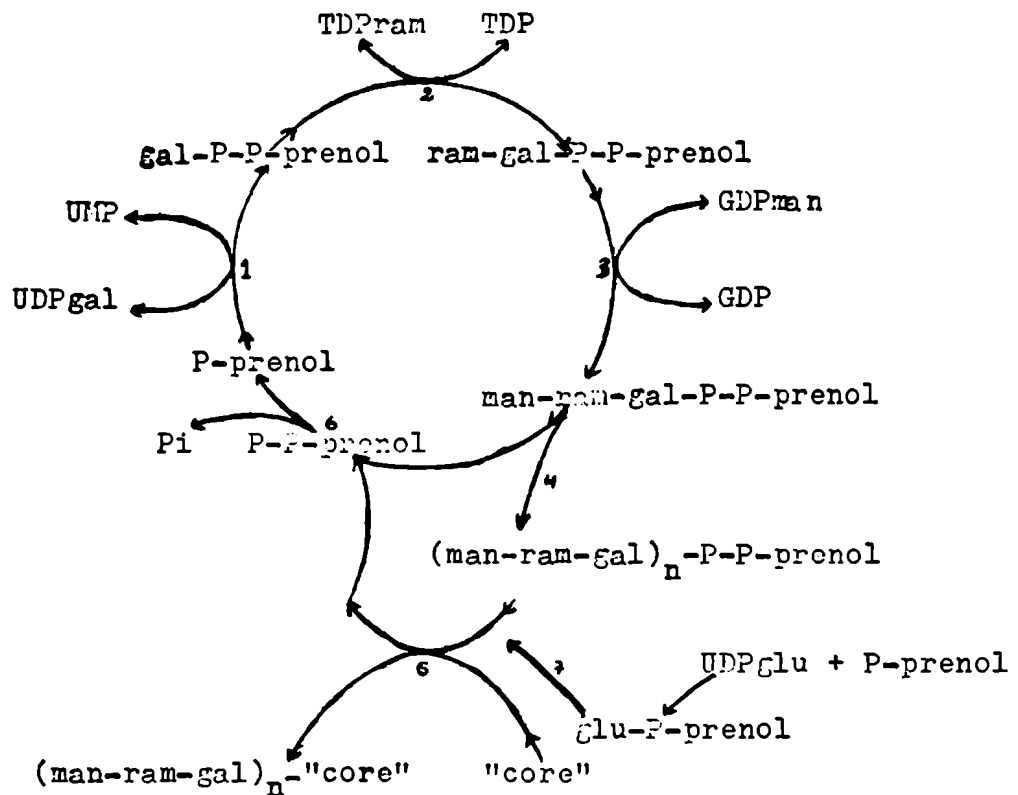


Figura 7: Esquema biosintético del polisacárido O.

Podemos dividir el proceso en cinco etapas:

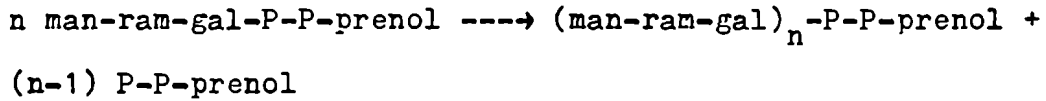
- a) Formación de la unidad repetitiva man-ram-gal sobre el P-P-prenol.
- b) Polimerización sobre el P-P-prenol.
- c) Transferencia del polímero a la región central del lipopolisacárido, que actúa de aceptor.
- d) Cierre del ciclo mediante la acción de una fosfatasa.
- e) Formación de ramas laterales.

1.4.1.1. Formación de la unidad repetitiva.- Los nucleótido-azúcares UDPgal, TDPram y GDPman son los precursores citoplasmáticos de la unidad repetitiva. Los monosacáridos son transferidos secuencialmente a partir de sus respectivos dadores a undecaprenilfosfo-éster.

La primera reacción (1) es la transferencia de gal-1P al P-prenol con liberación de UMP. Posteriormente se incorpora ramnosa al gal-P-P-prenol (reacción 2) y manosa al ram-gal-P-P-prenol con liberación de TDP y GDP respectivamente (reacción 3).

La estructura del preñol fue determinada por espectrografía de masa (31) y resultó ser una mezcla de un 85-90% de un alcohol poliisoprenoide (C₅₅H₉₀O) y un 10-15% de un C₅₀ alcohol poliisoprenoide, este último a consideración de los autores también actuaría como intermediario y no sería material contaminante.

1.4.1.2. Polimerización de la unidad repetitiva.- La polimerización (reacción 4) puede ser representada por la siguiente reacción:



Este mecanismo fue comprobado mediante la aislación de dímeros (hexasacárido) sobre el P-P-prenol en *Salmonella typhimurium* (32) y *Salmonella newington* (33). El polisacárido unido al lípido no pudo aislarse, pero tratando con fenol fracciones de membrana se aislaron polisacáridos con el fosfato unido a la galactosa (34).

El crecimiento de la cadena de azúcares es por el extremo reductor. Se pudo demostrar mediante experimentos de pulsos y "chase" que la cadena creciente era constantemente transferida a nuevos trisacáridos activados (35)(Fig.8).

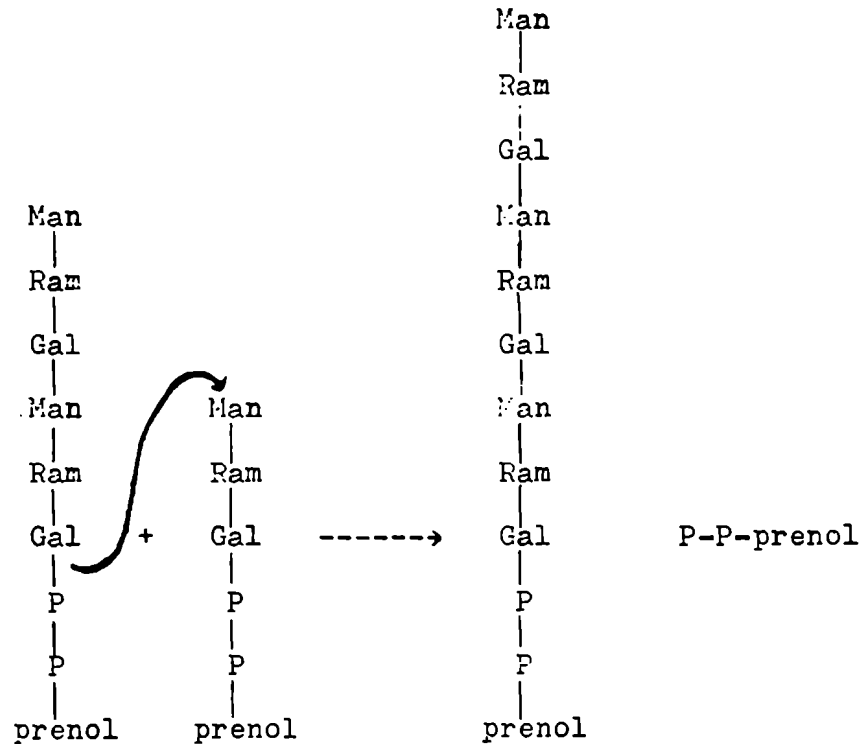


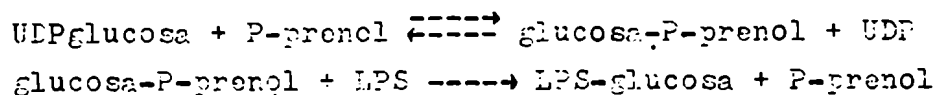
Figura 8: Mecanismo de crecimiento del polisacárido O: Adición de un nuevo trisacárido al extremo reductor de una cadena creciente.

1.4.1.3. Transferencia del polisacárido O al "core" del lipopolisacárido.- Esta reacción (reacción 5) es catalizada por la antígeno-O-LPS ligasa (anteriormente llamada translocasa). Mutantes con algún defecto en la síntesis del "core", producen un receptor incompleto que no es sustrato de la enzima y acumulan el polisacárido O unido al P-P-prenol. Esta enzima fue aislada y purificada por Osborn (20).

1.4.1.4. Cierre del ciclo mediante una fosfatasa.- En la reacción seis interviene una fosfatasa que quita un fósforo al prenil-difosfato, permitiendo de esta manera que el lípido-monofosfato entre nuevamente en el ciclo. Esta reacción enzimática fue estudiada en detalle en la síntesis de la mureina (36). También se ha descrito una segunda fosfatasa que deja al alcohol libre (37) y una quinasa que realiza la reacción inversa (38).

1.4.1.5. Formación de ramas laterales.- El polisacárido O de *Salmonella minneapolis* posee una unidad repetitiva de cuatro azúcares (32,39). Difiere de los otros grupos E en que hay una molécula de glucosa unida a la galactosa en forma α 1,4 a lo largo de todo el polisacárido (Fig.5).

Se demostró que la glucosa no era cedida directamente a partir de UDPglu al antígeno O sino que estaba involucrada la formación de un glucosil-P-prenol como intermediario entre el nucleótido dador y el producto final (40). El mecanismo propuesto fue el siguiente:



El análisis por espectroscopia de masa del preñol correspondiente demostró que el lípido involucrado era el mismo que intervenía en la síntesis del antígeno O (40). La glucosa cedida por el glucosa-P-preñol entraría sobre la galactosa, recién durante el proceso de polimerización. El hexasacárido-P-P-preñol sería el mínimo aceptor, dado que se necesitarían uniones β -galactosa para que entrara el residuo glucosídico (41). Si la unión es α -galactosa no se transfiere glucosa al polisacárido (Fig.9).

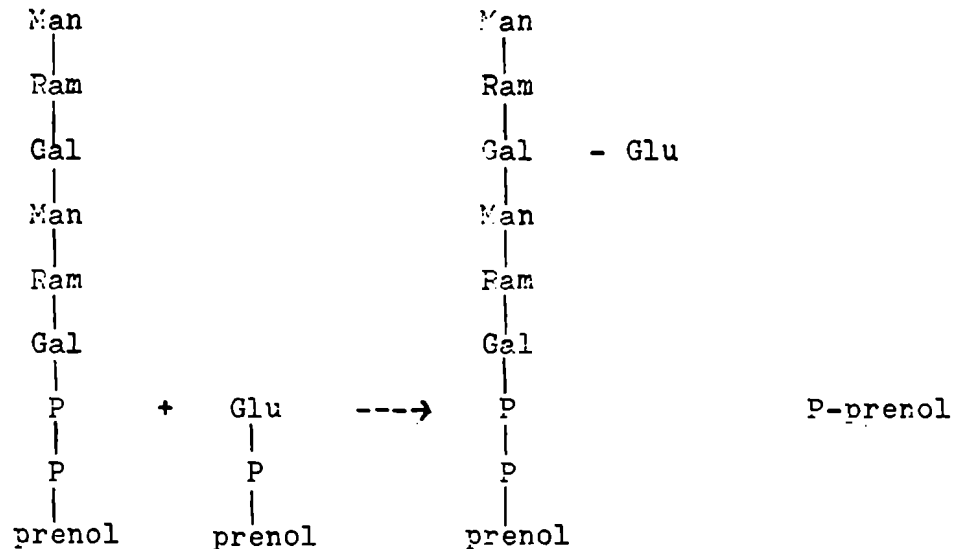


Figura 9: Mecanismo de formación de ramas laterales: Intervención de un azúcar-P-preñol en el proceso.

Este mecanismo para la formación de polímeros con ramas laterales no es el único. La unidad repetitiva del polisacárido O de *Salmonella typhimurium* consiste en el tetrasacárido abe-man-ram-gal (Fig.10), Pero en este sistema la abecucosa se transfiere a partir del nucleótido-azúcar CDP-abecucosa al man-ram-gal-P-P-preñol antes de producirse la polimerización y, al crearse

uniones galactosil-manosa, la misma queda situada como rama lateral. Después de producirse la polimerización, la abecucosa no se transfiere (32).

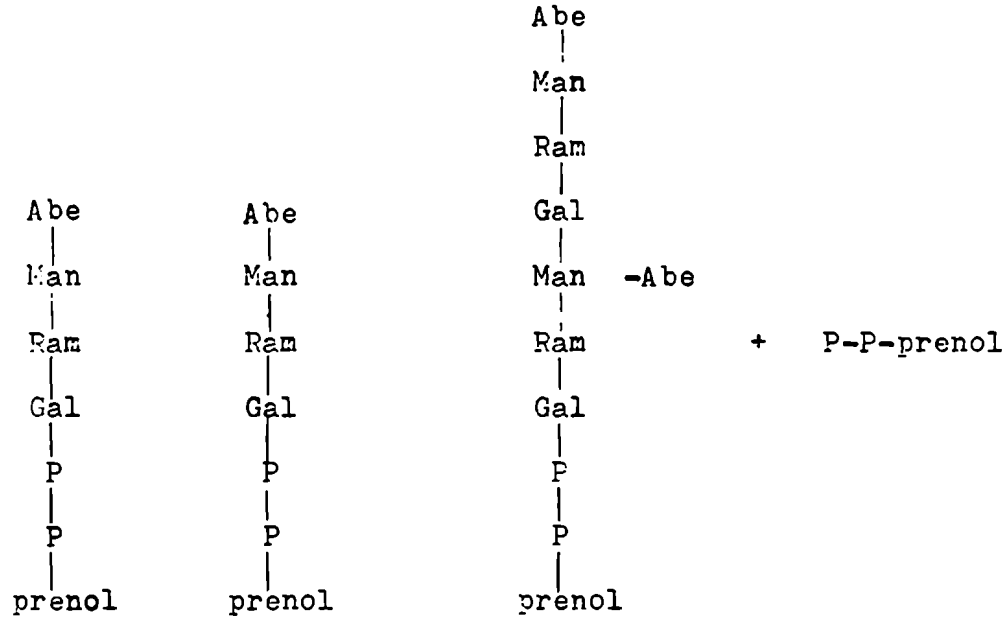


Figura 10: Mecanismo de formación de ramas laterales: Intervención de un nucleótido-azúcar en el proceso.

1.4.2. Función de los P-prenol y los P-P-prenol

Conviene prestar especial atención a la distinta función de los P-prenol y P-P-prenol ya que lo que ocurre en los ejemplos anteriormente descritos parecería ser bastante general (salvo algunas excepciones que mencionaremos más adelante), no sólo en bacterias sino en todos los procesos en procariotes y eucariotes en donde estén involucrados los lípidos intermediarios.

Mientras que los P-prenol portarían un sólo monosacárido cumpliendo funciones de dadores muy similares a la de los nucleó-

tido-azúcares, los P-P-prenol pueden transportar más de un azúcar, y este oligosacárido puede a su vez intervenir en un proceso de polimerización para ser finalmente transferido a otro polisacárido aceptor.

En eucariotes, en la síntesis de ciertas glicoproteínas se forma un oligosacárido-P-P-prenol, posiblemente en forma secuencial a partir de nucleótido-azúcares y de prenol-monofosfato-azúcares, que es transferido a un péptido o proteína aceptora (4-6).

1.4.3. Síntesis de la mureina.

En la síntesis de la mureina también intervienen lípidos intermedarios (Fig.11).

El esquema es similar al visto pero llama la atención la complejidad del nucleótido dador (un aminoazúcar y cinco aminoácidos), la formación de un grupo amido y la transferencia de otro cinco aminoácidos con participación de RNA de transferencia. El antibiótico bacitracina inhibe la pirofosfatasa provocando la acumulación de P-P-prenol y la detención del ciclo (42-43).

En cuanto a la estructura del lípido, en un primer momento se pensó en un fosfolípido (44), posteriormente se demostró (45) que era un undecaprenol igual al descrito por Robbins y col., en la síntesis del lipopolisacárido de Salmonella.

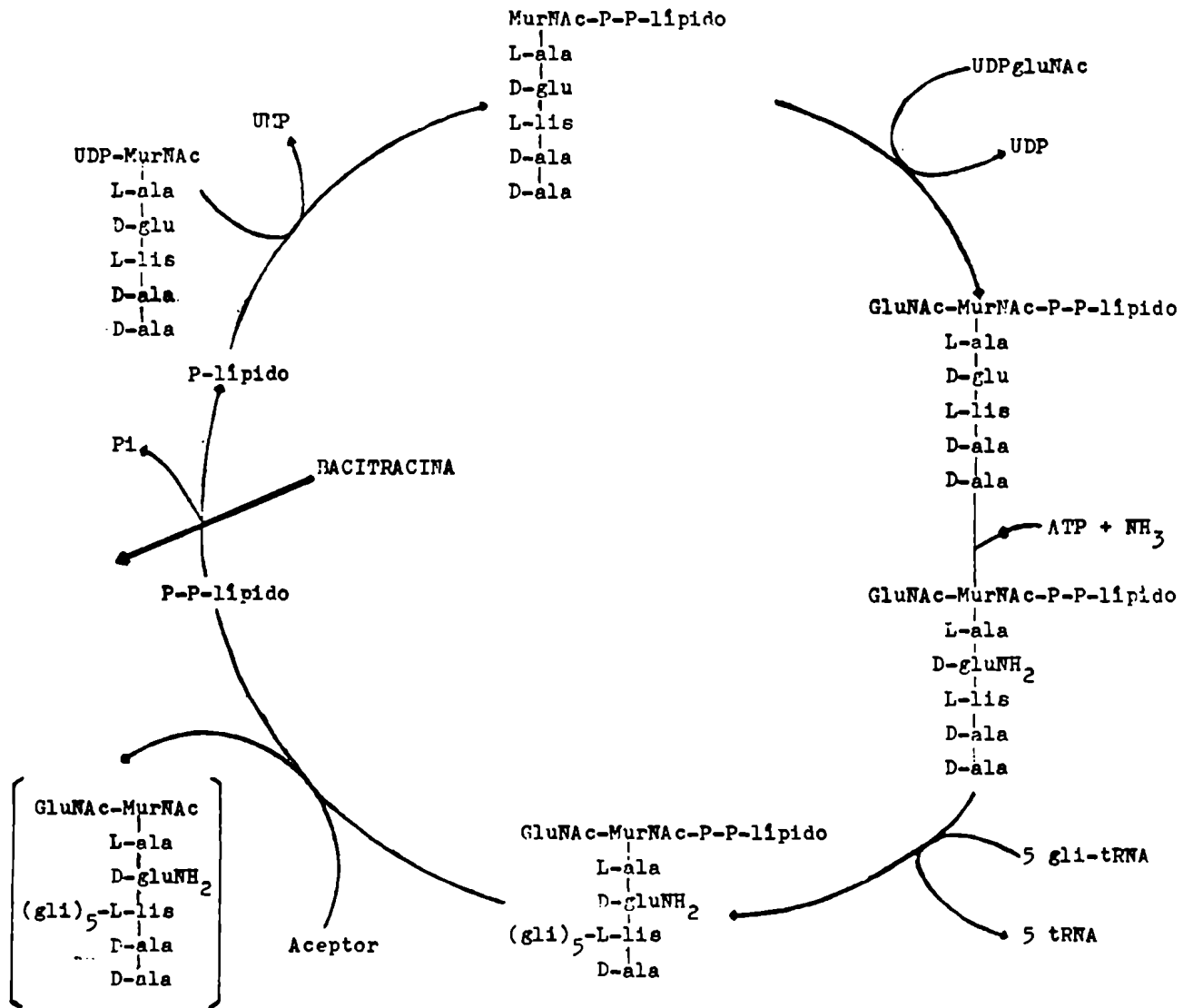


Figura 11: Síntesis de la mureina.

1.4.4. Síntesis de ácidos teicoicos.

La intervención de los lípidos intermediarios en la síntesis de los ácidos teicoicos no se ha demostrado en forma inequívoca. Los indicios que se poseen son en base al aislamiento de probables precursores de dicha síntesis, liposolubles y con propiedades similares a los prenil-fosfo-azúcares. Pero se ha descrito también la participación del ácido lipoteicoico (un poli (glicerol-P) que contiene azúcares esterificados con ácidos grasos) como precursor específico (46).

En la figura 12 se puede observar el mecanismo propuesto para la síntesis de los ácidos teicoicos de *S. lactis* (47) y *B. licheniformis* (48).

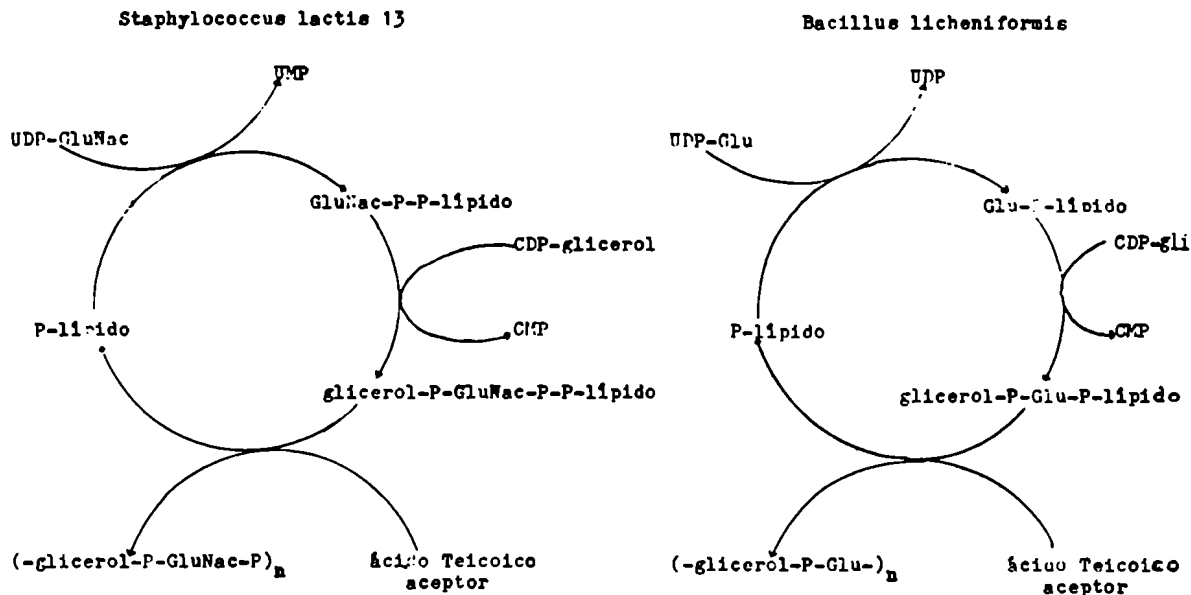


Figura 12: Síntesis de los ácidos teicoicos de Staphylococcus lactis y Bacillus licheniformis.

Ambos mecanismos difieren entre sí, y a su vez son distintos de los ya vistos para la síntesis del polisacárido O y de mureina.

En la formación del ácido teicoico de *S.lactis*, la primera parte consiste en la síntesis de la unidad repetitiva sobre un P-P-lípido igual a lo visto hasta ahora, pero en la polimerización de la misma también queda incluido el P, unido al extremo reductor de la N-acetilglucosamina. De esta manera se liberaría el P-lípido que puede entrar directamente en el ciclo sin necesidad de la acción de una pirofosfatasa como en otros sistemas.

En la síntesis del ácido teicoico de *B.licheniformis* la unidad repetitiva está ligada al lípido por un sólo fosfato lo que es muy original pues no existen en la literatura, ni en procariones, ni en eucariotes, otros casos de este tipo. Este glicerol-P-glucosa-P-lípido se polimeriza liberándose P-lípido que también entra directamente en el ciclo.

1.5. Exopolisacáridos

Los exopolisacáridos bacterianos reciben su nombre por estar por fuera de la pared celular. Las cepas microbianas que los poseen se caracterizan por su aspecto mucoso. Mediante el uso de tinciones especiales se pueden detectar microscópicamente aquellos que forman cápsulas por fuera de la pared con contornos bien definidos, de los que forman "slimes", amorfos, sin límites precisos.

Se pueden dividir en dos grandes grupos, en base a que estén formados por un solo o por varios azúcares distintos, en homopolisacáridos y en heteropolisacáridos.

Los homopolisacáridos pueden dividirse a su vez en lineales a) y b) ramificados.

a) Un ejemplo de los primeros es la celulosa bacteriana, es esencialmente el mismo polisacárido que se ha descrito en plantas, pero al encontrarse en cultivos bacterianos por fuera de las células no posee ningún tipo de función estructural.

b) Los homopolisacáridos ramificados pueden ejemplificarse por los levanos (polifruktosas) y los dextranos (poliglucosos).

Los heteropolisacáridos están formados por unidades repetitivas de complejidad variable, aunque en algunos casos, como en los alginatos poseerían una estructura menos regular (49).

1.5.1. Síntesis de exopolisacáridos

Existen exopolisacáridos como los levanos y dextranos men-

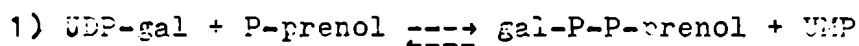
cionados que se sintetizan a partir de sacarosa o varios de sus análogos por un proceso totalmente extracelular. Aunque este proceso ha sido estudiado por varios autores (50-51) hoy día la corriente de interés está más centrada en aquellas especies que forman el polímero intracelularmente y luego lo excretan en el medio.

La similitud de la síntesis de exopolisacáridos con la de otros polisacáridos compuestos por unidades repetitivas que se encuentran por fuera de la membrana celular (componentes de pared), fué demostrado con claridad solamente en un polisacárido capsular de *Aerobacter aerogenes* (52), en cuya síntesis los prenil-fosfo-azúcares, cumplen una función idéntica a la que desarrollan en la formación de el lipopolisacárido y de la mureina.

1.5.2. Síntesis de un exopolisacárido en *A.aerogenes*

Aerobacter aerogenes (ex *Klebsiella aerogenes*) produce un polisacárido capsular relativamente sencillo, pues está compuesto de unidades repetitivas formadas por un tetrasacárido que contiene galactosa, manosa y ácido glucurónico en una relación molar de 2:1:1.

Heath y col. (52) estudiaron "in vitro" la secuencia de reacciones que llevan a la formación de un tetrasacárido unido a un lípido mediante un pirofosfato, que luego se polimeriza para formar una macromolécula idéntica al exopolisacárido capsular nativo:



- 2) gal-P-P-prenol + GDPman ----> man-gal-P-P-prenol + GDP
- 3) man-gal-P-P-prenol + UDPglnico ----> glnico-man-gal-P-P-prenol
+ UDP
- 4) glnico-man-gal-P-P-prenol + UDPgal ----> gal-man-gal-P-P-prenol
|
glnico
+ UDP

Este mecanismo de síntesis de la unidad repetitiva sobre el lípido es similar al descrito para la formación del polisacárido O de *Salmonella*. Difiere sin embargo de los ejemplos citados anteriormente para *S. minneapolis* y *S. typhimurium*, en cuanto al mecanismo de entrada del azúcar que queda como cadena lateral.

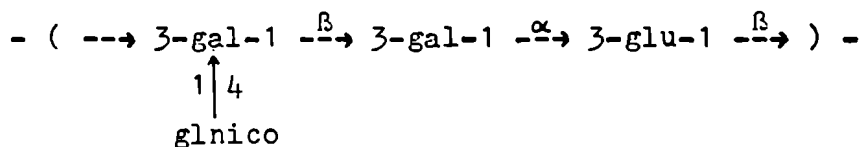
Si bien el ácido glucurónico se transfiere a partir del nucleótido-azúcar correspondiente (similar a la entrada de abecucosa en *S. typhimurium*), su incorporación es anterior a la de la segunda galactosa (ver reacciones 3 y 4). Si no entra el ácido glucurónico, no entra la segunda galactosa y por lo tanto no hay polimerización.

En el polisacárido O de *S. typhimurium*, la abecucosa entra luego de la formación del trisacárido-P-P-prenol y en ausencia del nucleótido-azúcar dador se produce la polimerización sin cadenas laterales (32). Queda todavía por aclarar el mecanismo de elongación de las cadenas y la extrusión del polisacárido. El oligosacárido más grande que se encontró unido al lípido fué un octasacárido, equivalente a dos unidades repetitivas. Este hallazgo haría pensar en una polimerización llevada a cabo sobre el lípido.

La identidad del polisacárido sintetizado con el nativo se determinó no sólo por la composición de azúcares, sino también por la susceptibilidad a ser degradado por una depolimerasa específica inducida por un fago (53).

El lípido interviniente en el proceso se purificó y se sometió a un análisis por espectroscopía de masa: resultó ser en más de un 95% un undecaprenol similar al descrito en la síntesis de la mureina (45), del polisacárido O (31) y de mananos (54).

Este proceso fue estudiado también en otra cepa de *Aerobacter*, el *A. aerogenes* cepa A₄, que posee un exopolisacárido capsular con una unidad repetitiva de cuatro azúcares (55).



Se demostró transferencia de glucosa y galactosa a partir de sus respectivos nucleótidos a lípidos y a polímero, pero no se estableció la naturaleza del lípido ni se determinó la secuencia de reacciones como en el esquema dado por Heath.

1.5.3. Unidades repetitivas propuestas para exopolisacáridos

La complejidad de los hetero exopolisacáridos puede llegar a ser enorme y se han descrito unidades repetitivas que contienen 9 y 14 monosas (Tabla 1). En la misma se pueden observar las estructuras de las unidades repetitivas propuestas para diversos tipos de exopolisacáridos tanto de bacterias Gram positivas como

Gram negativas.

La mayoría de las estructuras propuestas, han sido determinadas en base a estudios de cromatografía gaseosa sobre los polisacáridos permetilados y fragmentados por diversos tratamientos.

Es muy difícil hacer un estudio inequívoco de aquellos polisacáridos que poseen una estructura muy compleja, tal es así que algunos autores como Lindberg (56) consideran que no existen prácticamente unidades repetitivas de más de seis monosas que estén totalmente esclarecidas.

No se incluyen en la tabla muchos otros casos donde al determinar la composición cuantitativa de los monosacáridos que componen el polisacárido se encontró una relación de números enteros entre los mismos, lo que haría pensar que podrían estar formados por unidades repetitivas.

Tabla 1: Unidades repetitivas propuestas para exopolisacáridos.

E. coli tipo 27.- (57)



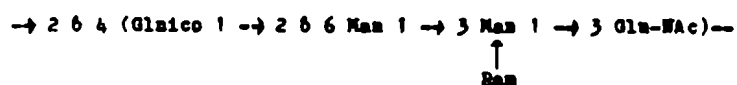
E. coli tipo 30.- (58)



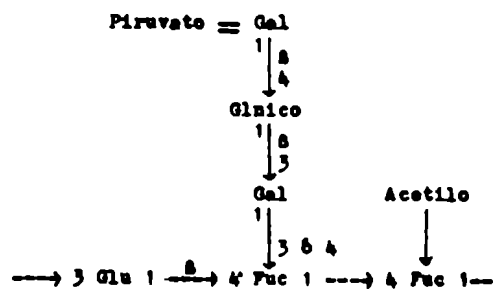
E. coli tipo 42.- (59)



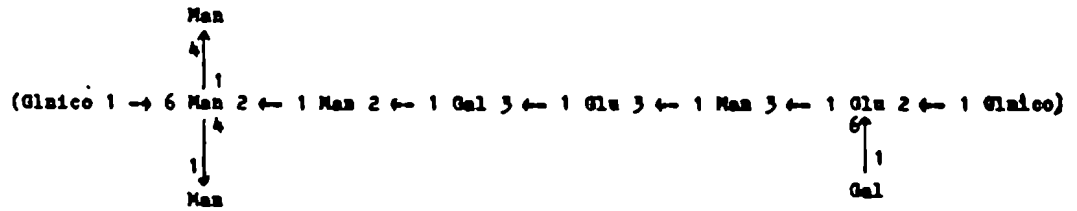
E. coli tipo 85.- (60)



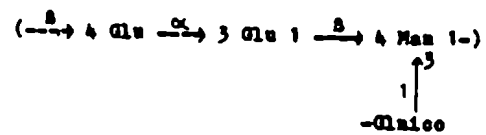
E. coli K 12.- (61)



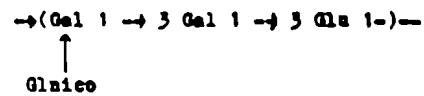
E. coli 72 M.- (62)



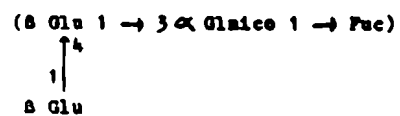
Klebsiella tipo II.- (63)



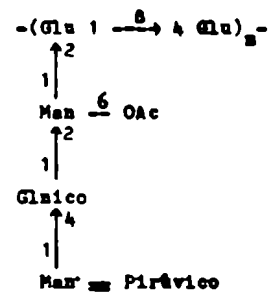
Klebsiella tipo 8.- (64)



Klebsiella tipo 54.- (65)



Xanthomonas campestris.- (66) (67)



Azotobacter indica.- (68)

-→(Glnico 1 → 3 Glu 1 → 2 Glicero-manchentom)-→

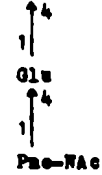
S. pneumoniae tipo 2.- (69)

-→(3 Ram 1 - α -→ 3 Ram 1 - α -→ 3 Ram 1 - β -→ 4 Glu 1-) α -→

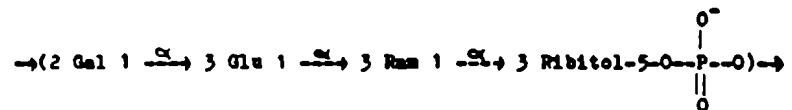


S. pneumoniae tipo 5.- (70)

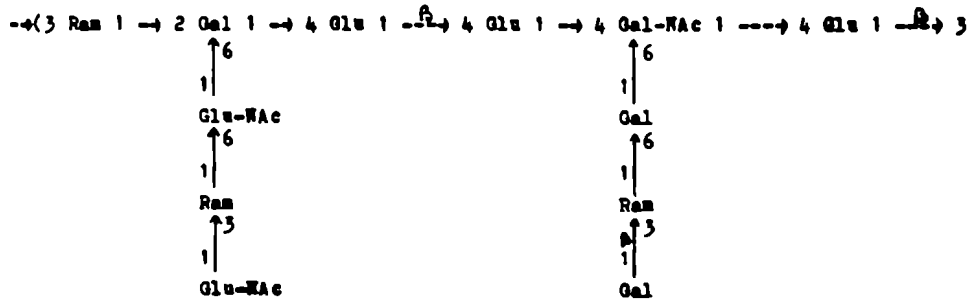
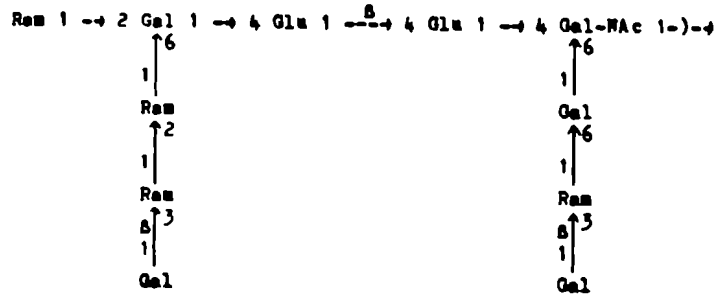
-→(2 Glnico 1 → 3 Pnc-NAc 1-)-→



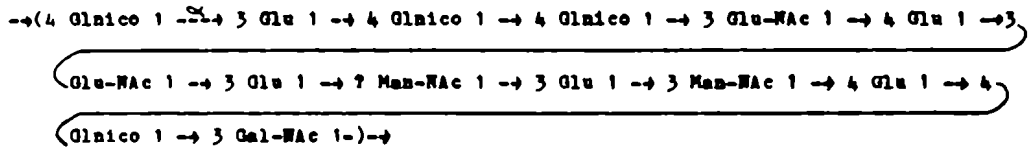
S. pneumoniae tipo 6.- (71)



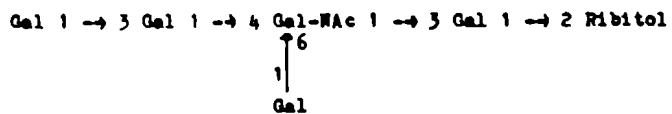
S. pneumoniae tipi 7.- (72) (73)



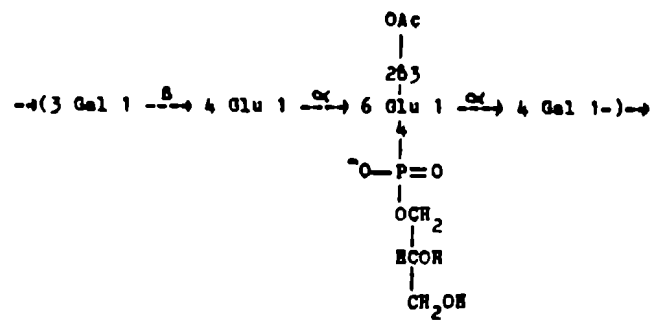
S. pneumoniae tipo 9 N.- (74) (75)



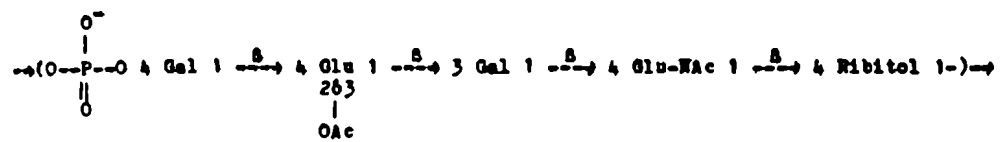
S. pneumoniae tipo 10 A.- (76) (77)



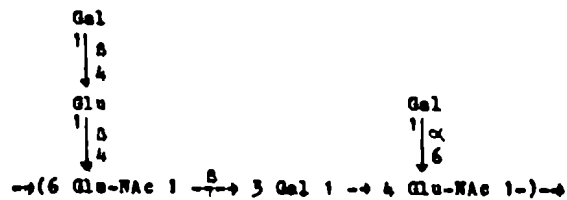
S. pneumoniae tipo 11 A.- (78)



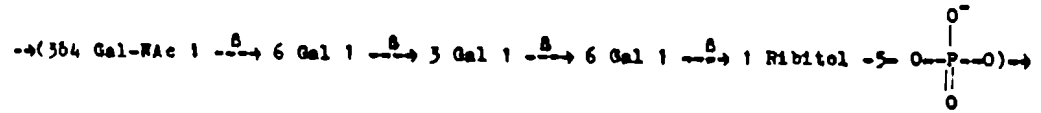
S. pneumoniae tipo 13.- (79)



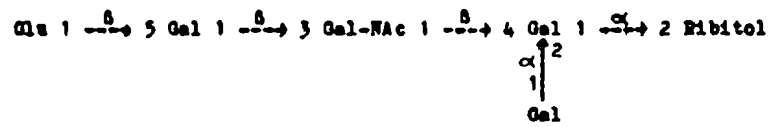
S. pneumoniae tipo 14.- (80)



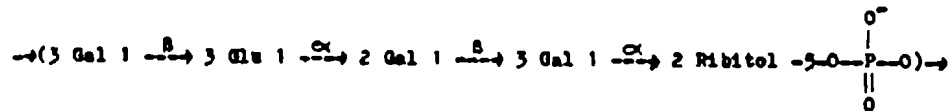
S. pneumoniae tipo 29.- (81)



S. pneumoniae tipo 33 B.- (82)



S. pneumoniae tipo 34.- (83) (84) (85) (86)



Nota: Algunos polímeros extracelulares poseen unidades repetitivas ligadas entre sí por uniones fosfodiésteres, tales polisacáridos podrían ser clasificados como ácidos teicoicos.

1.6. Lípido-fosfo-azúcares descriptos hasta el momento

Nos vamos a referir en la tabla siguiente a los lípido-fosfo-azúcares descriptos hasta el momento en bacterias (Tabla 2). La letra que figura al lado de cada compuesto significa lo siguiente:

- a) Lípidos que han sido identificados como prenoles por espectro de masa.
- b) Lípidos que han sido identificados como prenoles por cuanto su formación se activa por el agregado de P-prenol exógeno.
- c) Este grupo es un poco más ambiguo; se incluyen en él aquellos compuestos que tienen las propiedades químicas de los prenil-fosfo-azúcares descriptos, pero cuya fracción lipídica no ha sido estudiada con mayor detalle.

Tabla 2: Lípido-fosfo-azúcares descriptos en procariotes.

<u>Lípido</u>	<u>Fuente</u>	<u>Referencia</u>
P-man	Micrococcus lysodeikticus a)	(54)
	Mycobacterium tuberculosis a)	(87)
	Mycobacterium smegmatis a)	(88 - 89)
	Mycobacterium smegmatis b)	(90)
	Halobacterium salinarium c)	(91)
P-glu	Salmonella a)	(40, 92 - 93)
	Shigella flexneri b)	(94)
	Mycobacterium smegmatis b)	(90)

	Bacillus licheniformis c)	(48, 3)
	Mutante de E. coli c)	(96)
	Halobacterium salinarium c)	(91)
P-gal	Acetobacter xylinum b)	(97-98)
P-gluNAc	Streptococcus sanguis c)	(99)
	Bacillus cereus a)	(100)
P-gluNAc-ram	Streptococcus sanguis c)	(99)
P-gluNAc-ram-glu	Streptococcus sanguis c)	(99)
P-neuNAc	E. coli a)	(101)
P-P-gal	Salmonella newington a)	(31)
	Salmonella typhimurium c)	(2, 102)
	Aerobacter aerogenes a)	(52)
P-P-glu	Klebsiella aerogenes b)	(55, 103)
	Acetobacter xylinum c)	(97)
P-P-gli	Bacillus licheniformis c)	(48)
P-P-gluNAc	Staphylococcus lactis c)	(104, 47)
	Bacillus subtilis c)	(105)
	Halobacterium salinarium a)	(91)
	Bacillus cereus a)	(100)
P-P-(gluNAc) _{n=4} ₌₆	Bacillus subtilis c)	(105)

P- δ -P-P-(man) ₂	<i>Mycobacterium smegmatis</i> a)	(90)
P-P-cel	<i>Acetobacter xylinum</i> c)	(97)
P-P-maltosa	<i>Acetobacter xylinum</i> c)	(106)
P-P-gal-ram	<i>Salmonella newington</i> a)	(31)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	(102)
P-P-gal-man	<i>Aerobacter aerogenes</i> a)	(52)
P-P-glu-gal	<i>Klebsiella aerogenes</i> b)	(55, 103)
P-glu-P-gli	<i>Bacillus licheniformis</i> c)	(48)
P-P-gluNAc-P-gli	<i>Staphylococcus lactis</i> c)	(104, 47)
P-P-gal-ram-man	<i>Salmonella newington</i> a)	(31)
	<i>Salmonella typhimurium</i> c)	(3, 102)
P-P-gal-man-glnico	<i>Aerobacter aerogenes</i> a)	(52)
P-P-gal-ram-man- -(abe)	<i>Salmonella typhimurium</i> c)	(3, 102)
P-P-gal-man-(glnico)- -gal	<i>Aerobacter aerogenes</i> a)	(52)
P-P-glu(glu ₂ , fuc ₃)	Mutante de <i>E. coli</i> c)	(96)
P-P-(gal-ram-man) _n	<i>Salmonella newington</i> a)	(31)
P-P-(gal-ram-man (abe)) _n	<i>Salmonella typhimurium</i> c)	(3, 102)

P-P-pentapéptido-murNAc	Micrococcus, Staphylococcus	(107)
P-P-hexapéptido-murNAc-gluNAc	Micrococcus	(108)
P-P-decapéptido-murNAc-gluNAc	Staphylococcus	(109)

1.7. Lípidos intermediarios en la síntesis de glicoproteínas en bacterias

Actualmente es muy conocido el "rol" de los lípidos intermediarios en la síntesis de glicoproteínas en eucariotes. En bacterias no existe ningún caso donde esté perfectamente demostrado que los lípidos intermediarios estén involucrados directamente en la síntesis de una glicoproteína.

Strominger y col. (89) trabajando con *Halobacterium salinarium* describieron la síntesis "in vitro" de manosa-P-lípido, glucosa-P-lípido y Nacglu-P-P-undecaprenol.

El *Halobacterium salinarium* es una bacteria Gram positiva que no posee mureína ni otros polisacáridos típicos de pared de los organismos procariotes. La envoltura del género *Halobacterium* posee una glicoproteína que representa el 50% de las proteínas de envoltura y el total de azúcares no unidos a lípidos de la misma.

La estructura propuesta para dicha glicoproteína es la siguiente (Fig.13). (110)

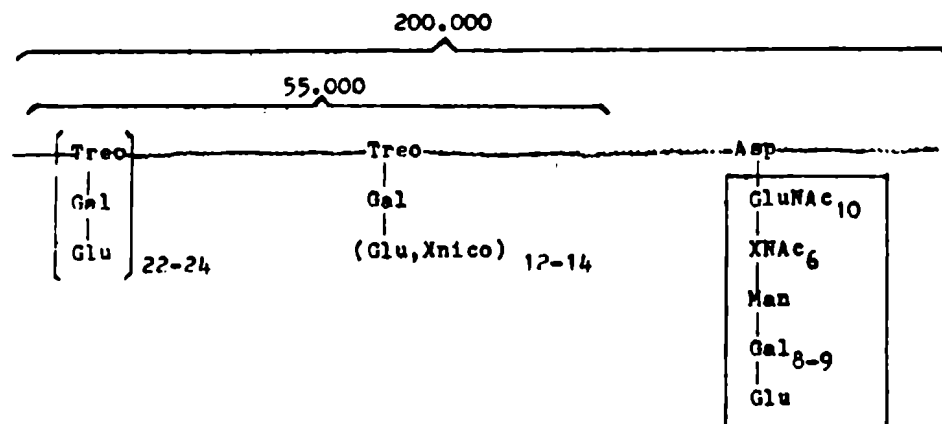


Figura 13: Esquema de la principal glicoproteína de *H. salinarium*.

Strominger y col. sugieren que el oligosacárido unido a asparragina pudiera sintetizarse sobre un P-P-undecaprenol y luego transferirse a la proteína como sucede en eucariotes. A pesar de haber sintetizado los azúcares-P-lípido nombrados, no se pudo lograr en dichos experimentos incorporación de azúcares a glicoproteínas. Esto puede haberse debido a la baja cantidad de aceptores endógenos polipeptídicos o a que el oligosacárido se transfiera en bloque a partir del P-P-undecaprenol, en cuyo caso habría que conocer el aminoazúcar que entra luego de las Nacglucosaminas para incubar en presencia del nucleótido-azúcar correspondiente.

Un hecho que refuerza la idea de que los lípido-azúcares intervendrían en la síntesis de dicha glicoproteína es que las bacterias no crecen en presencia de bacitracina. Se sabe que dicho antibiótico bloquea el ciclo de los lípidos intermediarios pegándose sobre el P-P-prenol e impidiendo la formación de P-prenol

(42 - 43)

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry, no matter how small, should be recorded to ensure the integrity of the financial data. This includes not only sales and purchases but also expenses and income. The document provides a detailed list of items that should be tracked, such as inventory levels, accounts payable, and accounts receivable. It also outlines the procedures for recording these transactions, including the use of double-entry bookkeeping to ensure that the books balance.

The second part of the document focuses on the analysis of the financial data. It explains how to calculate key financial ratios and metrics, such as the gross profit margin, operating profit margin, and return on investment. These metrics are used to evaluate the company's performance and identify areas for improvement. The document also discusses the importance of comparing the company's performance to industry benchmarks and providing a clear explanation of any variances.

The final part of the document covers the preparation of financial statements. It provides a step-by-step guide to creating the income statement, balance sheet, and cash flow statement. It also discusses the importance of auditing the financial statements to ensure their accuracy and reliability. The document concludes with a summary of the key findings and recommendations for the future.

2. ANTECEDENTES RECIENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

2.1. Antecedentes

En nuestro laboratorio se ha investigado en varios sistemas la presencia de prenil-fosfo-azúcares y la función que desempeñan.

El *Acetobacter xylinum* es una bacteria Gram negativa de la familia Pseudomonadaceae, que se caracteriza por excretar una película mucosa, que flota sobre los medios de cultivo en reposo, constituida fundamentalmente por celulosa (111).

Pareció interesante, entonces, investigar si los prenil-fosfo-azúcares desempeñan alguna función en la biosíntesis de este tipo de polisacáridos. Utilizando preparados enzimáticos de esta bacteria en presencia de UDP (^{14}C) glucosa como nucleótido dador se observó la incorporación de (^{14}C) glucosa a un glucano soluble en agua y a los siguientes compuestos lipofílicos cuya estructura se pudo establecer con claridad (97):

- a) Galactosa-P-prenol. (El preparado enzimático contenía UDPgal 4 epimerasa).
- b) Glucosa-P-P-prenol.
- c) Celobiosa-P-P-prenol.

Ocasionalmente se aisló también otro compuesto que se caracterizó como trisacárido-P-P-prenol. Se sintetizaba en condiciones

que no fue posible controlar, en muy pequeña cantidad y sólo con algunas preparaciones enzimáticas.

Se creyó en un primer momento estar ante la presencia de un celotriosa-P-P-prenol posible intermediario en la síntesis de la celulosa, pero los estudios estructurales demostraron que no era dicho compuesto. Se pudo demostrar eso sí que el extremo reductor del "trisacárido" estaba constituido por celobiosa.

Por otra parte utilizando el mismo sistema enzimático de *Acetobacter xylinum* y UDP (^{14}C)glucurónico como sustrato radioactivo se observó la formación de dos compuestos diferentes pero ambos con la labilidad en medio ácido suave ($\text{pH}=2$, 10', 100°C), característica de los lípidos intermediarios.

Uno de ellos de propiedades lipofílicas, soluble en butanol y en $\text{CCl}_3\text{H}/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1, se lo llamó "lípidio glucurónico"; se le estudiaron algunas de sus propiedades pero no se pudo establecer su estructura y función.

El otro de los compuestos presentaba algunas propiedades que hicieron parecer interesante su estudio. Se extraía con butanol de la mezcla de incubación pero se disolvía también en el agua que rutinariamente se utilizaba para lavar los extractos butanólicos. Esta propiedad hizo que pasara inadvertido en los primeros estudios. Analizado más detalladamente (cromatografías en DEAE-celulosa, cromatografías en geles del producto de la hidrólisis ácida, labilidad al medio básico con liberación de un presunto oligosacárido-P-cíclico, etc.) surgió la posibilidad de estar ante un

oligosacárido-P-P-prenol. Se encontró casi enseguida que un compuesto con propiedades análogas se podía obtener con marca en glucosa a partir de UDP(^{14}C)glucosa y que su formación se incrementaba notablemente en presencia de UDPglucurónico no radioactivo.

Los intentos para demostrar incorporación de (^{32}P) ya fuera a partir de UD(^{32}P)glucosa como de UD(^{32}P)glucurónico resultaron infructuosos.

Se pensó entonces que tanto la glucosa como el ácido glucurónico se incorporaba a partir de sus respectivos nucleótido-azúcares a un compuesto preexistente en la preparación enzimática, es decir un aceptor endógeno, para formar un compuesto del tipo oligosacárido-P-P-lípido.

2.1.1. Formación de exopolisacáridos

La caracterización de lípido-azúcares derivados del ácido glucurónico estimuló la búsqueda de polisacáridos que contuvieran a este último.

Siguiendo un esquema clásico para el aislamiento de polisacáridos capsulares (112) se pudo obtener material con dichas características, a partir de zoogreas, muy ricas en celulosa, formadas en los cultivos de *A. xylinum*

Por cromatografía en DEAE-celulosa de un preparado crudo se obtuvieron tres fracciones, una neutra α y dos cargadas β y δ (Fig. 14).

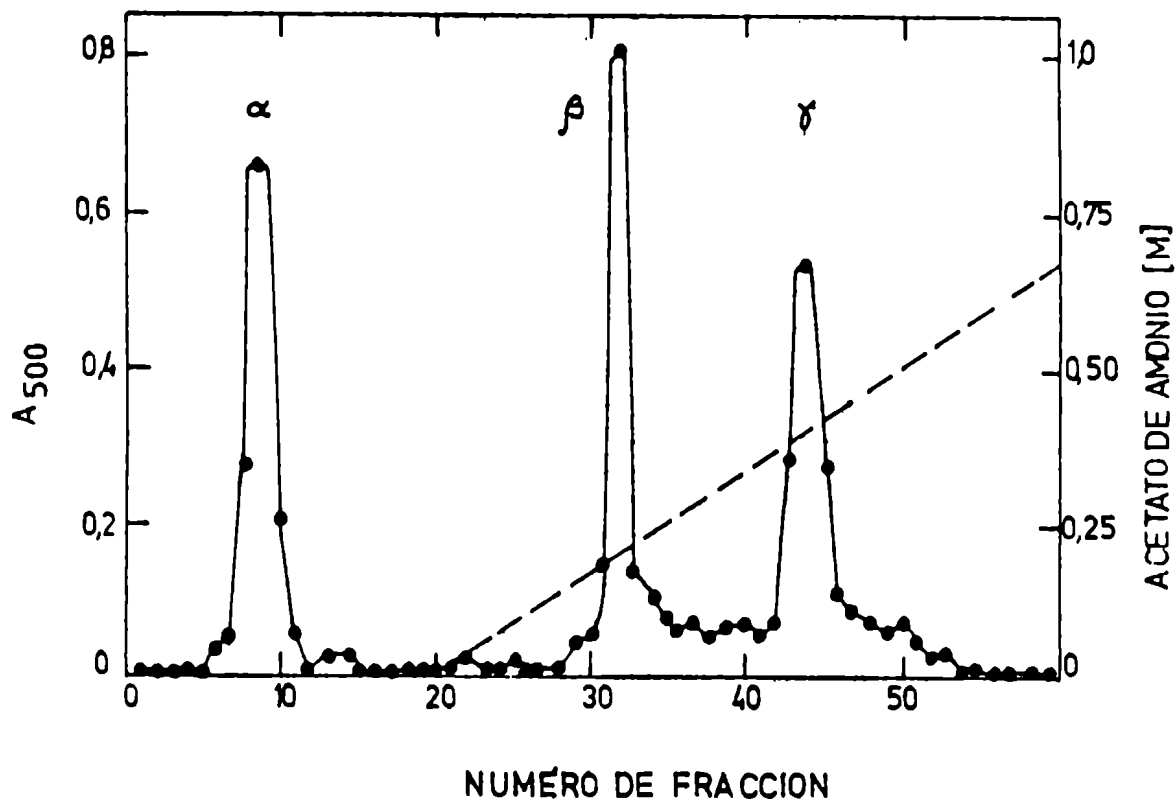


Figura 14: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de polisacáridos producidos por *Acetobacter xylinum* B12: Se utilizaron 90mg del producto crudo liofilizado. La columna de 1,2 x 60cm, sin refrigeración, se eluyó con un gradiente lineal (600ml) de 0 a 1M de acetato de amonio en agua. Se colectaron fracciones de 6ml y se dosaron azúcares sobre alícuotas por el método de fenol-sulfúrico (113).

La composición cualitativa de los polisacáridos aislados, se estudió mediante hidrólisis ácida y análisis cromatográfico electroforético en papel de los monosacáridos resultantes. En la siguiente tabla se resumen estos estudios.

Tabla 3: Composición cualitativa de los polisacáridos aislados por cromatografía en DEAE-celulosa.

Azúcar	Fracción			
	α_1	α_2	β	γ
glucosa	+	++	+	++
manosa	++	+	++	+
ramnosa	+		-	+
ácidos urónicos			+	+
ácidos aldónicos	-		?	?

Las fracciones α_1 , α_2 , β y γ fueron sometidas por separado a hidrólisis ácida total, y las monosas que las constituyen identificadas por cromatografías y electroforesis en diversos solventes.

El pico α de la columna de DEAE-celulosa se fraccionó en dos al someterlo a una precipitación con Cu^{++} que se utiliza para insolubilizar mananos (114) obteniéndose un precipitado α_1 y un sobrenadante α_2 que se analizaron por separado.

La carga negativa de las fracciones β y γ quedó justificada por la presencia de ácidos urónicos. Uno de ellos fue caracterizado como ácido glucurónico pero no se pudo establecer la identidad del otro u otros.

2.2. Objetivos

En vista del panorama que detallamos someramente, uno de los primeros objetivos fijados fue ver si existía alguna relación entre los lípido-azúcares ya identificados pues no estaba claro el destino del celobiosa-P-P-prenol ni la estructura completa del "trisacárido".

Por otra parte teniendo en cuenta que por lo menos dos de los exopolisacáridos aislados contenían ácidos urónicos, pareció interesante vincular al presunto lípido-oligosacárido que incorporaba ácido glucurónico con algunos de los mismos. Esta última tarea se podía encarar de varias maneras:

- a) Estudiar la incorporación a lípidos de los azúcares identificados en los exopolisacáridos.
- b) Estudiar la estructura de los lípido-oligosacáridos aislados.
- c) Estudiar la estructura de los exopolisacáridos β y γ y su posible relación con los lípido-azúcares caracterizados.

Esto último no se detalla en el desarrollo de esta Tesis porque el mismo fue encarado en nuestro laboratorio especialmente por Luis Ielpi.



3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Cultivo de bacterias y preparación de enzimas

3.1.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo fue el de Hestrin y col. (115) que contiene:

	(% p/v)
Glucosa	2.0
Peptona (Difco u OCEFA)	0.5
Extracto de levadura (Difco o Yeast Product Inc.)	0.5
Fosfato disódico anhidro	0.27
Acido cítrico con 1 mol de agua	0.115

3.1.2. Condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa de *Acetobacter xylinum* NRRL B42 cultivada en forma estática a 30°C durante 48 horas en frascos de Roux de 1 litro que contenían 200 ml de medio. Las siembras se hicieron con 20 ml del líquido infranadante de un cultivo de 48 horas. En estas condiciones se forma sobre el medio de cultivo una película que consiste principalmente en celulosa y que contiene en su interior a la mayoría de las células, no obstante, el líquido infranadante

contiene también células y se lo puede usar como cultivo iniciador.

La cepa de *Acetobacter xylinum* NCIB 8747, una mutante que no produce celulosa, se cultivó en el mismo medio y a la misma temperatura pero con agitación (200 RPM) en erlenmeyers de hasta 2 litros ocupados en 1/5 de su capacidad. En estas condiciones el tiempo de duplicación de las células 8747 fue de aproximadamente 2 horas. El mismo medio adicionado de un 5% de agar se utilizó para conservar a 4°C, cultivos de 48-72 horas de ambas cepas. Se hicieron repiques cada 2 ó 3 meses.

3.1.3. Obtención de células con la cepa B12

Se siguió la técnica de Hestring y col (115) ligeramente simplificada. Todas las operaciones se realizaron a temperaturas no mayores de 4°C.

Con la ayuda de una varilla de vidrio se retiraron las películas de los frascos de Foux y se lavaron en grupos de 4 con 200 ml de buffer 0.01 M fosfato-citrato ph=6 (buffer de lavado). Se repitió el lavado y luego las 4 zoogreas se colocaron en una licuadora común, se completó el volumen total a 500 ml con el buffer de lavado, y se homogeneizó durante un minuto a velocidad máxima.

A continuación se filtró a través de tela para quesos para quitar la celulosa, y el filtrado, que contenía las células; se centrifugó a 6.100 x g (6.000 RPM) 15 minutos. El sobrenadante obtenido se usó como fuente de polisacáridos α , β y γ . El precipitado se resuspendió en el mínimo de buffer de lavado y centrifugó a

12.000 x g (10.000 RPM) 5 minutos. Esta operación de lavado y centrifugación se repitió otra vez. Las células se conservaron a - 20°C o se procesaron como se señala en "Preparación de enzimas".

Las bacterias de la cepa 8747, que como se indicó no producen celulosa, se cosecharon centrifugando a 8.340 x g (7.000 RPM) 15 minutos y luego se lavaron con el buffer de lavado en la misma forma señalada para el caso de la cepa B42.

3.1.4. Preparación de enzimas

Se utilizaron varios preparados enzimáticos:

a) Células tratadas con EDTA (97). Las bacterias lavadas se resuspendieron en buffer 0.01 M EDTA-Tris pH=8 en una proporción de 2.5 ml de buffer por litro de medio de cultivo y luego se congelaron. Cuando fue necesario usarlas (en condiciones después de un año) se descongelaron y volvieron a lavar 4 veces con 2 volúmenes de buffer EDTA-Tris pH=8. Luego se resuspendieron en 1 volumen del mismo buffer y se volvieron a congelar. Este preparado enzimático conserva su actividad por varios meses.

b) Particulados obtenidos con el desintegrador de Nossal. Normalmente se usó la siguiente proporción de sustancias:

0.5 gramos de células húmedas.

2.5 gramos de ballotini (5 micrones).

5.0 ml de buffer 0.07M Tris-HCl pH=8.2.

La operación se realizó a - 10°C en un tiempo total de 4.5 minutos divididos en tres períodos iguales de 1.5 minutos, con intervalos de 1 minuto. El material resultante se centrifugó a 480 x g

durante 5 minutos para eliminar los ballotini y células sin romper.

El sobrenadante de 480 x g se centrifugó a 30.000 x g 45 minutos obteniéndose un precipitado que se resuspendió en 0.6 ml de buffer 0.07M Tris-HCl pH=8.2. Este preparado mantenido a - 10°C conserva su actividad durante varios meses.

3.2. Sistemas de incubación

3.2.1. Incubación estandard

Las incubaciones se realizaron normalmente a 30°C durante 30 minutos. La mezcla de incubación estandard contenía:

Buffer Tris HCl 0.1M pH=8.2	5 umoles
Cl ₂ Mg	0.6 umoles
NDPazúcar	tipo de nucleótido y cantidad indicada en cada caso
Enzima	300-400 ugr
Volúmen total	70 ul

En reiteradas oportunidades con fines preparativos se utilizó la mezcla estandard en una escala mayor, en cuyo caso se indica en las leyendas respectivas.

Cuando se incubó en presencia de FMP o DolMP, estos se llevaron a seco bajo N₂ en el tubo de incubación y luego de agregarles Tritón X-100 (la concentración se indica en cada caso) y buffer, se

agitaron vigorosamente en vortex para resuspenderlos bien. Recién entonces se completó la mezcla de incubación y se agregó la enzima.

Las reacciones se inactivaron con el agregado de butanol (método A) o EDTA (método B).

3.2.1.1. Método A.- A la incubación standard se añadió 0.1 ml de butanol, se agitó en vortex, se centrifugó y se separó la fase superior, orgánica. Esta extracción se repitió tres veces y los extractos combinados se lavaron tres veces con 0.1 ml de H₂O cada vez. Finalmente se tomaron alícuotas de las fracciones butánolicas y acuosas para determinar la radioactividad.

Utilizando esta metodología el butanol saturado en H₂O extrae muy bien monosacárido-P-lípidos y azúcar-P-P-lípidos con una a tres o cuatro hexosas. Los azúcar-P-P-lípidos con cuatro a siete hexosas (uno de los cuales es ácido glucurónico) se extraen parcialmente en la fase butánolica y pasan al H₂O con suficientes lavados. Esta fracción ha sido analizada en algunas ocasiones a lo largo de los estudios y se referirá a ella como "lavados acuosos del butanol".

La incorporación de radioactividad a polisacáridos se determinó tratando el material insoluble en butanol 3 veces con 0.50 ml de una solución H₂O/CH₂OH 5/1. El sobrenadante se cromatografió en solvente G para separar sustancias hidrosolubles de alto peso molecular, que quedan en el origen del cromatograma, del exceso de sustrato radioactivo de movilidad mayor. La zona del origen de cada

uno de los cromatogramas se cortó para medir radioactividad. El material insoluble en H_2O/CH_3OH 5/1 también se contó.

3.2.1.2. Método B. - La reacción standard se detuvo anadiendo 50 μ l de 0.025M de EDTA y 2 ml de Tris-HCl 70mM; se agitó en vortex, se centrifugó 10 minutos a 8.000 RPM, se descartó el sobrenadante, y al precipitado se lo lavó dos veces más con 2 ml de Tris-HCl 70mM cada vez. Estos lavados eliminan los nucleótidos que no reaccionaron y sus productos de ruptura que son muy hidrosolubles.

El "pellet" se extrajo tres veces con 0.1 ml de butanol y tres veces con 0.1 ml de solvente 1,2,0.3.

El butanol extrae los lípido-azúcares menos polares. El solvente 1,2,0.3 extrae todos los lípido-azúcares descriptos. En muchas oportunidades se combinaron ambos extractos en cuyo caso se lo llamó "extracto B".

Nota: En este método se utiliza butanol seco y no saturado con agua como en el método A.

3.2.2. Incubación en dos etapas

3.2.2.1. Método C. - Se utilizó este procedimiento cuando se deseaba incubar con diversos nucleótido-azúcares en forma sucesiva y no conjunta. Se incubó en una primera etapa con los sustratos correspondientes, se detuvo la reacción con 1.25 μ moles de EDTA y se prosiguió con el procedimiento de lavado del método B. El "pellet" lavado se resuspendió en buffer Tris-HCl 70mM pH=8.2 y Cl_2Mg manteniendo las concentraciones iniciales, se agregaron los nucleótido-azúcares correspondientes y se incubó nuevamente en las condiciones

indicadas en cada caso. Se inactivó la reacción y se procesó ya sea por el método A o por el método B. Nos referiremos al método como C₁ o C₂, respectivamente, de acuerdo a cuál de ambos procedimientos se haya adoptado en cada caso particular.

3.2.3. Incubación utilizando lípido-azúcares como sustratos exógenos

La solución de azúcares-P-P-prenol en butanol, se llevó a casi sequedad bajo corriente de N₂, se agregó 0.1 ml de agua y se volvió a repetir el procedimiento tres veces más. Luego de la última operación quedaron en el tubo aproximadamente 10 ul de agua; se agregó el buffer, Cl₂Mg, etc. y la cantidad de Tritón X-100 que se indica en cada caso, se resuspendió repetidamente con vortex y finalmente se agregó la enzima.

Este procedimiento se llevó a cabo de esta manera para eliminar el solvente orgánico sin llevar a sequedad, con el fin de evitar la ruptura del lípido-azúcar.

3.3. Tratamientos degradativos

3.3.1. Hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares

Se realizó de dos maneras.

a) A las muestras en butanol, se les agregó un volumen de metanol, cuatro volúmenes de agua y ácido hasta una concentración final de 0.01N. Se obtuvo así una sola fase. Este procedimiento evita la ruptura que experimentan algunos compuestos cuando se los lleva a seco (97). Luego se calentó a 100°C, 10 minutos, se enfrió y añadió butanol para separar las fases orgánica y acuosa. Finalmente se contaron alícuotas de ambas fases.

b) A las muestras en solvente 1,2,0.3 o en extracto B se las concentró bajo N₂ hasta casi sequedad, se agregó un volumen de butanol, un volumen de metanol, cuatro volúmenes de agua y ácido hasta una concentración final de 0.01N. Se calentó luego a 100°C, 10 minutos. Se llevó a seco bajo presión reducida, se resuspendió dos veces con 50 ul de agua llevando a seco cada vez bajo presión reducida (este procedimiento se realiza para eliminar el HCl). Finalmente se resuspendió en agua y se contó una alícuota.

3.3.2. Hidrólisis parciales de oligosacáridos

Las muestras llevadas a seco bajo N₂ o presión reducida se disolvieron en HCl 0.1N + una punta de espátula de resina Dowex 50 x 8 (116). Los tubos se cerraron a la llama y se calentó a 100°C por el tiempo que se indica en cada caso. Se enfrió, y luego de abrir el tubo, se pasó el sobrenadante a otro tubo con la ayuda de una pipeta Pasteur.

La resina se lavó dos veces con 100 ul de agua y los lavados se unieron a la fase acuosa inicial. El extracto acuoso combinado se llevó a seco bajo presión reducida, se tomó dos veces con 50 ul de agua, llevando a seco cada vez bajo presión reducida. Finalmente se disolvió en agua y se contó una alícuota.

Otras condiciones de hidrólisis ácida sobre distintos compuestos se indican en cada caso.

3.3.3.Reducción catalítica

Se hizo en la forma descrita por Wright y col. (3) con ligeras modificaciones. El Pt se preparó a partir de una solución acuosa de hexacloroplatinato de amonio y exceso de NaBH_4 . El precipitado de Pt metálico se lavó con agua y con butanol saturado en agua.

La muestra disuelta en butanol se añadió sobre el Pt, se agitó para resuspenderlo y se burbujó H_2 por espacio de 4 horas con intensidad suficiente como para mantener el Pt en suspensión. Se centrifugó, quitó el butanol, y el Pt se lavó sucesivamente con butanol y agua. Las fracciones butanólicas se combinaron y lavaron con agua y todas las fases acuosas se reunieron. Finalmente se contaron alícuotas de ambas fases.

3.3.4.Tratamiento con fenol

Este tratamiento se efectuó tal como lo describen García y col. (97). En general las muestras se llevaron a seco, se les agregó 0.160 ml de fenol al 50% y se trataron a 68-70°C durante los tiempos indicados en cada caso. Se enfriaron y centrifugaron para separar las fases acuosa y fenólica. La fase fenólica se lavó 3 veces

con 0.060 ml de agua. Estos lavados acuosos se combinaron con la fase acuosa y se lavaron 3 veces con éter etílico para eliminar el fenol.

La fase fenólica se llevó a seco agregando éter etílico varias veces y evaporando con corriente de N_2 cada vez. Se contaron alícuotas de ambas fases.

3.3.5. Tratamiento alcalino del lípido glucurónico.

Se realizó sobre el material según la técnica de Kennedy para fosfolípidos (117), con ligeras modificaciones. Se tomó la muestra en butanol (0.250 ml) y se agregó 1 ml de CCl_3H , 0.5 ml de CH_3OH y 0.010 ml de NaOH 10N. Se agitó con vortex y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron luego 0.5 ml de agua, agitó bien y centrifugó. Se removió la fase superior (acuosa), y se volvió a extraer la fase inferior con 0.5 ml de agua. Los extractos acuosos combinados, se pasaron por una columna de resina Dowex 50 x 8 previamente tratada con piridina y lavada con agua. Se contó la radioactividad en alícuotas de las fases clorofórmica y acuosa: en la primera queda el compuesto sin hidrolizar y en la segunda productos de ruptura del compuesto o los derivados deacilados en el caso de los fosfolípidos.

3.3.6. Acetólisis.

La mezcla acetilante contenía 0.5 ml de ácido acético glacial, 0.5 ml de anhídrido acético y 0.050 ml de ácido sulfúrico concentrado (118).

La muestra llevada a seco se disolvió en 0.25 ml de mezcla ace-

tilante, se cerró el tubo a la llama y se dejó dos horas a 55°C. Luego se agregó 1 ml de piridina anhidra y se concentró bajo corriente de N₂ hasta 0.3 ml. Se repitió la operación tres veces llevando en la última el material hasta casi seco (quedó un residuo de característica siruposa). Se dejó durante una noche en desecador, se le agregó 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, se agitó bien y se extrajo la fase superior (acuosa).

El cloroformo se lavó con 1 ml de agua varias veces (aproximadamente 7) hasta que los lavados fueron neutros. El cloroformo lavado se llevó a seco. Se agregaron 0.2 ml de CH₃OH y 0.060 ml de metóxido de sodio (25 mg de Na en 5 ml de metanol) y se dejó 10 minutos a 30°C. Se finalizó la reacción mediante el agregado de resina Dowex 50 x 8 hasta que se observó neutralidad frente al colorante Azul de Bromotimol. Se centrifugó, se pasó el sobrenadante a otro tubo, se lavó la resina dos veces con 0.025 ml de agua y se combinaron los sobrenadantes. Este extracto combinado contenía los productos de acetólisis, desacetilados.

3.3.7. Oxidación con periodato.

Se realizó la oxidación con periodato en las condiciones descritas por Feles (119). La muestra se disolvió en 0.1 ml de agua, se le agregaron 0.1 ml de metaperiodato de sodio y se dejó 48 horas a 4°C; posteriormente se le agregaron 10 ul de etilenglicol y se dejó 1 hora a temperatura ambiente.

La muestra se analizó como se indica en cada caso. Para determinar la formación de ácido fórmico se la sometió a electroforesis

en papel para separarlo del resto de las moléculas radioactivas; 0.050 ul de la solución se sembraron en una tira de papel Whatman N° 1 de 2.5 x 22 cm, a 7 cm de uno de los extremos. Se tuvo cuidado especial en evitar que se secase el papel, previamente embèbido en buffer Tris-HCl 0.1M, pH= 7.8. La electroforesis se realizó a 4° C con una corriente constante de 2 mAmp por tira de papel durante 40 minutos, luego de lo cual los papeles fueron secados a temperatura ambiente, cortados en tiras de 1 cm y contados.

3.3.8. Hidrólisis alcalina (120) (121).

La muestra llevada a seco se disolvió en 0.45 ml de propanol + 0.05 ml de NaOH 1M y se dejó 30 minutos a 65°C. Se enfrió el tubo, se neutralizó la solución mediante el agregado de 0.5 ml de AcOH 0.1M y se agregó posteriormente 1 ml de H₂O y 5 ml de Cl₃CH/CH₃OH 2/1. Se agitó con vortex, se centrifugó y se formaron dos fases; se removió la fase superior (acuosa) y la fase inferior se reextrajo con Cl₃CH/CH₃OH/H₂O 3/48/47. Se repitió el procedimiento de agitación y centrifugación y la fase superior resultante se extrajo y unió con la primera.

3.4. Tratamientos enzimáticos

3.4.1. Fosfatasa alcalina (E. coli de Sigma).

Se incubaron 2 ul (de una suspensión de la enzima en SO₄NH₄ 2.5M) en buffer 0.1M Tris-HCl pH= 3.2 en un volumen total de 100 ul a 30°C durante 120 minutos.

3.4.2. β -glucosidasa.

Se utilizó una emulsina de almendras (β -glucosidasa Worthington Biochemicals Co) en una concentración final de 5mg/ml en buffer 0.1M AcONa, pH= 4.7 en un volumen total de 50 ul. Incubando de 3 a 6 horas se degradó totalmente la celobiosa mientras que el celobitol permaneció inalterado; asimismo en dichas condiciones se tuvo actividad de α y β manosidasa y trazas de α -glucosidasa (probadas sobre los p-nitro-fenil-glicósidos correspondientes). Incubando en las mismas condiciones pero durante 20 minutos la celobiosa se hidrolizó parcialmente mientras que la maltosa no fue atacada.

3.4.3. α -glucosidasa.

Se utilizó una α -glucosidasa de levadura (Boheringer) en una concentración final de 8 mg/ml en buffer imidazol-HCl, pH= 7, 10. μ moles en 50 ul. Incubando 2 horas a 37°C se degradó parcialmente la maltosa mientras que la celobiosa permaneció inalterada.

3.4.4. α -manosidasa.

Se utilizó una α -manosidasa de "Jack bean" purificada hasta la etapa de la columna de DEAE-celulosa (122) (cedida gentilmente por Roberto Staneloni) en buffer 0.08M trietilamina acetato, pH= 5 durante 14 horas a 37°C. En estas condiciones el p-nitro-fenil-manósido se hidrolizó en 30 minutos.

3.4.5. β -glucuronidasa.

Se utilizó una β -glucuronidasa bovina, 17.4 unidades en buffer 0.1M de AcONa, pH= 4.5. en un volumen total de 100 ul. Se incubó a

37°C el tiempo indicado en cada caso. Cuando se utilizó fenoftalein-βglucuronido como sustrato, se midió la liberación de fenoftaleina agregando a la mezcla de reacción un volumen igual de buffer glicina pH=10.45 y 0.05 volúmenes de etanol 80%. El color rojo que desarrolla la fonoftaleina en medio básico puede medirse espectrofotométricamente a 540nm.

Una unidad de β-glucuronidasa se define como aquella que libera 1 μ de fenoftaleina en 1 hora a pH=4.5 en las condiciones mencionadas (123).

Nota: Cuando se utilizaron como sustratos de las enzimas los p-nitro-fenil-glicósidos correspondientes, se midió la acción de las mismas por el desarrollo de color amarillo en la mezcla de reacción. El agregado de CO₃Na 2% intensifica dicha coloración.

3.5. Cromatografías

3.5.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

3.5.1.1. DEAE-celulosa para soluciones lipofílicas.- Se utilizaron dos tamaños distintos de columnas siguiendo en ambos casos técnicas similares: a) y b).

a) Cromatografía en columna de 0.8 x 20 cm: fueron utilizadas sin refrigeración. Se lavaron con 50 ml de CH₃OH 99% y luego se eluyeron en forma discontinua utilizando concentraciones crecientes de AcONH₄; 0.1M (12 ml), 0.2M (12 ml), 0.3M (12 ml), y 0.4M (12 ml). Se colectaron fracciones de 3 ml.

b) Cromatografía en columnas de 1,2 x 60 cm: se utilizaron con refrigeración. Fueron desarrolladas según el método de Rouser y col. (124), modificado por Dankert y col. (30). La elución se hizo con un gradiente lineal de 0 a 2M de AcONH_4 en metanol 99%. Las fracciones colectadas fueron de 3 ml.

3.5.1.2. DEAE-celulosa para soluciones acuosas.- La DEAE tratada con ácido, álcali y lavada, se resuspendió directamente en ácido acético 1M y se filtró y lavó para quitar el exceso de ácido.

Se utilizó una columna de 1.2 x 60 cm sin refrigeración. Se eluyó con un gradiente lineal (400 ml) de 0 a 0.4M de AcONH_4 en agua y se colectaron fracciones de 3 ml.

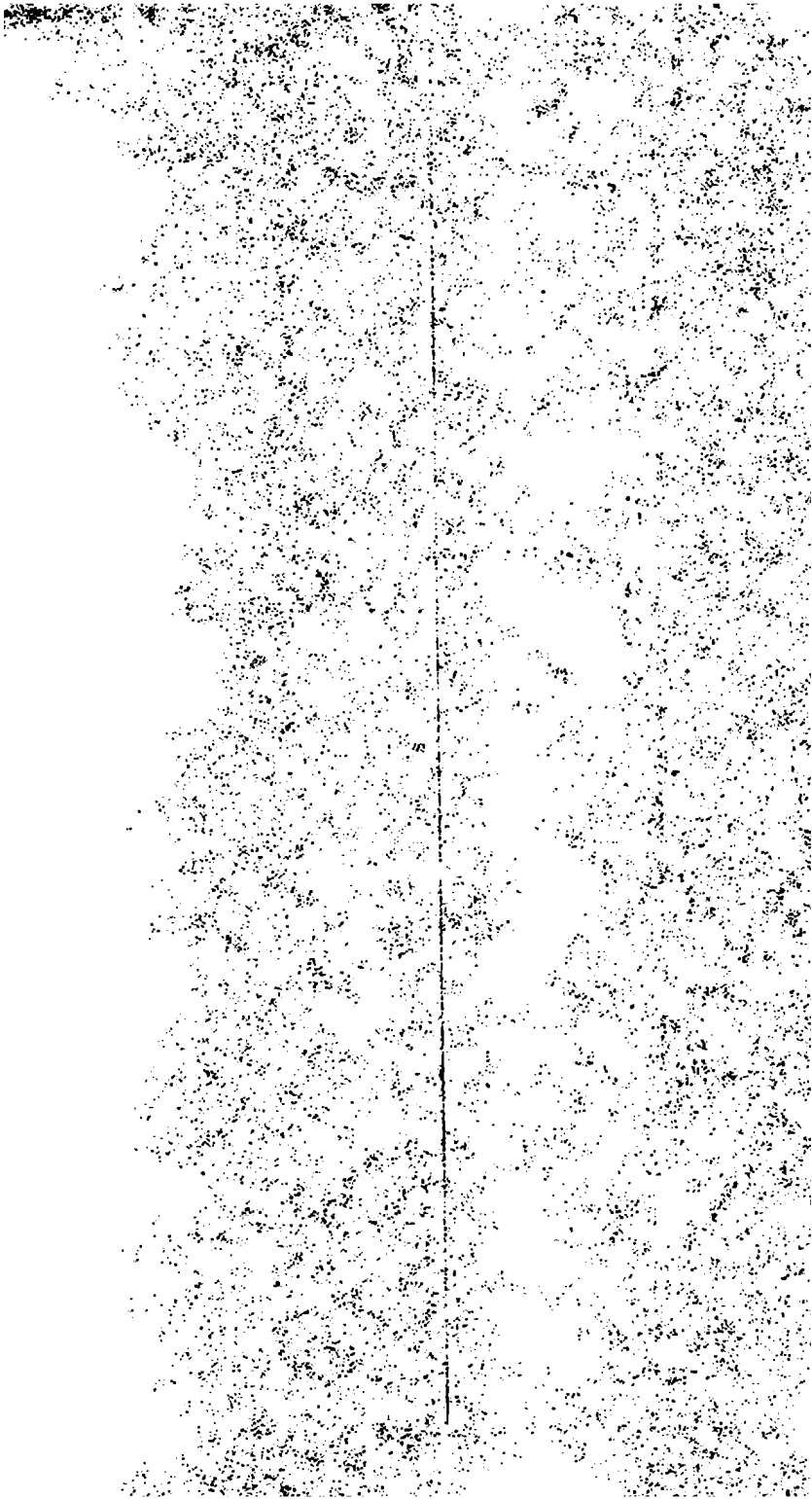
3.5.2. Cromatografía en columna de geles

Se utilizó Biogel P-2, 200-400 "mesh", en una columna de 126 x 1.5 cm (152 ml de volumen total) equilibrada con 0.02M Tris-HCl pH=7.

En cada corrida se utilizaron los siguientes marcadores no radioactivos: Dextrano azul (0.2 ml de una solución de 10 mg/ml), Cl_2Co (255 umoles), rafinosa (10 umoles), sacarosa (5 umoles), glucosa (20 umoles) y estaquiosa (2 umoles).

Los volúmenes de exclusión total y de inclusión total se determinaron por los volúmenes de elución del Dextrano azul y del Cl_2Co respectivamente.

El flujo de la columna se reguló en 1 gota/30 segundos, y se colectaron fracciones de aproximadamente 0.5 ml. Los volúmenes de elución de los azúcares no radioactivos se determinaron por el mé-



todo de fenol-sulfúrico (113) sobre alícuotas de 0.200 ml de cada tubo y leyendo D.O. a 490 nm. En algunos casos la identidad de los mismos, se determinó concentrando todos los tubos correspondientes a cada pico y cromatografiando una alícuota en solvente H. Se midió radioactividad en alícuotas de 0.2 ml de cada fracción.

Se utilizó también Sephadex G-10 (Pharmacia) en buffer 0.02M Tris-HCl pH=7 en una columna de 87 x 1.5 cm (111 ml de volumen total).

Se reguló el flujo en 1 gota/25 segundos y se recogieron volúmenes de 1.5 ml x tubo aproximadamente. Por lo demás se procedió de la misma manera descrita para la cromatografía en la columna de Biogel P-2.

3.5.3. Cromatografía y electroforesis en papel

Se utilizó papel Whatman N 1.

Solventes utilizados:

- C: Amoníaco 3M en etanol 80% (v/v). (97)
- D: Amoníaco 3M en etanol 70% (v/v). (125)
- E: Butanol-piridina-agua (6/4/3) (v/v). (126)
- F: Butanol-piridina-agua (4/3/4). (v/v). (127)
- G: Etanol-ácido acético-acetato de amonio 1M (75/26/4) (v/v).
(125)
- H: Isopropanol-ácido acético-agua (27/4/9) (v/v). (128)
- I: Acetato de piridina 1.2M, pH=6.5. (97)
- J: Molibdato de sodio 0.1M + ácido sulfúrico (C) c.s.p. pH=5.
(129)

K: Borato de potasio 0.05M, pH=9.2. (130 y 131)

L: Carbonato/bicarbonato de sodio 0.25M, pH=9.2. (132)

M: Etanol-acetato de amonio 1M (15/6) (v/v). (133)

N: Cloroformo-metanol-agua (1/1/0.3) (v/v).

O: Tris-HCl 0.1M, pH=7.8. (119)

Las electroforesis se efectuaron tal como lo señalan García y col. (97). Normalmente se aplicaron 1.000 volts (20 volts/cm) durante 180 minutos. Salvo indicación expresa esas fueron las condiciones en que se realizaron las electroforesis.

Para la ubicación de los azúcares reductores se utilizó el nitrato de plata alcalino (134). La ubicación de los nucleótidos AMP y UMP utilizados frecuentemente como standards en las electroforesis, se determinó por su absorvancia a la luz ultravioleta.

3.6. Medida de la radioactividad

La radioactividad en electroforogramas y cromatogramas en papel, se detectó con un radiocromatógrafo Packard modelo 7201.

Los compuestos radioactivos se midieron con soluciones de Bray (135) o con una mezcla que contenía 4 gramos de Omnifluor (New England Nuclear) en 1 litro de tolueno en contadores de centelleo Packard Tri-carb modelos 2002 y 2003.

La mezcla de Omnifluor en tolueno se utilizó para medir (^{14}C) en trozos de papel provenientes de cromatografías y/o electroforesis. Luego de contado cada papel se lavó tres veces con tolueno

para quitar el exceso de material de centelleo y tres veces con éter etílico para eliminar el tolueno y poder así eluir las sustancias medidas.

3.6.1. Contaje diferencial de radioactividad de (^{14}C) y (^3H) en una misma muestra

Para contar diferencialmente radioactividad de (^{14}C) y (^3H) en una misma muestra, se utilizaron las siguientes condiciones en dos canales distintos del Packard Tri-carb modelo 2003.

Canal A: ganancia 20%; ventana 300 ----- ∞

Canal B: ganancia 60%; ventana 50-250.

En el canal A, se obtuvo un 64% de las cpm de (^{14}C) y un 0.47% de las cpm de (^3H).

En el canal B, se obtuvo un 6.5% de las cpm de (^{14}C) y un 57% de las cpm de (^3H).

Los porcentajes fueron calculados respecto a la radioactividad obtenida con la mayor eficiencia para ambos isótopos, a saber:

(^{14}C): ganancia 25%; ventana 50 ----- ∞

(^3H); ganancia 60%; ventana 50 ----- ∞

3.7. Preparación de compuestos radioactivos

3.7.1. Obtención de α -nitro-fenil (^{14}C)glucurónico

Se utilizó como enzima una preparación de microsomas de hígado de vaca (cedida gentilmente por Clara Krisman) en la siguiente

mezcla

Buffer Tris-HCl 0.1M pH=8.2	5	umoles
Cl ₂ Mg	0.6	umoles
p-nitro-fenol	10	nmoles
UDP(¹⁴ C)glucurónico	700	pmoles

Microsomas de hígado

en un volumen total de 70 ul. Se incubó una hora a 30°C y se finalizó la misma mediante el agregado de 0.1 ml de butanol. Se centrifugó y se separó la fase superior, orgánica. Esta extracción se repitió tres veces y los extractos combinados se lavaron tres veces con 0.1 ml de agua cada vez. Se reunieron las fases acuosas y se cromatografiaron en solvente G. El p-nitro-fenil(¹⁴C)glucurónico posee en dicho sistema cromatográfico un R_f=0.8.

3.7.2. Obtención de UDP(¹⁴C)glucosa

Fué preparado por Susana Raffo a partir de glucosa uniformemente marcada (Amersham. Searle, 200-300 mCi/mmol de actividad), siguiendo la técnica descrita por Thomas (137) con diversas adaptaciones.

3.7.3. Obtención de UD(³²P)glucosa

Fué preparado por Susana Raffo a partir de (³²P)O_LH₃ (Amersham. Searle, sin portador). El procedimiento seguido se detalla a continuación:

10 mCi del mismo se colocaron en un tubo y se agregaron 250 nmoles de PO₄H₂⁻ no radioactivo, la mezcla se llevó a seco en un evapora-

dor rotatorio, se redisolvió en agua bidestilada y se repitió la operación dos veces más. Se agregaron al tubo los siguientes reactivos:

glucógeno	15	ul
UTP (50mM)	50	ul
Cl ₂ Mg (0.25M)	5	ul
Tris-HCl (0.5M pH=7.8)	12	ul
fosforilasa ¹ (20 mg/ml)	20	ul
pirofosfatasa inorgánica	0.5	unidades
UDPGlu ² pirofosforilasa	60	ul

en un volumen total de 170 ul y se incubó 1 hora 30 minutos a 37°C. Se paró la misma con el agregado de 1.5 volúmenes de etanol, se centrifugó y el sobrenadante se cromatógrafió en solvente G. Se eluyó con agua el material que co-cromatógrafió con UDPglu estándar (50%) y se cromatógrafió en solvente M. La radioactividad que co-cromatógrafió con UDPglu en este último sistema (100%) se eluyó con agua.

1. La UDPglu pirofosforilasa se preparó siguiendo la técnica de Albrecht (136) hasta la columna de DE'E-celulosa.

2. La fosforilasa se disolvió en buffer glicerofosfato 0.0025M pH=6.8, MSH 0.01M, EDTA 0.0005M.

3.7.4. Obtención de TDP(¹⁴C)glucosa

Fue preparado por Marta Eirin a partir de glucosa uniformemente marcada (Amersham. Searle, 200-300 mCi/mmol de actividad) siguiendo la técnica descrita por Robbins (30) (138) con las modificaciones que se detallan a continuación.

3.7.4.1. Obtención de TDPglucosa-pirofosforilasa.- Se utilizaron células de E. coli B cultivadas en el siguiente medio (llevado a pH=7 con NaHO):

Bactotripton: 10g/l.

Extracto de levadura: 5g/l.

Las bacterias cultivadas durante una noche se cosecharon por centrifugación a 7.000 RPM, 20 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en NaCl 0.9% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. 20 gramos de células resuspendidas en 160 ml de buffer Tris-HCl 0.01M pH=7.6 se sonicaron un minuto en un "Sonifier cell disruptor, model W 140" y se centrifugaron a 10.000 RPM durante 30 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agregó 10% en volumen de sulfato de estreptomina (10 g/100 ml); la solución se dejó en reposo durante 10 minutos, se centrifugó a 8.000 RPM por 5 minutos y este último sobrenadante se procesó de la siguiente manera:

- a) Se llevó a 20% de saturación con sulfato de amonio sólido, se centrifugó y se descartó el precipitado.
- b) El sobrenadante se llevó a 55% de saturación con sulfato de amonio, se centrifugó 15 minutos a 12.000 RPM y se descartó el sobrenadante.
- c) El precipitado se disolvió en buffer Tris-HCl 0.02M, pH=7.6 y dializó durante una noche contra el mismo buffer.
- d) El dializado se cromatógrafió en columna de DEAE-celulosa, se eluyó primeramente con 100 ml de buffer Tris-HCl 0.02M, pH=7.6 y

luego se aplicó un gradiente convexo de NaCl (100 ml de NaCl 0.02M contra 50 ml de NaCl 0.2M) en 150 ml del mismo buffer. Se midió proteínas y actividad enzimática en las distintas fracciones y se juntaron aquellas que poseían la mayor actividad de la enzima.

e) Se precipitó la misma por el agregado de sulfato de amonio sólido hasta 55% de saturación, se centrifugó y el precipitado obtenido se disolvió en buffer Tris-HCl 0.02M, pH=7.6. Se dializó la solución durante una noche contra el mismo buffer y 20 ul del dializado se incubaron con la siguiente mezcla

TTP	0.2 umoles
ATP	0.3 umoles
Tris-HCl 0.02M, pH=7.6	0.75 umoles
(¹⁴ C)glucosa	0.1 umoles
Hexoquinasa	0.04 unidades
Fosfoglucomutasa	0.1 unidades
Pirofosfatasa inorgánica	0.5 unidades

en un volumen total de 50 ul. Se incubó 3 horas a 37°C. Se finalizó la misma precipitando proteínas con un volumen de etanol 96% y el sobrenadante se cromatografió en solvente M. Paralelamente se cromatografiaron estandards de glucosa, glucosa1P y TDPglucosa. La radioactividad que migró con la misma movilidad que el estándar externo de TDPglucosa (100% de la radioactividad inicial) se eluyó con agua.

3.7.5. Obtención de TDP(¹⁴C)raunosa

Fue preparado por Susana Raffo y Marta Birin a partir de TDP-(¹⁴C)glu (preparado como se describió anteriormente) mediante una

modificación del método de Strominger (139).

3.7.5.1. Obtención de TDPramnosa óxido-reductasa..- Se obtuvo la enzima a partir de células de E. coli B cultivadas en el siguiente medio:

PO_4HK_2 : 11g/l.

PO_4H_2K : 8.5g/l.

Glucosa: 10g/l.

Extracto de levadura: 6g/l.

y cosechadas en la fase exponencial. 300mg de células de E. coli suspendidas en buffer Tris.HCl 0.02M, pH=7.6 se sonicaron 1.5 minutos en un "Sonifier cell disruptor model W 140". La suspensión se centrifugó 10 minutos a 30.000g y el sobrenadante obtenido se utilizó como enzima. Para lograr un rendimiento del 100%, el preparado debe tener por lo menos 10mg/ml.

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción (que contiene un sistema de regeneración de $TPNH^+$):

Tris-HCl 0.02M, pH=7.6	1	umol
Cl_2Mg	0.5	umoles
EDTA	0.025	umoles
Cisteina	0.075	umoles
Glu-6P	0.2	umoles
TPN	0.2	umoles
TDP(^{14}C)glu	0.1	umoles
Glu-6P dehidrogenasa	25	ul

en un volumen total de 50 ul. Luego de incubar 1 hora a 37°C se

inactivo con un volumen de etanol y el sobrenadante se cromatografió en solvente M. Se radiocromatografió y eluyó con agua la radioactividad que migró con la misma movilidad que TDPglu standard. Una alícuota del eluido se hidrolizó a pH=2, 10 minutos, 100°C, y se cromatografió en solvente F para verificar la total de conversión de glucosa en ramnosa.

3.7.6. Obtención de UDP(¹⁴C)glucurónico

El UDP(¹⁴C)glucurónico fue preparado por Susana Raffo a partir de UDP(¹⁴C)glucosa (preparado como se describió anteriormente).

3.7.6.1. Obtención de UDPglucosa deshidrogenasa.- Se obtuvo la enzima a partir de un homogenato de hígado de ternera y se purificó siguiendo la técnica de Feingold (140) hasta el tratamiento con gel de PO₄Ca₃. El eluido del gel, concentrado y dializado, se incubó con la siguiente mezcla:

UDP(¹⁴ C)glu	0.05 umoles
Glicil-glicina (pH=8.7)	10 umoles
DPN	0.45 umoles
UDPglu deshidrogenasa	0.04 unidades

La incubación se realizó en un volumen total de 70 ul durante 30 minutos, la misma se finalizó por el agregado de un volumen de etanol para precipitar las proteínas y el sobrenadante se sembró en papel Whatman 3MM y se cromatografió en solvente M. Paralelamente se cromatografiaron standards de UDPglu y UDPglnico, se eluyó la radioactividad que co-cromatografió con UDPglnico (100% de radioactividad).

3.7.7. Obtención de GDP(¹⁴C)manosa

El GDP(¹⁴C)man fue preparado por Susana Raffo a partir de (¹⁴C)manosa (New England Nuclear, 200-300 uCi/umol).

3.7.7.1. Preparación de GDPman pirofosforilasa.- Se obtuvo la enzima de células de *Acetobacter xylinum* 8747, cultivadas y cosechadas como se indica en la sección 3.1.3. Una suspensión de 500 mg de células en 10 ml de buffer Tris-HCl 0.1M, EDTA 0.01M, MSH 0.02M, se sonicó con 1.5 gr de ballotini (en un "sonifier cell disruptor, model W 140") por cuatro minutos, en intervalos de 15 segundos. La suspensión se centrifugó tres minutos a 3.000 R.P.M. (para sedimentar los ballotini) y el sobrenadante se centrifugó veinte minutos a 18.000 x g.

El sobrenadante de la segunda centrifugación se llevó a 70% de saturación con SO_4NH_4 sólido y se centrifugó quince minutos a 7.000 R.P.M.; el precipitado obtenido se disolvió en 0.3 ml de buffer Tris-HCl 0.1M, EDTA 0.01M, MSH 0.02M, y se dializó durante una noche contra 250 ml del mismo buffer.

El precipitado redisolto y dializado se utilizó como enzima en la siguiente mezcla de incubación:

GTP (0.5M)	5	ul
Cl ₂ Mg (0.25M)	4	ul
Tris-HCl (0.5M, pH=7.75)	5	ul
(¹⁴ C)manosa	0.1	umol
glucosa 1,6difosfato (5 x 10 ⁻⁵ M)	2	ul
Hexoquinasa	0.04	unidades

Pirofosfatasa inorgánica	0.5	unidades
GDPman pirofosforilasa (ppdo. 0-70% SO_4NH_4)	30	ul

con un volumen total de 80 ul. Se incubó 2 horas a 37°C , se finalizó la misma mediante el agregado de 1.5 volúmenes de etanol, se centrifugó y el sobrenadante se cromatógrafió en solvente G. Se eluyó con agua la radioactividad que co-cromatógrafió con GDPman estándar (100%).

Nota: La concentración de proteínas del precipitado de 0-70% de SO_4NH_4 debe ser aproximadamente de 14-20 mg/ml, si se varía el volumen de GDPman pirofosforilasa agregado debe compensarse la cantidad de Cl_2Mg (dado que el buffer en que está disuelta la enzima contiene EDTA 0.01M) de manera que la concentración final del mismo sea 8-9mM.

4. RESULTADOS

4.1. Incorporación de glucosa

Se mencionó en la sección 2.1. que utilizando un preparado enzimático de *Acetobacter xylinum* y UDP(¹⁴C)glu como sustrato, se sintetizaron entre otros compuestos liposolubles: glu-P-P-prenol, cel-P-P-prenol y un "trisacárido-P-P-prenol" (97).

Se sabía que incubando a bajas temperaturas (0°C) se formaba casi exclusivamente glu-P-P-prenol, mientras que incubando a 15 o a 30°C se obtenía una mezcla de glu-P-P-prenol, cel-P-P-prenol y en algunos casos trisacárido-P-P-prenol. El porcentaje de la formación de los tres compuestos dependía de la preparación enzimática utilizada (97).

Un punto que no había quedado aclarado era establecer cuál era el dador de la glucosa no reductora del celobiosa-P-P-prenol. Para estudiar este problema (los estudios de esta sección y los de la 4.2. se hicieron en colaboración con Luis Ielpi) se realizaron experimentos en dos etapas. Se incubó primero con UDP(¹⁴C)-glu a 0°C para obtener (¹⁴C)glu-P-P-prenol, se eliminó luego el nucleótido radioactivo y se reincubó a 15°C con y sin UDPglu no radioactivo. Se analizaron los productos formados en cada caso (Fig. 15).

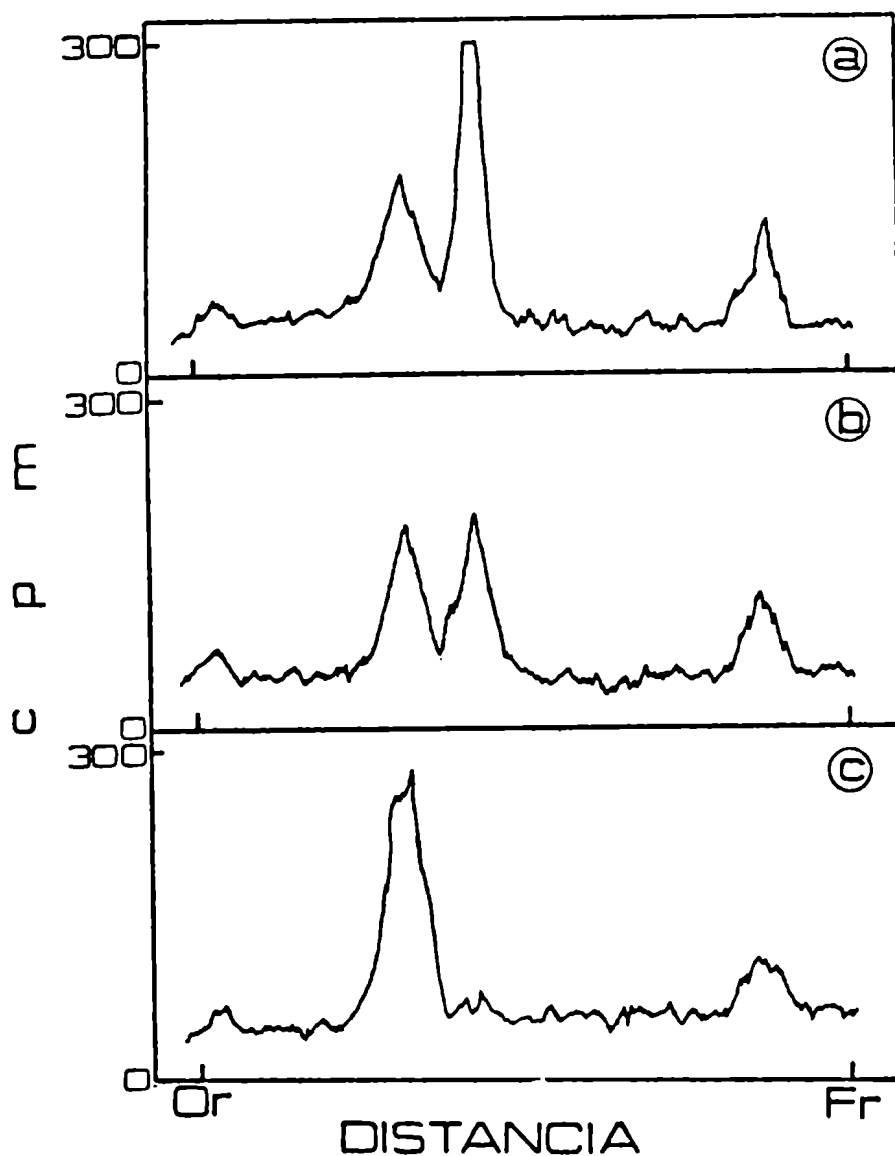


Figura 15: Formación de celobiosa-F-P-prenol: Se utilizó la mezcla de incubación estándar aumentada 5 veces, con 2.500 pmoles de UDP(^{14}C)glu (268 uCi/umol), 900 ug de enzima y se incubó 30 minutos a 0°C. Luego de finalizada la reacción por el agregado de EDTA, el "pellet" lavado se resuspendió y se dividió en tres partes iguales (ver sec.3.2.2.1., método C).

a) se procesó tal cual.

b) se reincubó a 30°C, 30 minutos sin agregado de nucleótidos.

c) se reincubó a 30°C, 30 minutos con el agregado de 20 nmoles de UDPglu no radioactivo.

Las tres fracciones se procesaron según el método C; y los extractos butanólicos se cromatografiaron en solvente C.

Es conveniente aclarar que el material liposoluble obtenido se analizó por cromatografía en solvente C. El medio alcalino de este solvente no afecta a prenol-monofosfato-azúcares, que migran con el frente, pero produce la ruptura del puente pirofosfato de los azúcares-P-P-lípido liberándose los ésteres fosfóricos cíclicos, siempre que el OH^- del C2 del azúcar unido al fosfato esté en posición cis respecto de este último (125).

Esta es una técnica sencilla que permite identificar con rapidez a prenol-monofosfato-azúcares y a prenol-difosfatos unidos a azúcares de distinta complejidad, pues en este solvente se separan claramente los ésteres fosfóricos cíclicos de mono, di, tri y tetra sacáridos. Cuando se aplica con fines analíticos reemplaza con éxito a las columnas de DPAE-celulosa utilizadas en otro capítulo de esta Tesis (sec.3.5.1.) para distinguir mono y difosfato azúcares y estos últimos entre sí, pues es mucho menos trabajoso. En lo que sigue, y para simplificar la exposición, a los derivados cíclicos obtenidos por este método se lo seguiré denominando con el nombre del lípido-azúcar respectivo.

En la Figura 15a) se observa, entonces, el perfil correspondiente a material butanol soluble sintetizado a 0°C . Como era de esperar se formó principalmente glu-P-P-prenol ($R_f=0.5$) y muy poco cel-P-P-prenol ($R_f=0.32$) y gal-P-prenol ($R_f=0.9$). En la Figura 15b) se observa que al reincubar a 15°C hay una disminución del glu-P-P-prenol que no se traduce en un aumento de cel-P-P-prenol. Esta disminución de radioactividad soluble en butanol es coincidente con el

aumento de marca en el glucano soluble en agua mencionado en la sección 2.1. y cuyo estudio se está llevando a cabo en nuestro Laboratorio, pero del cual no nos ocuparemos durante el desarrollo de esta Tesis. En la Figura 15c), en cambio, se ve que al reincubar a 15°C en presencia de UDPglu no radioactivo se forma cel-P-P-prenol a expensas del glu-P-P-prenol que desaparece totalmente. Estos resultados indican que el glu-P-P-prenol es precursor del cel-P-P-prenol y que este último, aún en presencia de glu-P-P-prenol no se incrementa en ausencia de UDPglu, que es el dador de la segunda glucose. Podría pensarse, sin embargo, que debido a la alta concentración de UDPglu con que se incubó en c), se sintetizó mucho glu-P-P-prenol (que fue a un "pool" común con el (^{14}C)glu-P-P-prenol preexistente) y que en dicha concentración, dos moléculas del mismo sintetizan (^{14}C)cel-P-P-prenol. Si esta suposición fuera correcta la marca radioactiva del (^{14}C)cel-P-P-prenol debería estar igualmente distribuida entre ambas glucosas.

Se aisló el (^{14}C)celobiosa, se redujo con borohidruro de sodio, se hidrolizó el disacárido reducido y se analizaron los productos por electroforesis en buffer J (datos no mostrados), obteniéndose más del 80% de la radioactividad total como (^{14}C)sorbitol, lo que descarta la última hipótesis.

Como una confirmación más de lo propuesto se intentó sintetizar cel-P-P-prenol en presencia de UDPglu no radioactivo utilizando (^{14}C)glu-P-P-prenol como sustrato.(Fig.16).

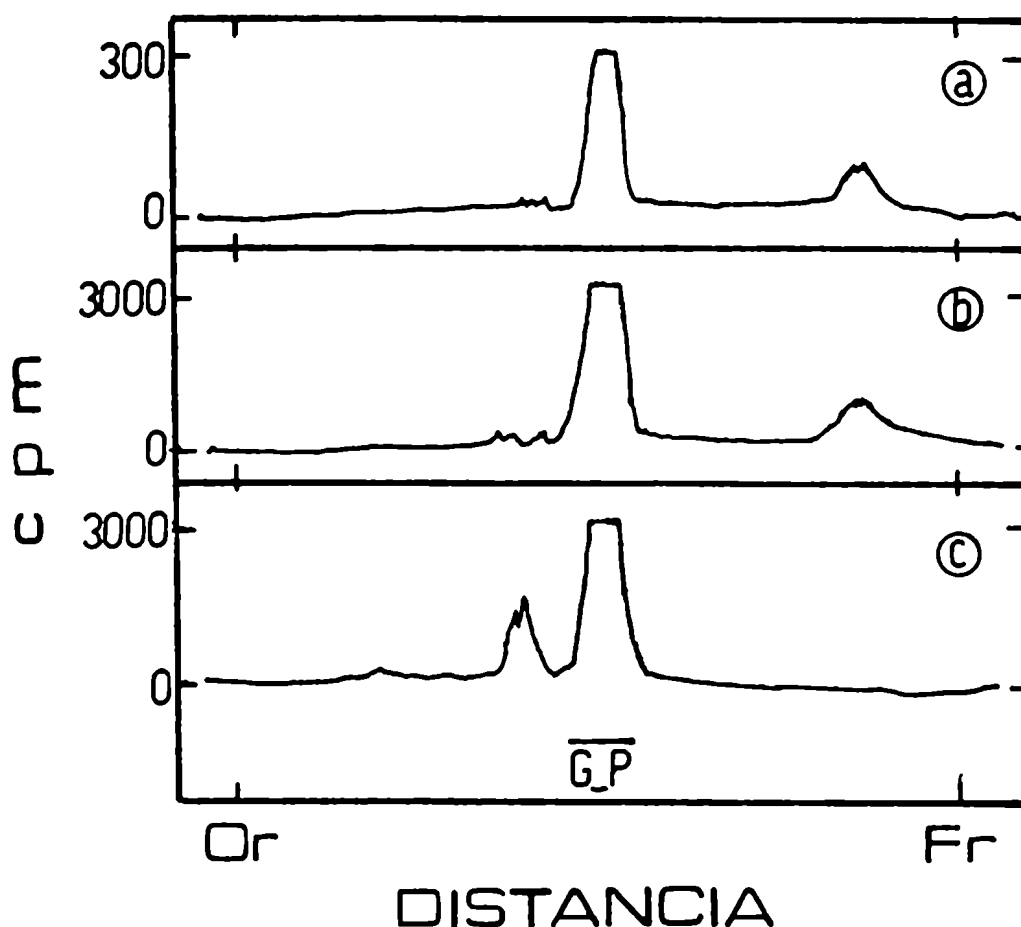


Figura 16: Formación de (^{14}C) cel-P-P-prenol a partir de (^{14}C) glu-P-P-prenol exógeno: El (^{14}C) glu-P-P-prenol se obtuvo mediante incubaciones a 0°C . Se separó una alícuota del material obtenido (5.000 cpm) y el resto (54.000 cpm) se dividió en dos partes, cada una de las cuales se llevó hasta casi sequedad y se resuspendió en agua varias veces (sección 3.2.3.), finalmente se agregaron los componentes de la mezcla de incubación estándar (80 μg de enzima de Nossal) con una concentración final de Tritón X-100 de 0.4% y se incubó 2 horas a 15°C . Se procesó según método A.

a) Cromatografía en solvente C de la alícuota (5.000 cpm) del material utilizado como sustrato.

b) Cromatografía en solvente C del extracto butanólico de la incubación realizada utilizando como sustrato 27.000 cpm de (^{14}C) glu-P-P-prenol.

c) Cromatografía en solvente C del extracto butanólico de la incubación realizada con 27.000 cpm de (^{14}C) glu-P-P-prenol en presencia de 40 nmoles de UDPglu.

El (^{14}C)glu-P-P-prenol utilizado contenía un poco de (^{14}C)gal-P-prenol, pero este no molestaba a los fines del experimento Fig.16a)

En la Fig.16b) se observa el perfil cromatográfico de este material incubado a 15°C , prácticamente permaneció inalterado: En la Fig.16c) se puede apreciar la formación de (^{14}C)cel-P-P-prenol cuando se incubó el (^{14}C)glu-P-P-prenol a 15°C en presencia de UDPglu no radioactivo.

Estos resultados permiten concluir que la formación de cel-prenol puede representarse mediante la siguiente ecuación:



Establecida la relación precursor-producto entre estos dos lípido-azúcares, faltaba aclarar la síntesis y estructura del "trisacárido-P-P-prenol". Su formación no pudo ser controlada variando una serie de parámetros como: temperatura de las incubaciones, concentración de enzima, concentración de sustrato, etc; la misma parecía vinculada directamente con la preparación enzimática utilizada.

En el capítulo siguiente, donde se estudian los compuestos formados utilizando GDP(^{14}C)man como sustrato radioactivo, se va a encontrar explicación a este hecho y se va a poder relacionar la síntesis de "trisacárido-P-P-prenol" a la de los compuestos hasta aquí descritos.

4.2. Incorporación de manosa

4.2.1. Generalidades

El hecho de que casi todos los polisacáridos aislados de zoogleas de *Acetobacter xylinum* contuvieran manosa en su estructura, hizo parecer interesante la búsqueda de lípido-azúcares utilizando GDP(^{14}C)man como sustrato dador (Tabla 4).

Tabla 4: Incorporación de manosa a material liposoluble

GDP(^{14}C)man (pmoles iniciales)	(^{14}C)man (pmoles en extracto B)
92	15
276	19.7
460	25.5
920	28.1

Las condiciones de la incubación fueron las estándar. Se utilizaron las cantidades indicadas de GDP(^{14}C)man (227 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y 280 μg de proteína en cada caso. Se incubó 30 minutos a 30°C y se procesó según método B (sección 3.2.1.2.).

Se obtuvieron muy buenas incorporaciones, aunque no se transfirió radioactividad a material no liposoluble.

En vista de los resultados positivos obtenidos se estudió la dependencia con el tiempo de la incorporación de (^{14}C)manosa a material liposoluble (Fig.17). Se alcanzó un máximo de incorporación alrededor de los 45 minutos, que se mantuvo por lo menos hasta las 2 horas.

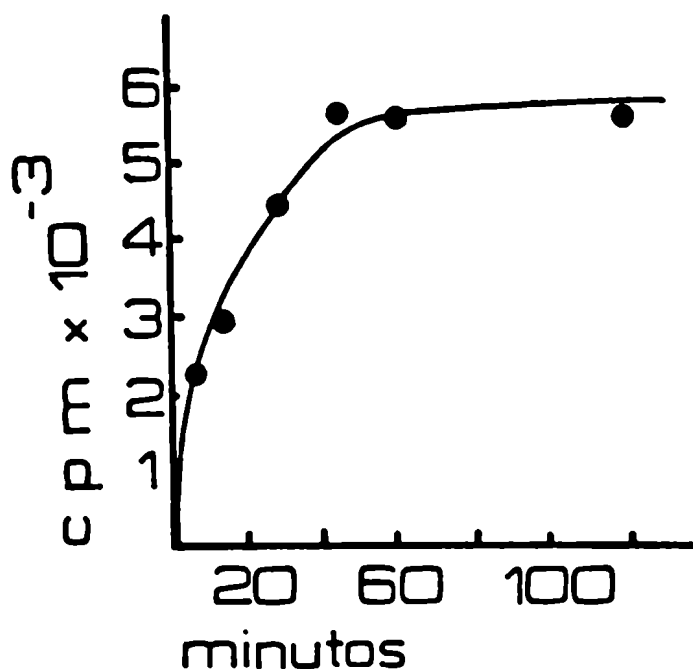


Figura 17: Incorporación de (¹⁴C)manosa a material liposoluble:
 Las condiciones fueron las de la incubación estándar; se utilizaron 92 pmoles de GDP(¹⁴C)man (227 uCi/umol) y 230 ug de proteína por tubo. Se procesaron los mismos por el método B y se midió la radioactividad incorporada en extracto B.

4.2.1.1. Análisis del material liposoluble marcado con (¹⁴C)manosa

El extracto B se analizó por cromatografía en papel en solventes H y C (Fig. 18). Ambos perfiles cromatográficos denotan la presencia de dos compuestos con distintas propiedades. Las movilidades en solvente H confirman la naturaleza lipídica de los mismos y descartan la posibilidad de artificios como por ejemplo azúcares libres arrastrados a la fase orgánica.

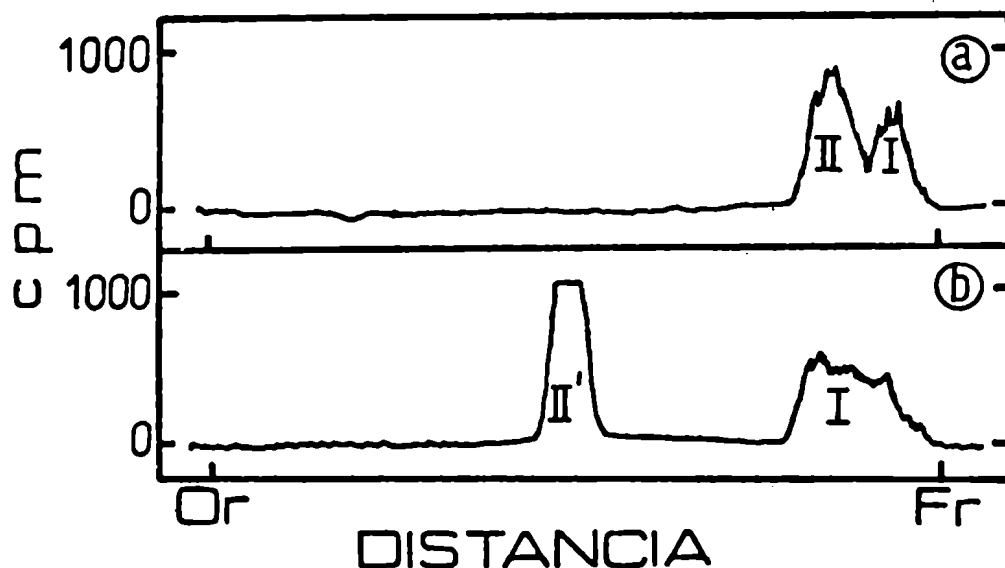


Figura 18: Cromatografía en papel del material liposoluble marcado con ^{14}C manosa: Se preparó el extracto P en las condiciones de la Tabla 1 (con 52 picos de GDP(^{14}C)man) y se cromatografió en a) solvente H, b) solvente C.

El R_f del compuesto que denominamos I tanto en solvente H como en solvente C coincide con el de los lípido-monofosfato-azúcares descritos (97). La posición del compuesto II' en el solvente C, otra parte puede corresponder a la de un compuesto del tipo oligosacárido-P-cíclico proveniente de un azúcar-P-P-lípido.

La relación de incorporación de radioactividad entre ambos compuestos era x y variable de acuerdo al y no utilizado; por otra parte utilizando menor cantidad de enzima disminuía notablemente la incorporación de radioactividad.

puesto II.

Para confirmar si se estaba ante la presencia de un lípido-monofosfato-azúcar (I) y un lípido-difosfato-azúcar (II) se recurrió a la cromatografía en columnas de DEAE-celulosa.

4.2.1.2. Cromatografía en DEAE-celulosa.- Del análisis del perfil cromatográfico de la Fig.19, surge que:

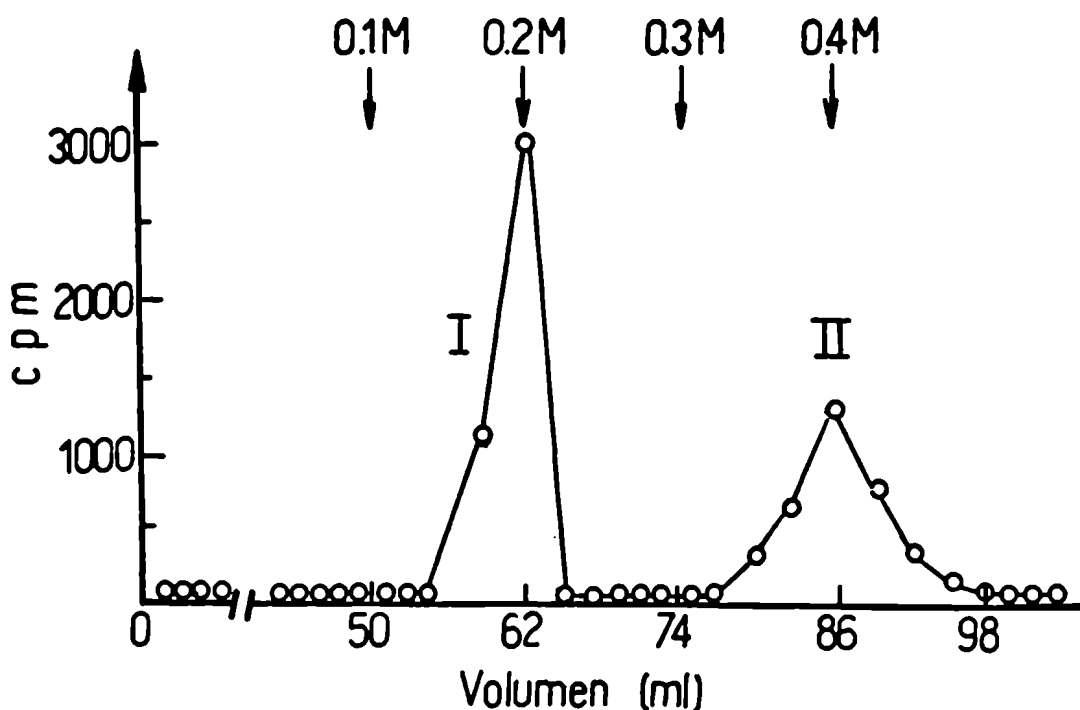


Figure 19: Cromatografía en DEAE-celulosa de material liposoluble marcado con (^{14}C) manosa: Se preparó extracto F con un "pool" de incubaciones estándar, con 92 pmoles de $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$ (227 uCi/ μmol) y 180 μg de proteína, 30 minutos a 30°C . 20.000 cpm de dicho extracto se cromatografiaron en una columna de 0.8×20 cm como se describe en la sección 3.5.1.1.

- 1) No hay ningún compuesto neutro.
- 2) Existen dos compuestos diferentes que eluyen con AcONH_4 0.1-0.2M (compuesto I) y con 0.3-0.4M (compuesto II) respectivamente. Estas posiciones de elución son las ya conocidas para azúcares-P-lípidos y azúcares-P-P-lípidos respectivamente (97), confirmando la presunción anterior.

4.2.2. Estudio estructural del compuesto I

4.2.2.1. Hidrólisis ácida suave.- El compuesto I obtenido como se describió anteriormente y aislado por cromatografía en DEAE-celulosa fue sometido a distintos tratamientos. Por hidrólisis ácida suave (pH=2, 10 minutos, 100°C) se liberó solo manosa a juzgar por el comportamiento cromatográfico en solventes E y H, y por la movilidad electroforética en buffer K (datos no mostrados).

4.2.2.2. Tratamiento con fenol 50%.- Esta técnica permite obtener alguna información respecto de la estructura de los prenil-fosfoazúcares. Mientras que los compuestos que poseen un prenil α -saturado (del tipo de los dolicoles) son resistentes al tratamiento, aquellos α -insaturados (o alílicos) se rompen liberando el azúcar-P-o azúcar-P-P- correspondiente.

A su vez la vida media de los compuestos ante el tratamiento con fenol puede dar idea del tipo de unión. Mientras los monofosfatos poseen una vida media de una hora aproximadamente, los difosfatos poseen una vida media de alrededor de cinco minutos.

El comportamiento del compuesto I (Fig.20) resultó ser el de un azúcar-P-prenol, con un prenil del tipo de los α -insaturados o alílicos.

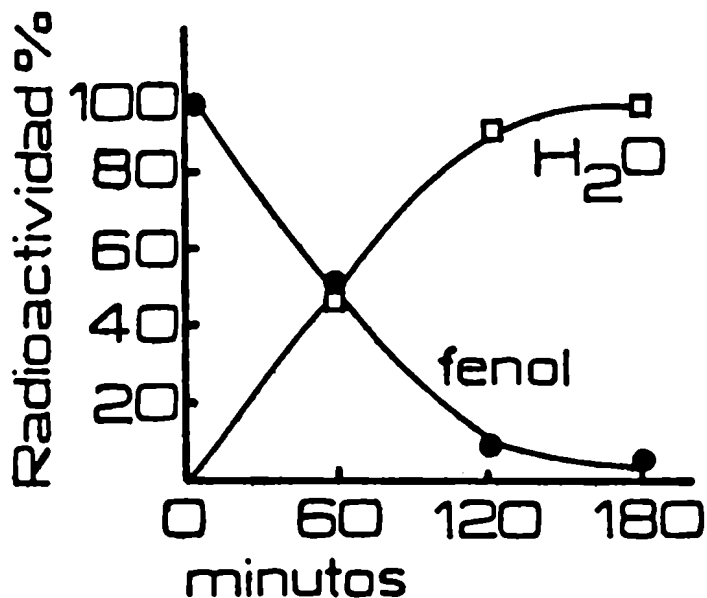


Figura 20: Tratamiento con fenol 50%: El compuesto I (6.000 cpm) obtenido y aislado como en la figura 19 se trató como se describe en la sección 3.3.4. durante los tiempos indicados y se midió radioactividad en la fase acuosa \square — \square y fenólica \bullet — \bullet .

Una parte del material hidrosoluble de dicho tratamiento se electroforetizó en buffer I (Fig.21), obteniéndose un solo compuesto con la movilidad de un azúcar-fosfato. El resto de la fase acuosa se dividió en dos partes. A una de ellas se la trató con fosfatasa alcalina y a la otra se la hidrolizó en medio ácido (0.1M HCl, 10 minutos, 100°C). El producto de ambos tratamientos se sometió a electroforesis en buffer I (datos no mostrados) y ambos se comportaron como compuestos neutros. Eluidos y cromatografiados en solvente H sus movilidades coincidieron con manosa estándar. Estos resul

tados confirmaron que unido al prenil en el compuesto I había una manosa-1P.

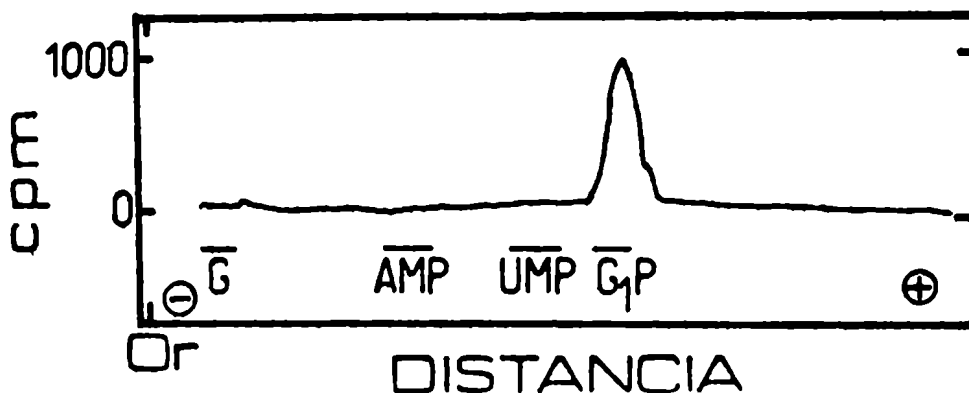


Figura 21: Electroforésis en buffer I del producto hidrosoluble obtenido por tratamiento con fenol, sobre el compuesto I.

4.2.2.3. Efecto del P-ficaprenol en la formación del compuesto I.-

Para verificar que la porción lipídica del manosa-P-lípido era un prenil del tipo de los undecaprenoles- α -insaturados se estudió el efecto de la presencia de P-ficaprenol en la mezcla de incubación (Tabla 5).

Tabla 5: Efecto de Tritón y de FMP en la incorporación de (14 C)man a manosa-P-prenol

ug de enzima	Sin adición	pmoles incorporados	
		+ Tritón	+ Tritón + FMP
80	2.3	---	1.86
160	7.1	6.5	24.5
240	17	---	41
320	23	---	52

Las condiciones de incubación fueron las estándar, empleando en cada tubo 1.032 pmoles de GDP(^{14}C)man (113 uCi/umol) y donde se indica, 1.800 pmoles de FMP y una concentración final 0.084% de Tritón X-100. Se procesaron las incubaciones por el método A, el extracto butanólico se cromatografió en solvente C, se cortó la zona de los cromatogramas correspondientes al compuesto I ($R_f=0.9$), y se contó la radioactividad.

Si bien el detergente inhibió ligeramente la incorporación de (^{14}C)man a (^{14}C)man-P-prenol (Tabla 5, 2ª línea) mediante el agregado de FMP se obtuvieron activaciones mayores de un 100%. Estos resultados unidos a los de la labilidad al fenol y a la posición de elución de la columna de DEAE-celulosa, sugieren con bastante firmeza que el compuesto I es manosa-P-prenol(alílico).

4.2.2.4. Configuración anomérica de la manosa en el manosa-P-prenol.

Warren y col. (141) sintetizaron man-P-prenol en configuración anomérica α y β , y estudiaron diferencias en el comportamiento de ambos compuestos ante distintos tratamientos. Demostraron que por hidrólisis alcalina en propanol (sección 3.3.8.) del prenil- β -D-manopiranosilfosfato se produce principalmente man-2P. En contraste, el derivado α produce solo trazas de α -D-manosilfosfato pues el principal producto es FMP.

Sometido el man-P-prenol (es decir el compuesto I) al tratamiento alcalino, toda la radioactividad se hizo hidrosoluble. Por cromatografía en papel en solvente M de dicha fase se obtuvo un solo producto con movilidad similar pero no igual a la hexosa-1P utilizada como estándar (Fig.22a). Se lo sometió luego a una hidrólisis ácida seguida de cromatografía en solvente M (Fig.22b). El compuesto permaneció inalterado y solo una pequeña fracción se convir-

tió en manosa, por lo cual quedó descartada la posibilidad de que se tratara de manosa-1P la cual se hubiera hidrolizado totalmente en estas condiciones. Además el producto mostró poseer carga en electroforesis en buffer L (Fig.22c) y ser sensible a la fosfatasa alcalina (Fig.22d).

Estos datos son compatibles con la presencia de manosa-2P, lo que indica que la configuración anomérica de la manosa en el man-P-prenol es β . El hecho de que la configuración anomérica de la manosa en el compuesto I sea β es otra confirmación de que el aceptor lipídico es fosforilado, es decir, el GDPman, cuya manosa posee la configuración anomérica α -D, dona únicamente su azúcar. Por otra parte esto concuerda perfectamente con lo visto anteriormente, de que la síntesis del compuesto I se ve activada en presencia de P-prenol.

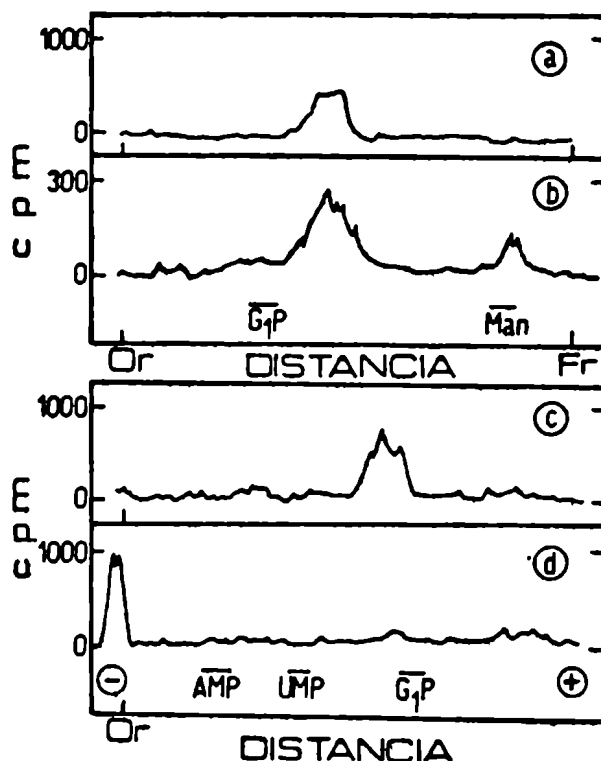
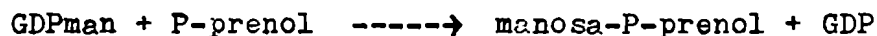


Figura 22: Hidrólisis alcalina del (¹⁴C)man-P-prenol; El (¹⁴C)man-P-prenol se obtuvo como en la Fig.19 y se sometió a hidrólisis alcalina (sección 3.3.8.). El producto hidrosoluble (100%) se cromatografió en solvente M, a). Otra parte del mismo compuesto se sometió a hidrólisis ácida (pH=1, 5 minutos, 100°C); el producto de dicho tratamiento se dividió en tres partes, una de las mismas se cromatografió en solvente M, b), otra se electroforesizó en buffer L, c), y la tercera se trató con fosfatasa alcalina y posteriormente se electroforesizó en buffer L, d).

4.2.2.5. Reacción de síntesis del manosa-P-prenol.- Para la síntesis de compuestos análogos, en otros sistemas (54) (87), se ha sugerido la siguiente reacción:



La reacción es reversible y el GDP un inhibidor. Si bien con las enzimas de Acetobacter no se investigó en detalle este proceso, los resultados obtenidos indican que es idéntico. Sólo se estudió el efecto del GDP y del GMP (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto de GDP y GMP en la síntesis de manosa-P-prenol

Nucleótido agregado	manosa-P-prenol formado (pmoles)	% Inhibición
---	18	0
GMP	7.2	60
GDP	0	100

Se utilizó la mezcla de incubación estándar, con 92 pmoles de GDP (¹⁴C)man (227 uCi/umol), 400 ug de enzima por tubo y se incubó 30 minutos a 30°C. Donde se indica, se agregaron 500 nmoles de GDP o GMP. Se procesó según método A y se analizó la fase butanólica por cromatografía en solvente C. La zona de migración del producto buscado (R_f=0.9) se cortó, y se contaron los respectivos papeles en el centellador.

El efecto inhibitorio del GDP es el esperado, mientras que el del GMP, no tan fácil de ser interpretado, ha sido observado también en otros casos similares (142).

4.2.3. Estudio estructural del compuesto II

4.2.3.1. Número de monosacáridos del oligosacárido.- Hemos señalado que este compuesto liposoluble, que aparecía en mayor o menor cantidad de acuerdo a la preparación enzimática utilizada, se eluía de las columnas de DEAE-celulosa con 0.3-0.4M de AcONH_4 (Fig.19) en la zona de los azúcares-P-P-lípido.

Por hidrólisis ácida suave del mismo y ulterior partición butanol/agua se recuperó toda la radioactividad en la fase acuosa. La cromatografía en papel de esta fase, sólo permitió detectar un compuesto con la movilidad de un trisacárido (migra un poco menos que la maltotriosa), Fig.23.

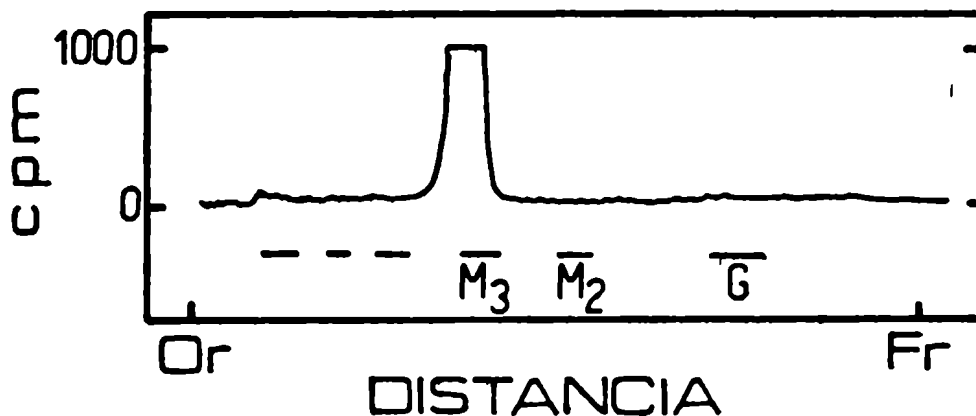


Figura 23: Hidrólisis ácida suave del compuesto II: El compuesto II obtenido y aislado como se indica en la Fig. 19 (6.500 cpm) se sometió a hidrólisis ácida suave (pH=2, 10 minutos, 100°C) y el producto hidrosoluble obtenido se cromatografió en solvente H. Se utilizaron como estándares internos una mezcla de maltooligosacáridos.

Para tener una idea más precisa del tamaño del oligosacárido se lo cromatografió en una columna de Sephadex G-10 (Fig.24).

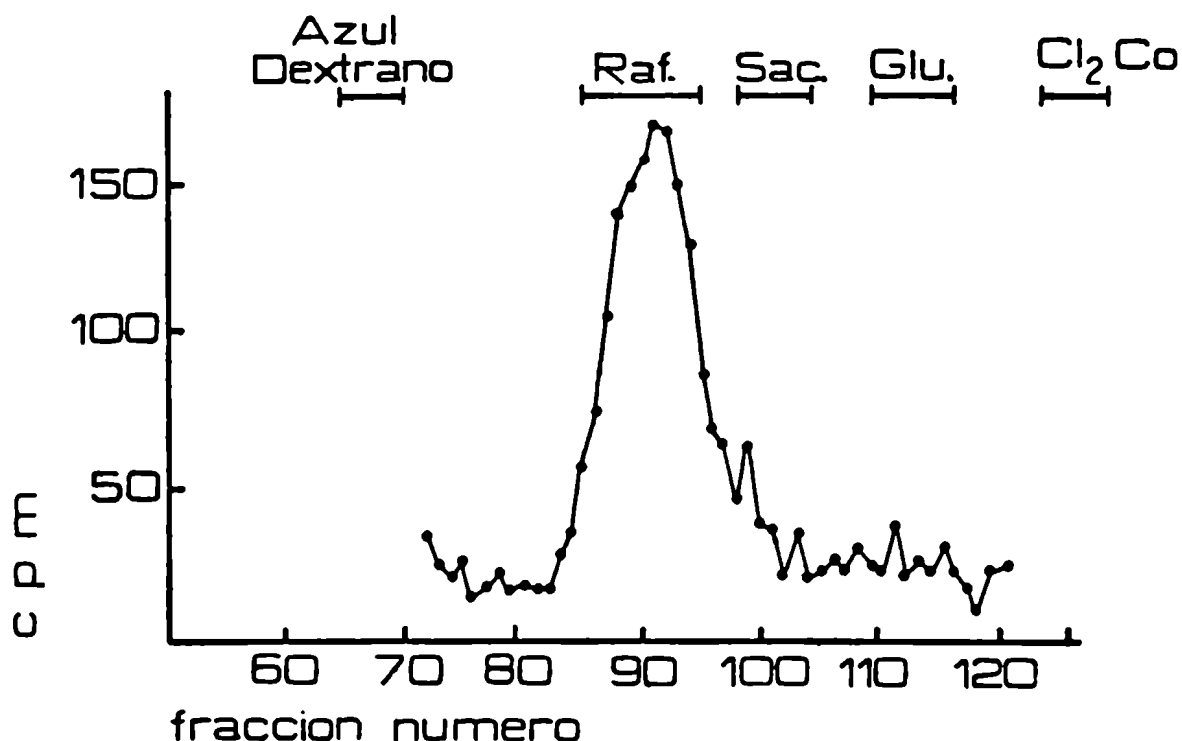


Figura 24: Cromatografía en Sephadex G-10 del compuesto II: El producto de hidrólisis ácida suave del compuesto II, obtenido y aislado como en la Fig.23 (4.500 cpm) se cromatografió en Sephadex G-10. La columna se desarrolló como se indica en la sección 3.5.2.

El volumen de elución del mismo fue similar al del trisacárido rafinosa que se utilizó como estándar (análogos resultados se obtuvieron con Biogel P-2, resultados no mostrados y Fig.59) lo que confirmó que se estaba ante la presencia de un trisacárido.

4.2.3.2. Confirmación de la unión difosfato entre la porción lipídica y el trisacárido.- El compuesto II ante un tratamiento alcalino suave se degradó dando lugar al éster fosfórico cíclico. Este último compuesto fue caracterizado por su insensibilidad a la fosfatasa alcalina, a menos que fuera sometido previamente a una hidrólisis ácida (Fig.25). El tratamiento ácido abre el éster fosfórico cíclico produciendo trisacárido-2P. La fosfatasa alcalina puede entonces actuar para dar el azúcar libre, en este caso, el trisacárido.

El compuesto neutro de la Fig.25 d) tiene movi- lidades de un trisacárido por cromatografía en solventes E y H (no mostrado).

Cabe aclarar que la electroforesis en buffer I no separa el éster-P-cíclico del éster-2P, por eso el perfil de a) es análogo al de b).

El compuesto neutro de c) es trisacárido; su aparición es debida a que el medio básico que produce la ruptura del compuesto II para dar el éster fosfórico cíclico puede en parte producir la apertura del ciclo y dar algo de oligosacárido-2P que es sustrato de la fosfatasa alcalina.

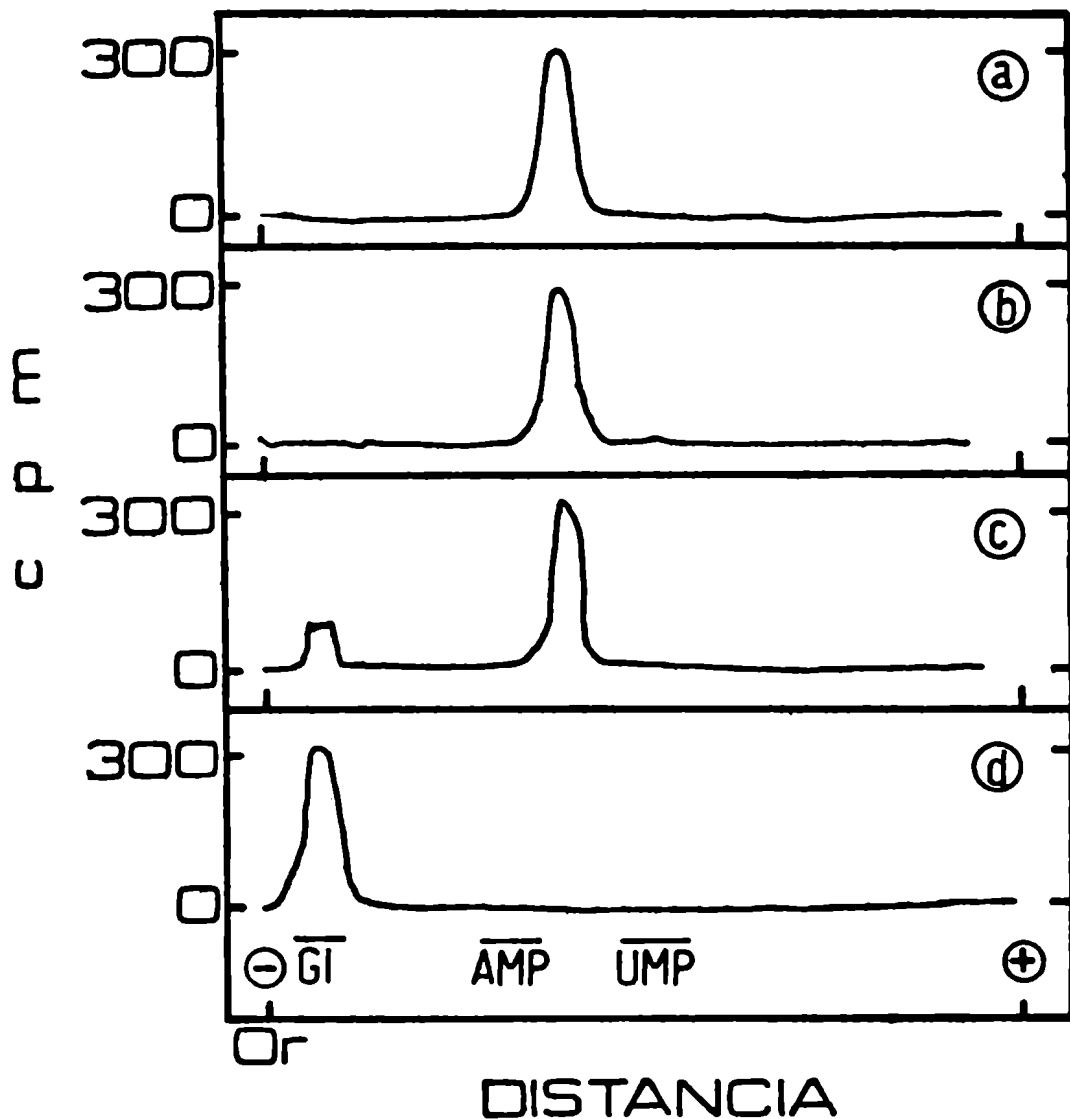


Figura 25: Caracterización del éster fosfórico cíclico del (^{14}C)man "trisacárido": El compuesto II obtenido a partir de $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$ en las condiciones de la Fig.19 se cromatografió en solvente C. El producto hidrosoluble eluido de dicha cromatografía (10.500 cpm) se dividió en cuatro partes y se lo electroforetizó en buffer I luego de los siguientes tratamientos.

- a) Tal cual.
- b) Hidrólisis ácida (pH=1, 10 minutos, 100°C).
- c) Fosfatasa alcalina.
- d) Hidrólisis ácida (pH=1, 10 minutos, 100°C) + fósfatasa alcalina.

4.2.3.3. Tratamiento con fenol 50%. - El compuesto II sometido al tratamiento con fenol 50% liberó en 30 minutos el 95% de la radioactividad a la fase acuosa. El tiempo de vida media del compuesto en estas condiciones fue de 3-4 minutos (Fig.26).

Estos resultados coinciden con la vida media determinada para otros azúcar-pirofosfato-prenoles donde el prenoles es alílico (97).

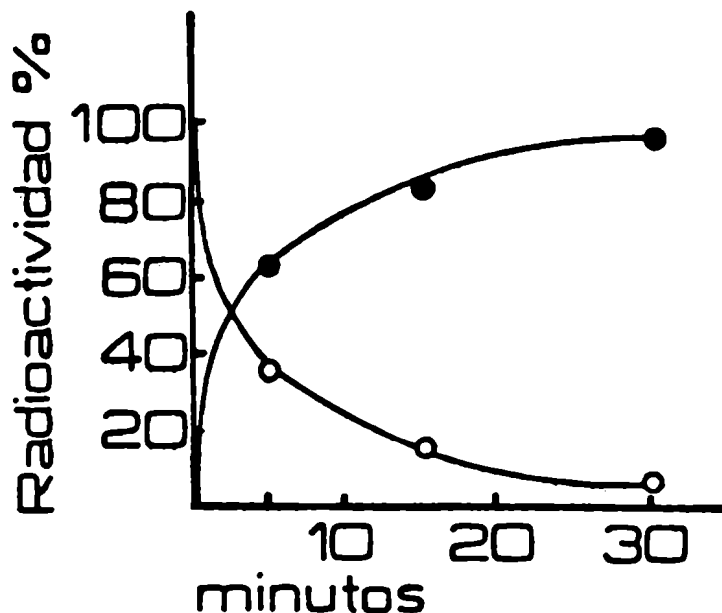


Figura 26: Tratamiento con fenol 50%: El compuesto II (4.600 cpm) obtenido como en la Fig.19 se trató como se indica en sección 3.3.4. durante los tiempos señalados y se midió radioactividad en la fase acuosa ●—● y en la fase fenólica ○—○ .

Se confirmó que el producto radioactivo soluble en agua era un pirofosfato-azúcar por su movilidad en electroforesis y por su

sensibilidad a la fosfatasa alcalina y a la hidrólisis ácida.

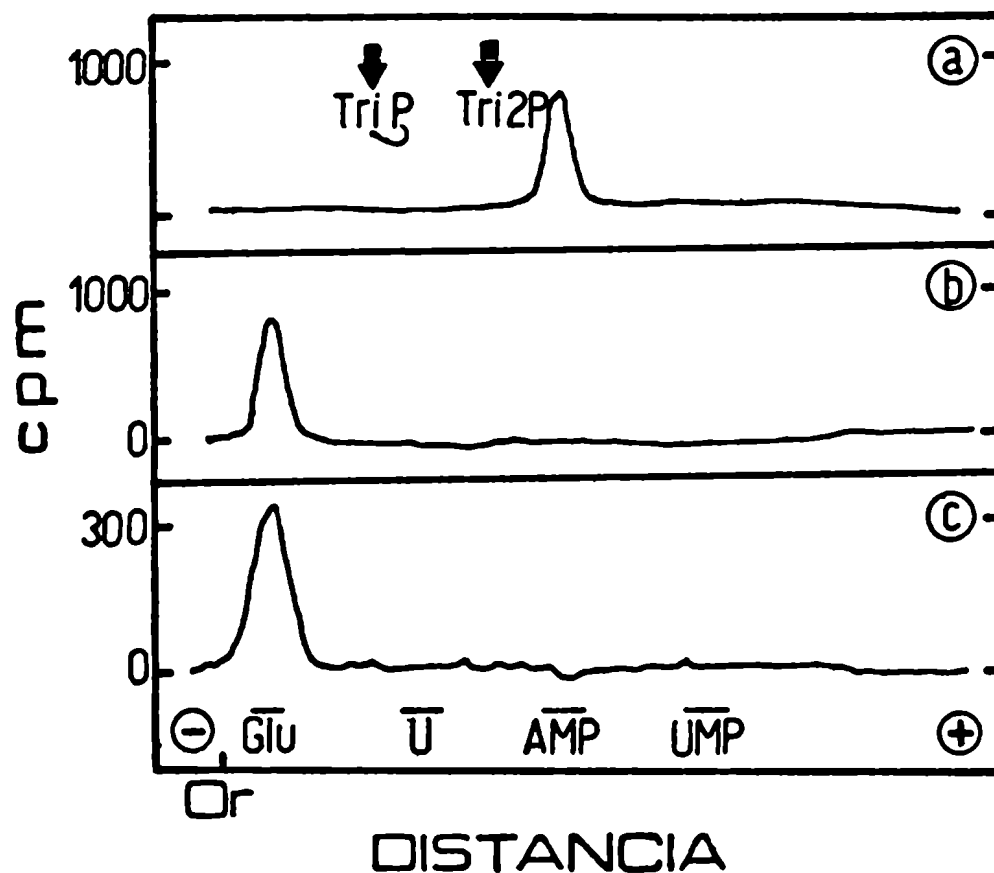


Figura 27: Análisis del producto hidrosoluble del tratamiento con fenol: Las fases acuosas de los tratamientos con fenol de la Fig. 26 fueron mezcladas, se dividió en tres partes iguales y una de las mismas se sometió tal cual a electroforesis en buffer L, a). Las dos restantes se sometieron a electroforesis en buffer L luego de tratarlas con: b) fosfatasa alcalina y c) hidrólisis ácida (pH=1, 10 minutos, 100°C). Las flechas en el gráfico marcan la posición del trisacárido-P-cíclico, y trisacárido-2P. Los mismos fueron obtenidos, por tratamiento alcalino del trisacárido-P-P-prenol y tratamiento en medio ácido de este último.

En la Fig.27 a) se observa que el producto obtenido luego del tratamiento con fenol migró más que el trisacárido-P y que el

trisacárido-P-cíclico. Se descartó por lo tanto que se tratara de alguno de estos dos compuestos.

En la Fig.27 b) se observa que es sensible a la fosfatasa alcalina dando un compuesto neutro, con las movilidades de un trisacárido en solventes E y H (datos no mostrados).

El tratamiento ácido a pH=1 (Fig.27 c)) produjo también el mismo compuesto neutro, indicando que no hay ningún resto fosfato esterificando alcoholes primarios o secundarios que no se hidrolizarían en estas condiciones. La unión debe ser al C1 hemiacetálico.

4.2.3.4. Azúcares que componen el trisacárido.- El hecho de que incubando con GDP(¹⁴C)man se formara un trisacárido-P-P-prenol, que en medio básico se rompía para dar trisacárido-P-cíclico, era un indicio de que el azúcar unido al fósforo no era una manosa (sección 4.2.3.2.). Esto sugirió que debía haber un aceptor endógeno que actuaba de sustrato para la entrada de la o las manosas y que poseía ya algún azúcar, siendo del tipo (azúcar)_n-P-P-prenol, con n=1 ó 2.

Como se sabía a esta altura que los preparados enzimáticos en presencia de UDP(¹⁴C)glu sintetizaban (¹⁴C)cel-P-P-prenol, se pensó en la posibilidad de que tanto el glu-P-P-prenol como el cel-P-P-prenol estuvieran presentes o se formaran en las preparaciones enzimáticas y fueran aceptores de la o las manosas. Para comprobar esta hipótesis se investigó el efecto del UDPglu no radioactivo sobre la formación del trisacárido-P-P-prenol (Fig.28) en las incubaciones con GDP(¹⁴C)man.

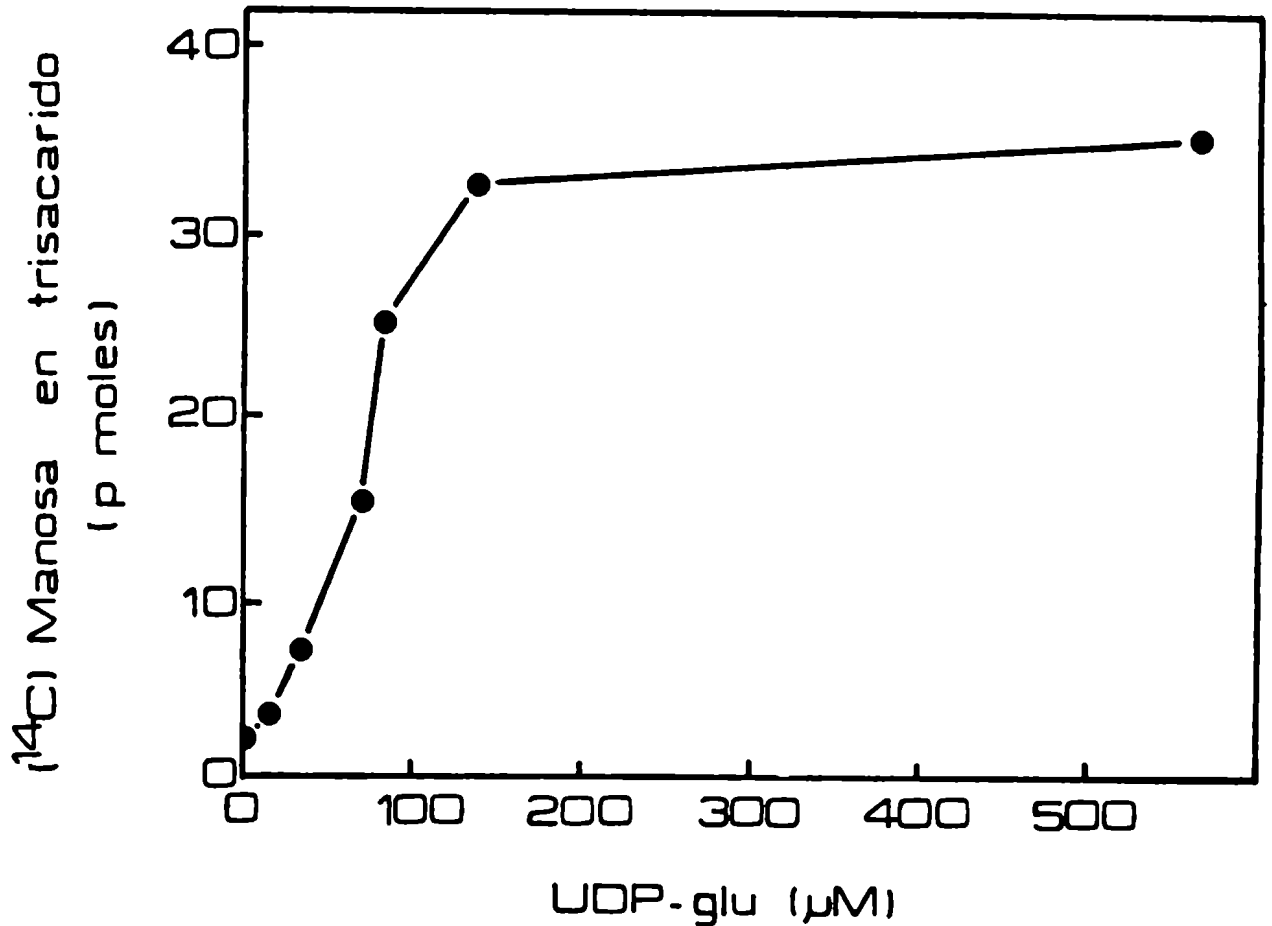


Figura 28: Efecto del UDPglu en la formación de trisacárido-P-P-prenol: Se utilizó la mezcla de incubación estándar con 90 pmoles de GDP(^{14}C)man (227 uCi/umol), 240 μg de proteína y la cantidad de UDPglu indicada en cada caso. Se procesaron las incubaciones según método A. El extracto butanólico se cromatografió en solvente C y se contó la zona correspondiente a trisacárido-P-cíclico.

Se obtuvo una clara activación de la síntesis de trisacárido-P-P-prenol al incubar en presencia de UDPglu no radioactivo, y se llegó a un máximo de incorporación con una concentración 150 μM del nucleótido.

Estos resultados reforzaron aún más nuestra hipótesis y decidimos como contrapartida ver el efecto de la presencia de GDPman

en una incubación donde se sintetizara (^{14}C)cel-P-P-prenol (Fig.29).

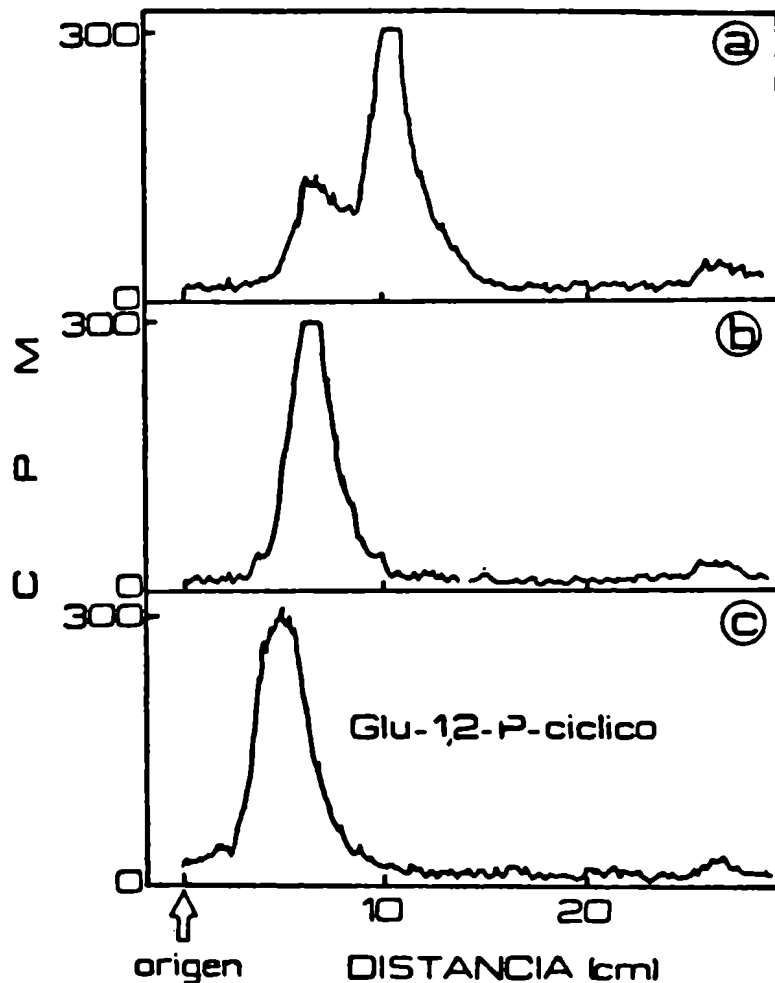


Figura 29: Efecto del GDPman en la síntesis de (^{14}C)celobiose-P-P-prenol: Se realizó una incubación en las mismas condiciones de la Fig.15 para sintetizar (^{14}C)glu-P-P-prenol a 0°C (se utilizó buffer glicil-glicina en lugar de Tris-HCl). Luego de finalizada la reacción por el agregado de EDTA, el "pellet" lavado se resuspendió y se dividió en tres partes (método C).

a) Se procesó tal cual.

b) Se reincubó a 30°C , 30 minutos con el agregado de 20 nmoles de UDPglu no radioactivo.

c) Se reincubó a 30°C , 30 minutos con el agregado de 20 nmoles de UDPglu y 2.500 pmoles de GDPman no radioactivos.

Las tres fracciones se procesaron según el método C₁ y los extractos butanólicos se cromatografiaron en solvente C.

Se incubó a 0°C con UDP(^{14}C)glu y se obtuvo, como era de es-

perar, (^{14}C)glu-P-P-prenol y una pequeña proporción de (^{14}C)cel-P-P-prenol (Fig.29 a)). Al reincubar estos productos a 30°C en presencia de UDPglu todo el (^{14}C)glu-P-P-prenol se transformó en (^{14}C)cel-P-P-prenol (Fig.29 b)), cuando se reincubó simultáneamente con UDPglu y GDPman el producto formado se comportó como (^{14}C)trisacárido-P-P-prenol (Fig.29 c)).

Estos resultados apuntaron firmemente a que la manosa se transfería a un (^{14}C)celobiosa-P-P-prenol.

4.2.3.5. Relación glucosa/manosa en el trisacárido.- Para confirmar que la relación glucosa/manosa en el trisacárido era de 2/1 se realizó un experimento utilizando como sustrato UDP(^{14}C)glu y GDP(^{14}C)man de manera de obtenerlo marcado en ambos azúcares.

Hubo que tener especial cuidado en utilizar un preparado enzimático que incubado con GDP(^{14}C)man en ausencia de UDPglu no sintetizara trisacárido-P-P-prenol o sea que tuviera bajo nivel de aceptores endógenos; de manera que no se distorcionara la relación buscada.

El material obtenido se hidrolizó a $\text{pH}=2$ y el producto se analizó por cromatografía (Fig.30 a)). Se observaron dos picos pequeños que co-cromatografiaron con manosa y glucosa estándar respectivamente, un tercero que migró con un $R_{\text{glu}}=0.43$ que era el trisacárido buscado y un pico de $R_{\text{glu}}=0.25$ correspondiente presumiblemente a trisacárido-P-cíclico. El compuesto de $R_{\text{glu}}=0.43$ eluido y vuelto a cromatografiar en el mismo solvente dió un solo pico radioactivo (Fig. 30 b)). Por hidrólisis ácida total de este material se ob-

tuvo (^{14}C)glu y (^{14}C)man como únicos productos reductivos (Fig. 30 c)) y en una relación 1.89/1. Estos resultados confirmaron que el compuesto era un trisacárido y que muy probablemente se trataba de manosil-celobiosa.

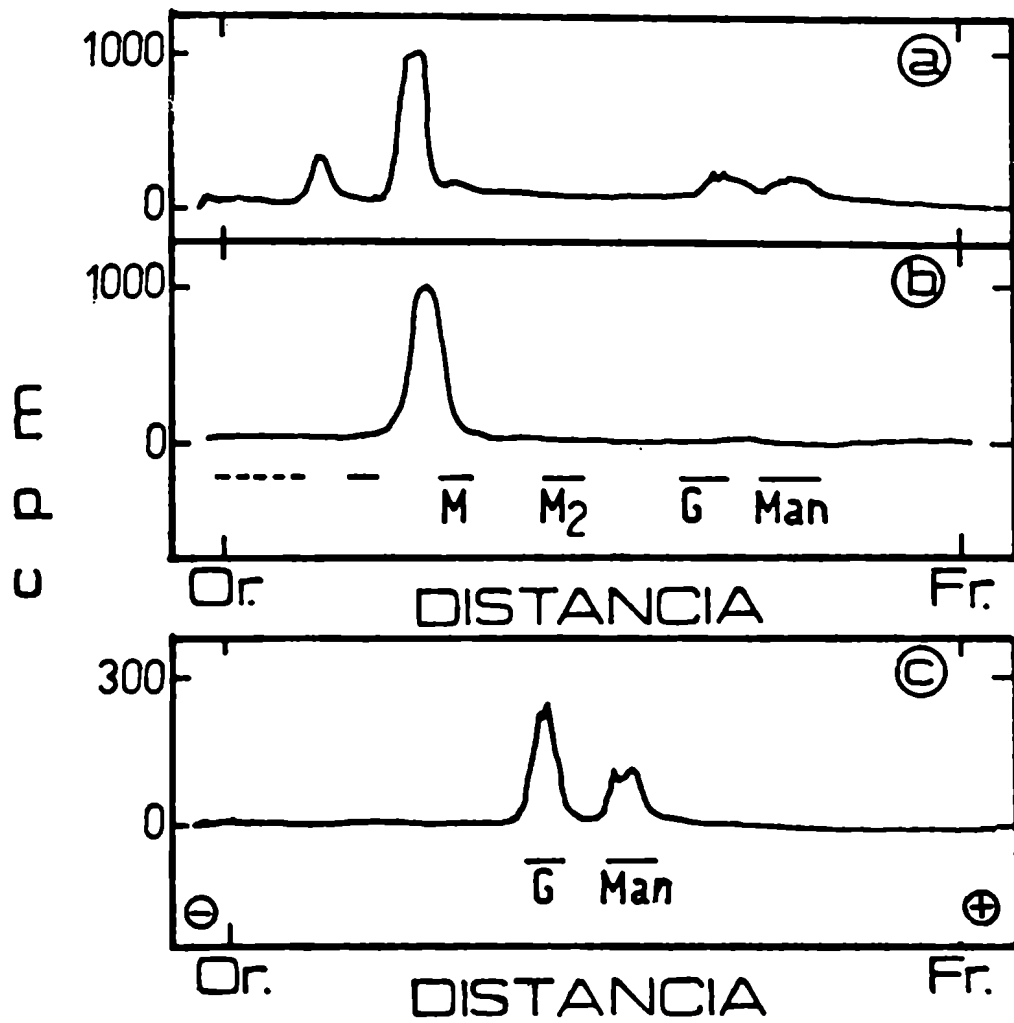


Figura 30: Relación glucosa/manosa en el trisacárido: Se utilizó el sistema de incubación estándar con 190 ug de proteína, 2.500 pmoles de UDP(¹⁴C)glu (268 uCi/umol), 133 pmoles de GDP(¹⁴C)man (226 uCi/umol). Se procesó según método A. El extracto butanólico se sometió a hidrólisis ácida (pH=2, 10 minutos, 100°C) y el producto de ruptura de la misma se analizó por cromatografía en solvente H, a). El trisacárido de a) se eluyó y volvió a cromatografiar en el mismo solvente, b). Este compuesto se eluyó y se sometió a hidrólisis ácida (TFA 0.2N, 2 horas, 100°C). Se eliminó el TFA llevando a seco dos veces y luego se cromatografió en solvente E, c).

4.2.3.6. Determinación de la configuración anomérica de la manosa en el trisacárido.- Esta determinación se hizo en forma un poco

indirecta pues no se disponía en el laboratorio de las glicosidasas necesarias en estado suficientemente puro. Se disponía así de una α -manosidasa parcialmente purificada (sección 3.4.4.) que no actuó sobre el trisacárido marcado ya fuera con (¹⁴C)manosa o con (¹⁴C)glucosa. Como fuente de β -manosidasa se utilizó una emulsina que poseía actividad de α y de β -glucosidasa y de α y β -manosidasa (sección 3.4.3.). Dicha enzima en 24 horas degradó totalmente al trisacárido liberando como únicos productos radioactivos (¹⁴C)manosa o (¹⁴C)glucosa según donde estuviera la marca. Por otra parte se sabía en nuestro laboratorio que en condiciones controladas (sección 3.4.3.) dicha emulsina no actuaba sobre el celobitol. Se redujo entonces el (¹⁴C)glu-trisacárido y se lo sometió a la acción de la enzima. Previamente se verificó por cromatografía (Fig.31 A) y por electroforesis (Fig.31 B) que el compuesto era puro y estaba totalmente reducido. En este último sistema el trisacárido sin reducir permanecería en la zona neutra mientras que el compuesto en cuestión migró.

Tratando con la enzima durante diferentes tiempos, 3 horas 30 minutos (Fig.31 C) y 5 horas 30 minutos (Fig.31 D) se observó for-

mación de celobitol y material sin hidrolizar.

La identidad del celobitol se confirmó por electroforesis (Fig.31 E). Por hidrólisis total del mismo se obtuvo una relación $(^{14}\text{C})\text{glu}/(^{14}\text{C})\text{sorb}$ de aproximadamente 1/1 (Fig.31 F). El hecho de obtener celobitol indicó que el trisacárido era manosil-celobiosa y que muy probablemente dicha manosa estuviera unida en configuración B.

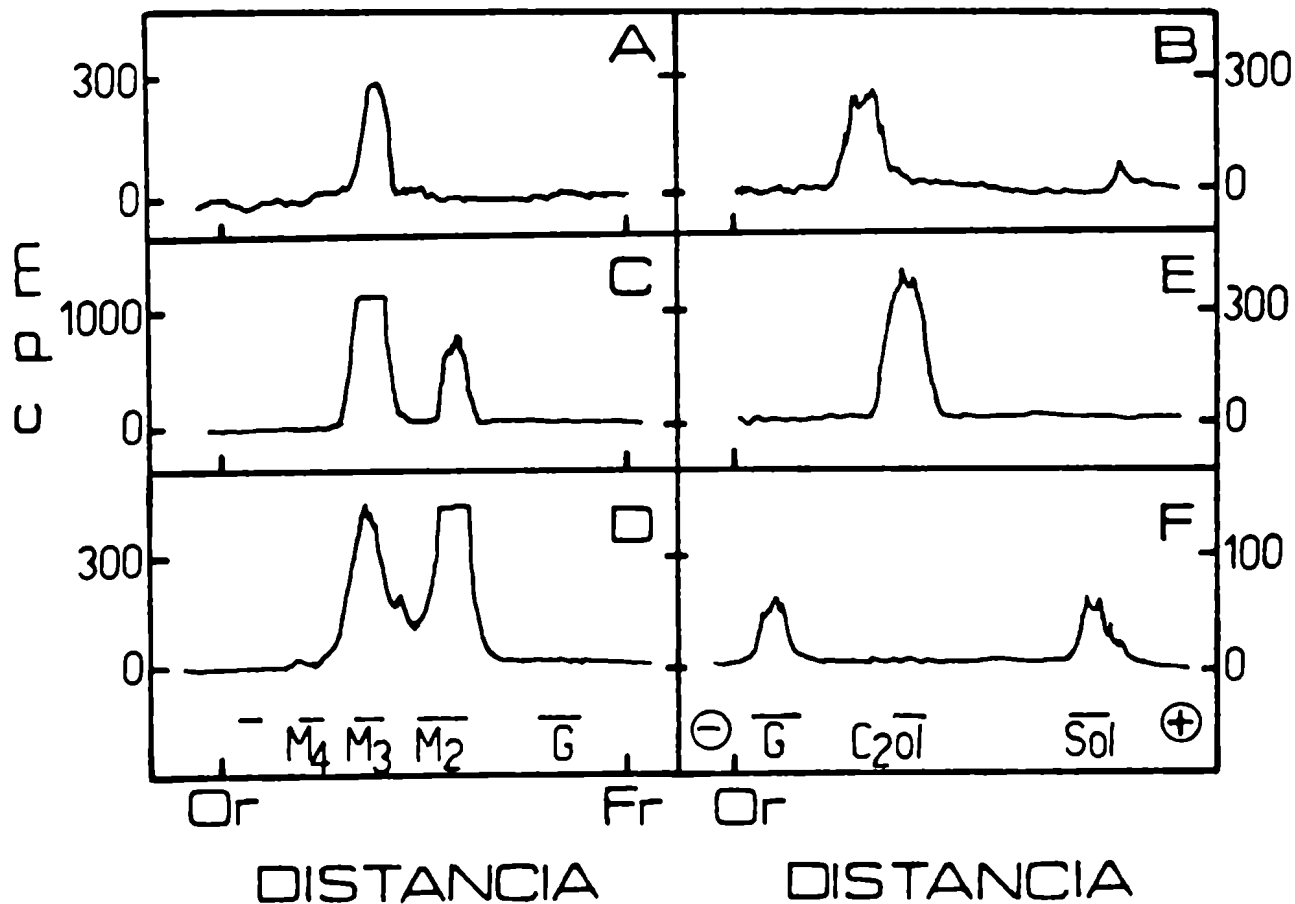


Figura 31: Degradación enzimática de manosil-(^{14}C)celobitol: Se obtuvo manosil-(^{14}C)celobiossa-P-P-prenol mediante incubaciones estándar con 2.500 pmoles de UDP(^{14}C)glu (268 uCi/umol), 2.500 pmoles de GDPman y 280 ug de proteína, 30 minutos a 30°C. Se procesaron según método B. El extracto 1,2,0.3 se hidrolizó en medio ácido y el oligosacárido correspondiente se identificó por cromatografía en solvente H y se eluyó. 40.000 cpm de este material se redujeron con borohidruro, una alícuota del trisacárido reducido se cromatografió en solvente H, A) y otra se electroforetizó en buffer J, E). El resto se trató con emulsina (sección 3.4.2.) 3 horas 30 minutos y 5 horas 30 minutos y se cromatografió en solvente H, C) y D) respectivamente. En ambos casos se observó trisacárido reducido sin degradar y otro pico con la movilidad de celobitol. Este último se eluyó, se dividió en dos partes, una de las mismas se electroforetizó en buffer J tal cual, E) y la restante luego de un tratamiento ácido (TFA 0.2N, 100°C, 2 horas), F).

4.2.3.7. El trisacárido manosil-celobiossa, es lineal o ramificado?.-

Para establecer si la manosa estaba unida a la glucosa del extremo reductor o a la del extremo no reductor de la celobiossa, se preparó trisacárido marcado con (^{14}C)manosa, se lo redujo con borohidruro y se lo sometió a una hidrólisis ácida parcial. El objeto era aislar de los productos de degradación, un disacárido marcado en (^{14}C)manosa y determinar si ésta, estaba unida a la glucosa o al sorbitol.

La hidrólisis parcial produjo los siguientes compuestos (Fig. 32 a): trisacárido sin hidrolizar (35%), manosa libre (59%) y un compuesto X ($R_{\text{glu}}=0.79$) que migró como un disacárido (8%). Por acetólisis de (^{14}C)manosil-celobitol se obtuvo un disacárido X' con rendimiento algo mejor (12%) e idénticas propiedades.

El disacárido X por electroforesis en buffer J (Fig. 32 b) permaneció en la zona neutra de las dihexosas. En este buffer sólo migran los polioles capaces de formar complejos con el molibdato.

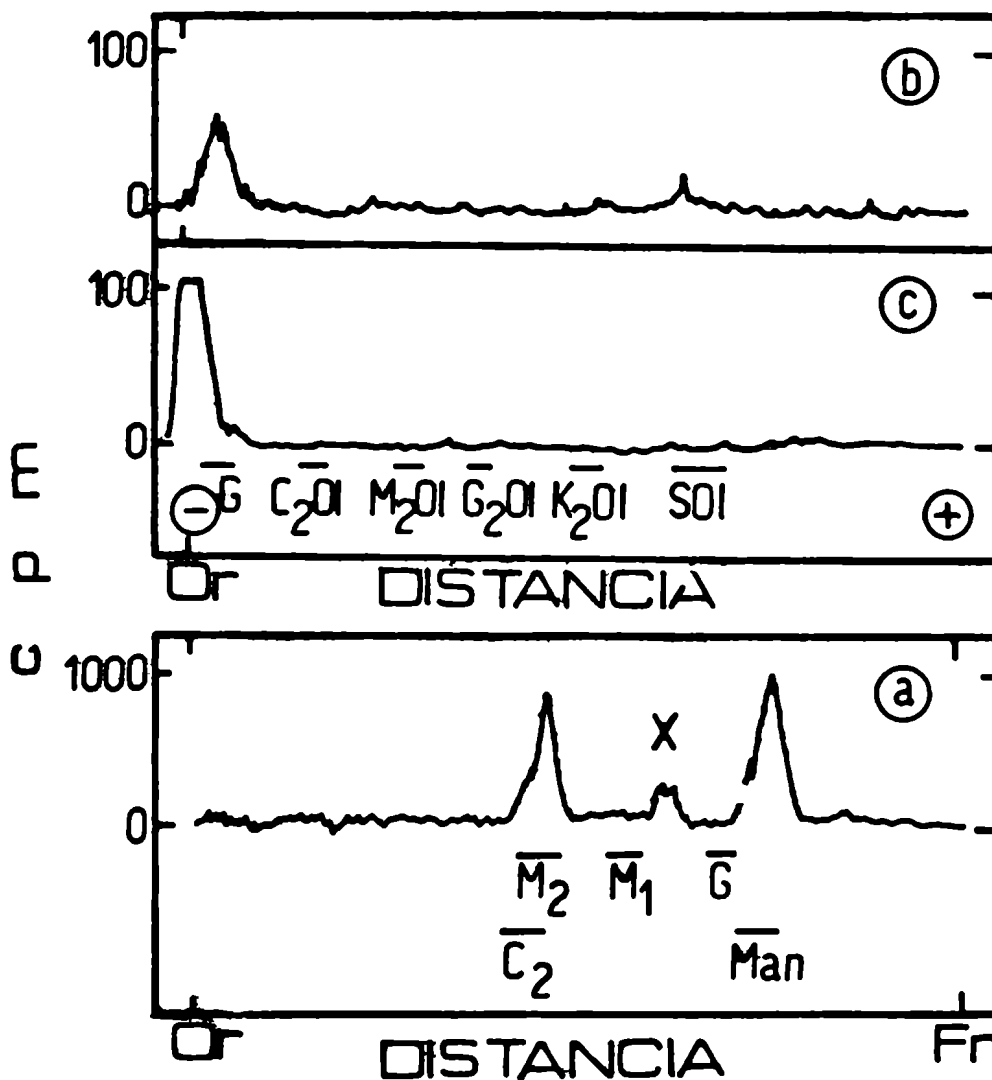


Figura 32: Hidrólisis parcial de (^{14}C)manosil-celobitol: El compuesto se preparó en las condiciones de la Fig.28 (con 2.500 pmoles de UDPglu), 15.000 cpm del mismo se redujeron con borohidruro de sodio, se hidrolizaron luego en sulfúrico 0.1N a 100°C durante 1 hora, se neutralizó con Dowex 1 CO_3H^- y cromatografió en solvente H, a). El compuesto X ($R_{glu}=0.79$) se eluyó y sometió a electroforesis en buffer J, b). Una alícuota del mismo se redujo con borohidruro y se electroforesizó en el mismo buffer, c).

La glucosa libre y oligosacáridos donde la glucosa ocupa el extremo reductor permanecen en la zona neutra, pero si se los reduce, el sorbitol o sorbitol derivado respectivo adquiere cierta movilidad, que depende del tipo de unión al mismo. Si el carbono 3 del sorbitol está ocupado no puede formar complejos y por lo tanto sus derivados no migran (143 al 145).

Como ya se dijo, si el trisacárido era lineal debería obtenerse (^{14}C)manosil-glucosa, si era ramificado, el producto sería (^{14}C)manosil-sorbitol. Estos dos compuestos se podrían distinguir por electroforesis en buffer J como se acaba de ver.

El hecho de que el disacárido X no migrara (Fig.32 b)) introdujo una aparente ambigüedad pues podría tratarse de un manosil-glucosa o manosil(1,3)-sorbitol. Esta ambigüedad desaparece sin embargo pues como ya se vió (Fig.31 B) el trisacárido reducido migra es decir forma complejos, descartando así la posibilidad de una unión glicosídica al carbono 3 de su sorbitol.

En consecuencia y resumiendo se puede afirmar que la manosa no está unida a la glucosa del extremo reductor del trisacárido en base a los siguientes argumentos.

- 1) El carbono 2 de dicha glucosa debe estar libre, porque el trisacárido puede formar su éster fosfórico cíclico que ocupa los carbonos 1 y 2 (sección 4.2.3.2.).
- 2) El carbono 3 debe estar libre porque sino el trisacárido reducido no formaría complejos con el molibdato y por lo tanto no migraría en buffer J (Fig.31 B).

- 3) El carbono 4 está ocupado por la glucosa no reductora.
- 4) El carbono 6 era el único al que la manosa se hubiera podido unir. En este caso el disacárido X hubiera sido manosil-sorbitol, con capacidad para formar un complejo con molibdato y por lo tanto para migrar, pero no fue así (Fig. 32 b)).

Por todo lo dicho se concluyó que el disacárido X era manosil-glucosa y el trisacárido lineal.

4.2.3.8. Determinación de la unión manosa-celobiosa.- Aclarado que el trisacárido era lineal y que la configuración de la manosa era β faltaba determinar a qué carbono de la glucosa no reductora estaba unida la manosa. Las propiedades del disacárido X reducido podrían dar un indicio.

Si la unión era 1-2, 1-4 o 1-6 debería formar complejos con molibdato. Si la unión era 1-3, no.

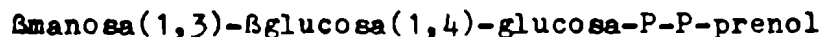
El disacárido X reducido, es decir, (^{14}C)manosil-sorbitol, sometido a electroforesis en buffer J no migró (Fig. 32 c)). Por lo tanto se le pudo asignar la unión 1-3.

Esta conclusión se ratificó por estudios de oxidación con periodato sobre el trisacárido-P-cíclico con marca en las glucosas. Al estar el fósforo esterificando los carbonos 1 y 2 de la glucosa reductora del trisacárido y el carbono 4 de la misma en unión con el extremo reductor de la otra glucosa, se encuentra protegida del ataque por el IO_4^- . La segunda glucosa se protegería de la oxidación únicamente si la manosa se encontrara unida a ella en posición 1-3 como se sospechaba. La manosa a su vez se oxidaría total-

mente.

En la Fig.33 se observa el perfil electroforético del manosil-(^{14}C)celobiosa-P-cíclico utilizado antes, a) y después, b) del tratamiento con IO_4^- . Es importante notar que luego de la oxidación toda la radioactividad se comportó, por este criterio, como un solo compuesto, cargado y de movilidad muy similar o igual al trisacárido-P-cíclico inicial. Este material se eluyó, se trató en medio ácido para abrir el ciclo del fosfato y se incubó con fosfatasa alcalina. En forma análoga se procedió con el trisacárido-P-cíclico inicial sin oxidar. Ambos productos se analizaron por cromatografía, en este último caso se observó trisacárido libre (Fig.33 c)). En el tratado con IO_4^- , en cambio, sólo se observó celobiosa lo que confirmó la unión 1-3 de la manosa a la celobiosa.

La estructura del compuesto II debe ser, con toda probabilidad:



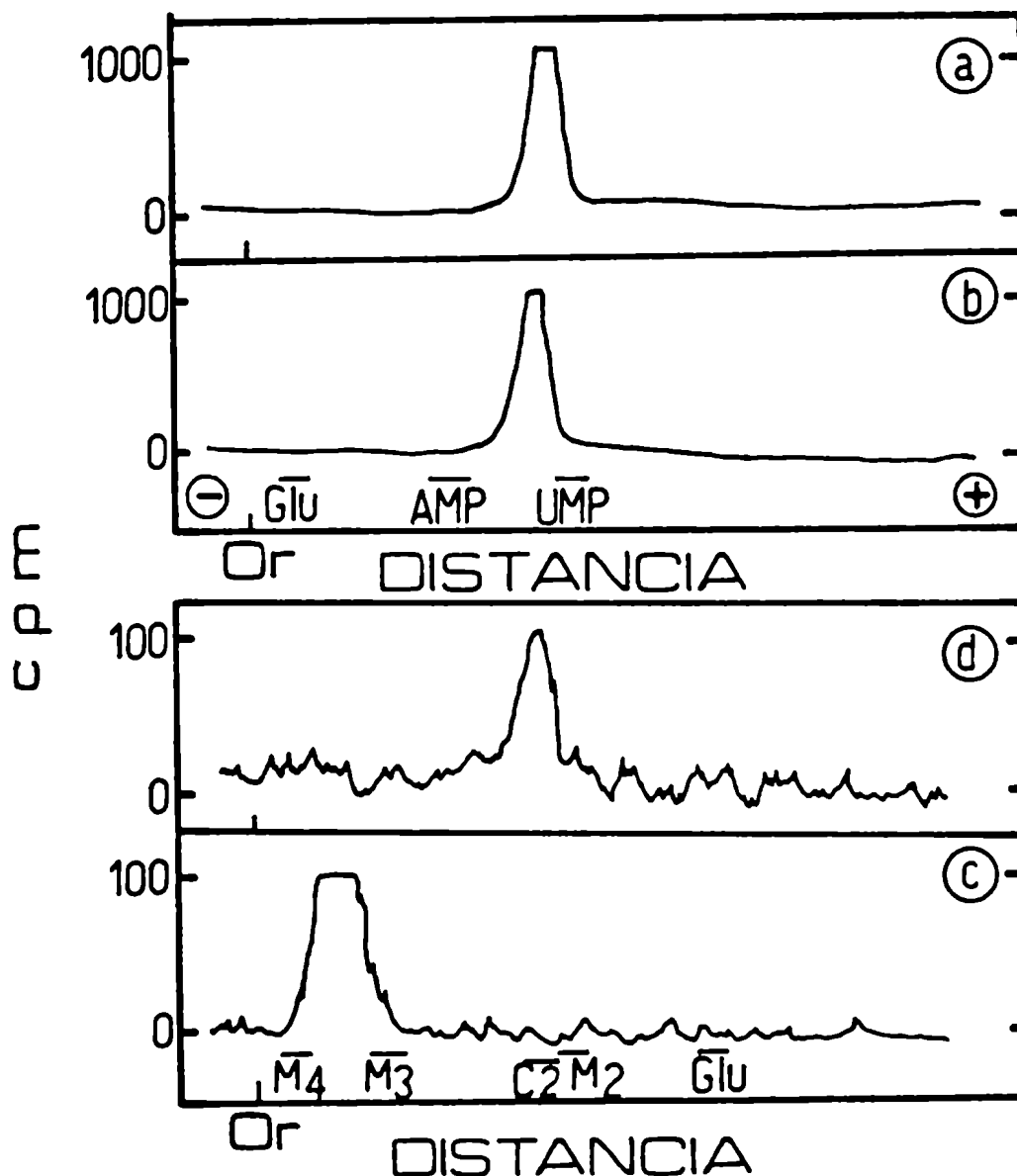
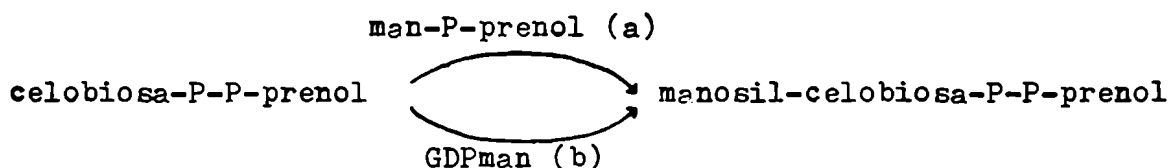


Figura 33: Tratamiento con IO_4^- de manosil- (^{14}C) celobiosa-1,2-P-cíclico: El manosil- (^{14}C) -celobiosa-P-P-prenol se obtuvo mediante 5 incubaciones estándar con 240 μg de proteína, 51 μM UDP(^{14}C) glu y 7,1 μM GDPman, llevadas a cabo 30 minutos a 30°C . Las mismas fueron procesadas según el método A, y los extractos butanólicos combinados se cromatografiaron en solvente C para obtener manosil- (^{14}C) celobiosa-1,2-P-cíclico. El material eluido de la cromatografía se dividió en dos partes de 20.000 cpm cada una. Una de las mismas se electroforesizó en buffer I tal cual, a); la otra se electroforesizó en el mismo buffer luego del tratamiento con IO_4^- , b) (sección 3.3.7.).

Los compuestos radioactivos de a) y b) se eluyeron, se hidrolizaron en medio ácido (HCl 0.1N, 10 minutos, 100°C), se trataron con fosfatasa alcalina y se cromatografiaron en solvente H: c) y d) respectivamente.

4.2.3.9. Dador de la manosa del trisacárido.- Aclarada la estructura del compuesto quedaba por dilucidar si la manosa entraba vía man-P-prenol, que se forma simultáneamente en la incubación, o vía GDPman.



Con el objeto de determinar si la formación del trisacárido-P-P-prenol respondía al esquema (a) se realizaron incubaciones utilizando como sustrato exógeno (^{14}C)man-P-prenol en presencia de UDPglu no radioactivo y de distintas concentraciones de Tritón X-100. Una vez procesado los incubados se obtuvo en la fase butanólica el (^{14}C)man-P-prenol sin modificar; en ningún caso se detectó (^{14}C)manosil-celobiosa-P-P-prenol.

Como en general son bastante delicados los experimentos en que se utilizan como sustrato un azúcar-P-prenol agregado en forma exógena, se realizaron incubaciones en dos etapas.

En una primera etapa se incubó con GDP(^{14}C)man para acumular (^{14}C)man-P-prenol. En una segunda etapa se incubó con UDPglu para formar celobiosa-P-P-prenol (no radioactivo) y para ver si aceptaba (^{14}C)man cedido por el (^{14}C)man-P-prenol formado en la primera incubación. Para verificar que las enzimas continuaban siendo activas se hizo también un control agregando GDP(^{14}C)man, además de

UDPglu, en la segunda etapa.

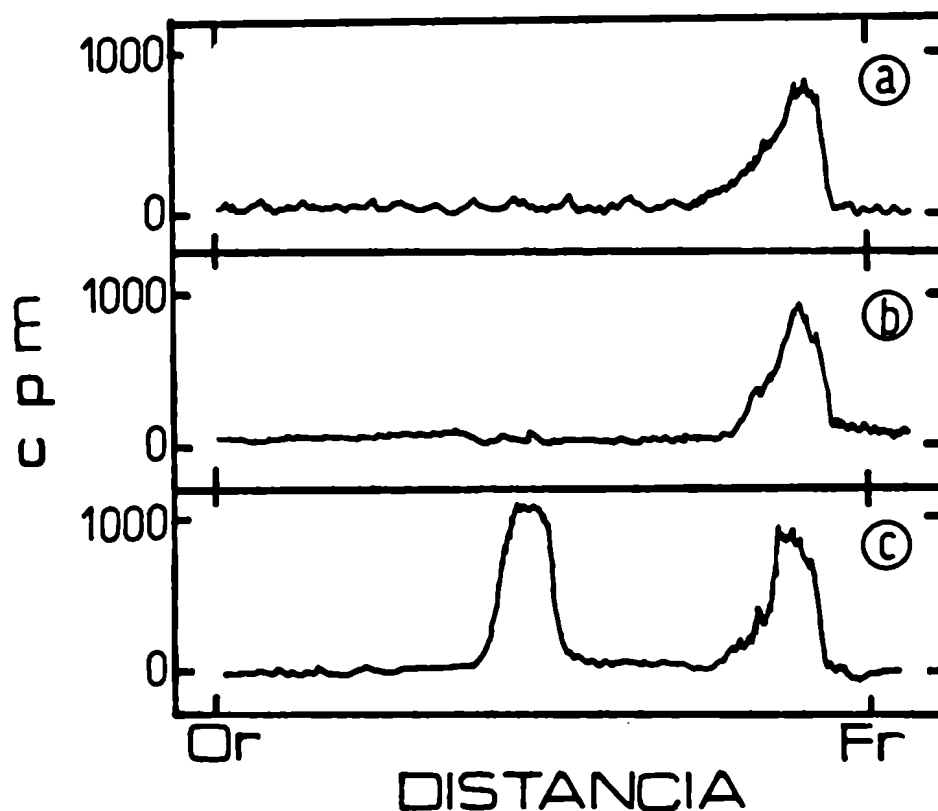


Figura 34: Formación de trisacárido-P-P-manol a partir de (^{14}C)man-P-prenol: Se realizó una incubación en dos etapas en escala x tres; en la primera se incubó 1 hora a 30°C en presencia de 10.240 pmoles de $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$ (227 uCi/ μmol) y 920 μg de enzima. Se procesó según método C y la resuspensión se dividió en tres partes iguales. Una se reincubó tal cual, a); a otra se le adicionó 20 nmoles de UDPglu, b); a la tercera se le adicionó 20 nmoles de UDPglu y 3.4 nmoles de $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$, c). Las tres alícuotas se reincubaron 30 minutos a 30°C , se procesaron según método C1 y los extractos butanólicos se cromatografiaron en solvente D.

Se observó (Fig.34) que el (^{14}C)man sintetizado en la primera etapa, quedó inalterado luego de la reincubación ya fuera que esta

se realizara en ausencia, a) o en presencia, b) de UDPglu.

En c), al agregarse $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$ y UDPglu hubo formación de $(^{14}\text{C})\text{man-celobiosa-P-P-prenol}$, lo que indicó que la no formación de este compuesto en b) no se debió a que las enzimas se hubieran inactivado durante el proceso. Estos resultados parecieron indicar que el dador de la manosa era el GDPman y no el man-P-prenol . El estudio inverso confirmó este enfoque.

Se sintetizó en una primer incubación $(^{14}\text{C})\text{celobiosa-P-P-prenol}$ y se estudió qué efecto causaba reincubar en presencia de GDPman .

Puede apreciarse en la Fig.35 que el $(^{14}\text{C})\text{celobiosa-P-P-prenol}$ acumulado en la primer incubación, a); se transformó totalmente en $\text{manosil-}(^{14}\text{C})\text{celobiosa-P-P-prenol}$ al reincubarlo en presencia de GDPman , b).

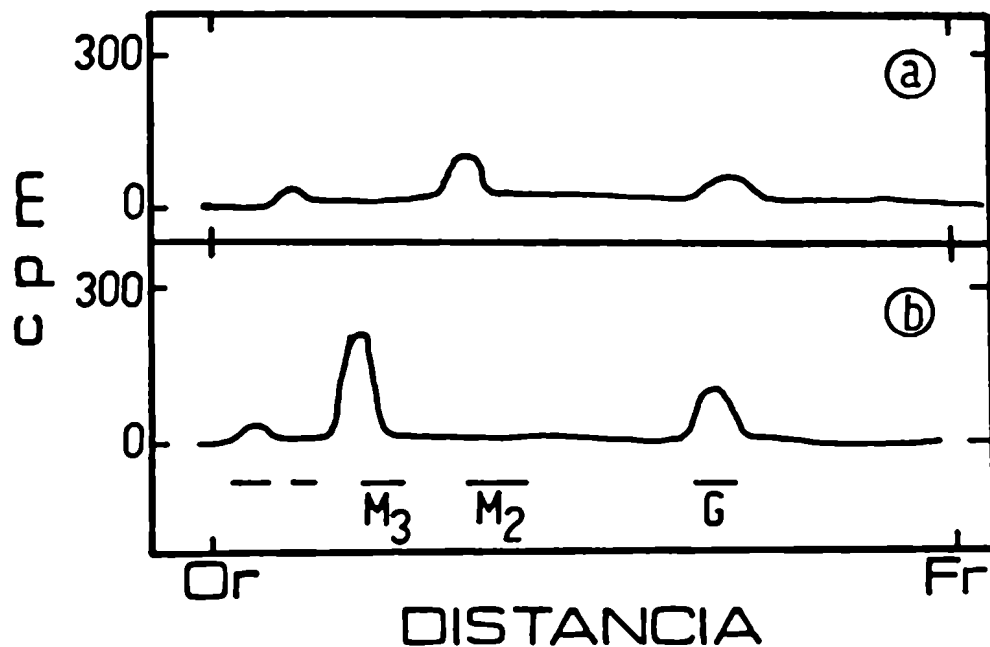


Figura 35: Síntesis de man-(^{14}C)celobiosa-P-P-prenol en dos etapas: Se utilizó la mezcla de incubación estándar en doble escala. Se incubó en una primera etapa 30 minutos a 30°C en presencia de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{glu}$ (2.5 nmoles), se procesó según método C y la resuspensión se dividió en dos partes; una se reincubó tal cual, a) y la otra en presencia de GDPman (2.5 nmoles), b). Luego de reincubar las dos alícuotas 30 minutos a 30°C , ambas se procesaron según método C1, los extractos butanólicos se sometieron a hidrólisis ácida suave y los productos hidrosolubles de dicho tratamiento se cromatografiaron en solvente H.

Finalmente utilizando como sustrato radioactivo (^{14}C)cel-P-P-prenol agregado en forma exógena en presencia de detergente, se realizaron incubaciones en ausencia y en presencia de GDPman .

El (^{14}C)cel-P-P-prenol que se utilizó no era puro sino que contenía pequeñas cantidades de (^{14}C)trisacárido-P-P-prenol y (^{14}C)glucosa-P-P-prenol (Fig.36 a)).

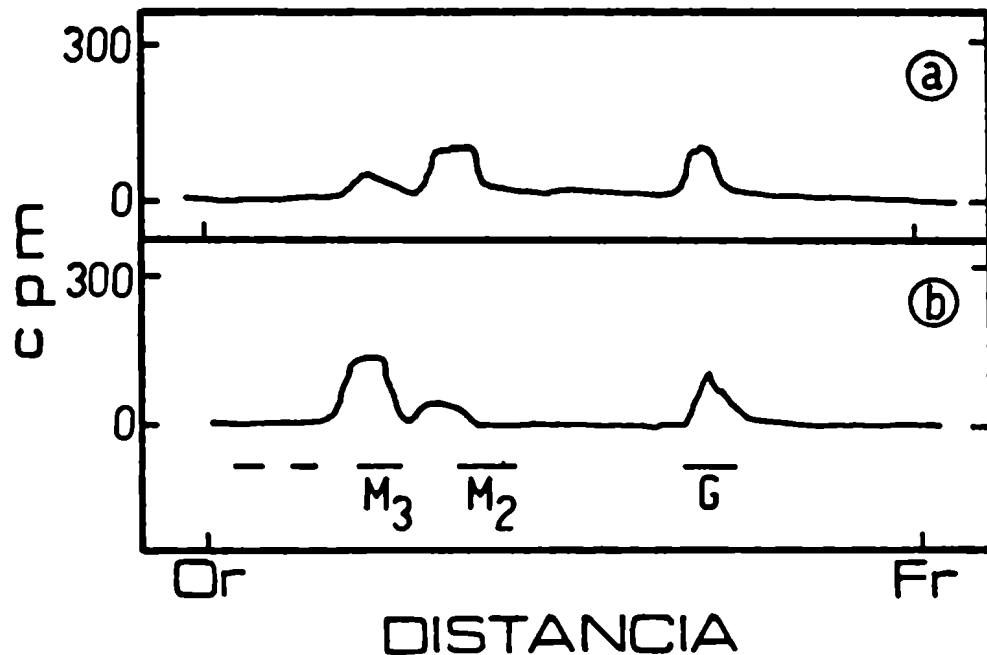
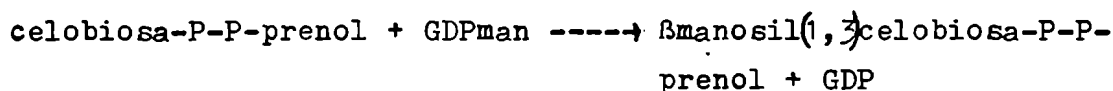


Figura 36: Formación de man-(¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol a partir de (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol y GDPman: Se obtuvo (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol mediante 5 incubaciones estándar utilizando 2.5 nmoles de UDP(¹⁴C)glu (227 uCi/umol) y 300 ug de enzima, 30 minutos a 30°C. Se procesó según método A y los extractos butanólicos se combinaron. El material obtenido contenía (¹⁴C)glu-P-P-prenol y algo de (¹⁴C)glu-trisacárido-P-P-prenol. Dos alícuotas de 10.000 cpm cada una de dicho material se resuspendieron en la mezcla de incubación estándar con una concentración final 0.04% de Tritón X-100. Ambos tubos se incubaron 30 minutos a 30°C, a) tal cual y b) en presencia de 2 nmoles de GDPman. Se procesaron según método A. El extracto butanólico se sometió a hidrólisis ácida suave y los productos hidrosolubles se cromatografiaron en solvente H.

Se puede observar (Fig.36 b)) que parte de (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol presente en a) se transformó en manosil-(¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol, confirmando todo lo visto anteriormente.

La ecuación de síntesis de este último compuesto puede entonces representarse así:



En resumen, en este capítulo se demostró:

- a) La síntesis de manosil-β-P-prenol a partir de GDPman en preparados enzimáticos de *Acetobacter xylinum*.
- b) La incorporación de manosa sobre celobiosa-P-P-prenol en preparados enzimáticos de la misma bacteria a partir de GDPman.

Este último punto nos permite, por un lado encontrar una función para el celobiosa-P-P-prenol y por otra parte aclarar la formación del trisacárido-P-P-prenol que se producía con algunas preparaciones enzimáticas al incubarse con UDP(¹⁴C)glu. Posiblemente dichas preparaciones enzimáticas poseían GDPman endógeno que no

se había eliminado totalmente durante el proceso de lavado de la enzima. El " ^{14}C trisacárido" era pues manosil- (^{14}C) celobiosa cuya síntesis ha quedado aclarada en este capítulo.

4.3. Incorporación de ácido glucurónico

4.3.1. Generalidades

Como se comentó en la sección 2.1., al realizar incubaciones estándar con UDP(^{14}C)glucónico como sustrato se obtenían dos productos radioactivos de distintas características entre sí. Utilizando el método B de análisis de las mismas se extraía en el butanol el compuesto que denominamos "lípico-glucurónico" (se verá en sección 4.6.) y en el solvente 1,2,0.3 el otro de los compuestos, el cual va a ser objeto de nuestro estudio en éste capítulo.

Utilizando como sustrato UDP(^{14}C)glucónico se hizo una curva

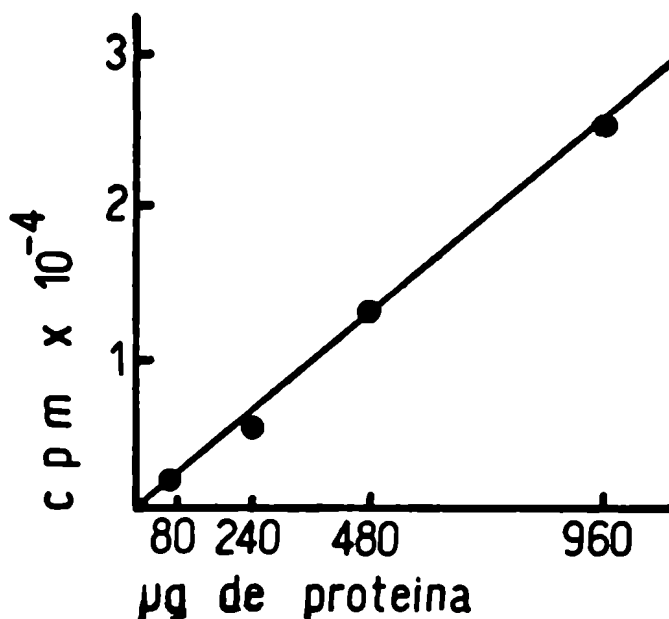


Figura 37: Incorporación de radioactividad a solvente 1,2,0.3: Cada punto de la figura corresponde a una incubación estándar de 30 minutos a 30°C utilizando 528 pmoles de UDP(¹⁴C)glucico (309 uCi/umol) y las cantidades de proteína indicadas en cada caso. Los incubados se procesaron según método B y se midió radioactividad en solvente 1,2,0.3.

incorporación de radioactividad a material soluble en solvente 1,2,0.3 en función de la cantidad de enzima presente en la incubación (Fig.37). Se encontró una relación lineal entre la radioactividad incorporada y la cantidad de enzima utilizada, en el rango de proteínas con que se trabajó. El producto de incorporación fue analizado por varios criterios (Fig.38).

Sometido a electroforesis en buffer I quedó en el lugar de siembra como sucede con los lípido-azúcares (Fig.38 a)).

Migró con un $R_f=0.3$ por cromatografía en solvente D (Fig.38 b)), pero el medio alcalino del solvente produjo la ruptura del compuesto pues se pudo eluir perfectamente con agua luego de la corrida.

Sometido a una hidrólisis ácida suave, el 100% de la radioactividad pasó a ser soluble en agua.

Los productos de ruptura alcalina y ácida se electroforetizaron en buffer I (Fig.38 c) y d), respectivamente), ambos se comportaron como aniones mostrando ser distintos entre sí y a su vez distintos al material de partida (comparar a), c) y d)).

Estas propiedades hacen recordar a los compuestos del tipo azúcares-P-P-lípido. Teniendo en cuenta esta premisa, el material de partida sería un oligosacárido-P-P-lípido, el producto de la

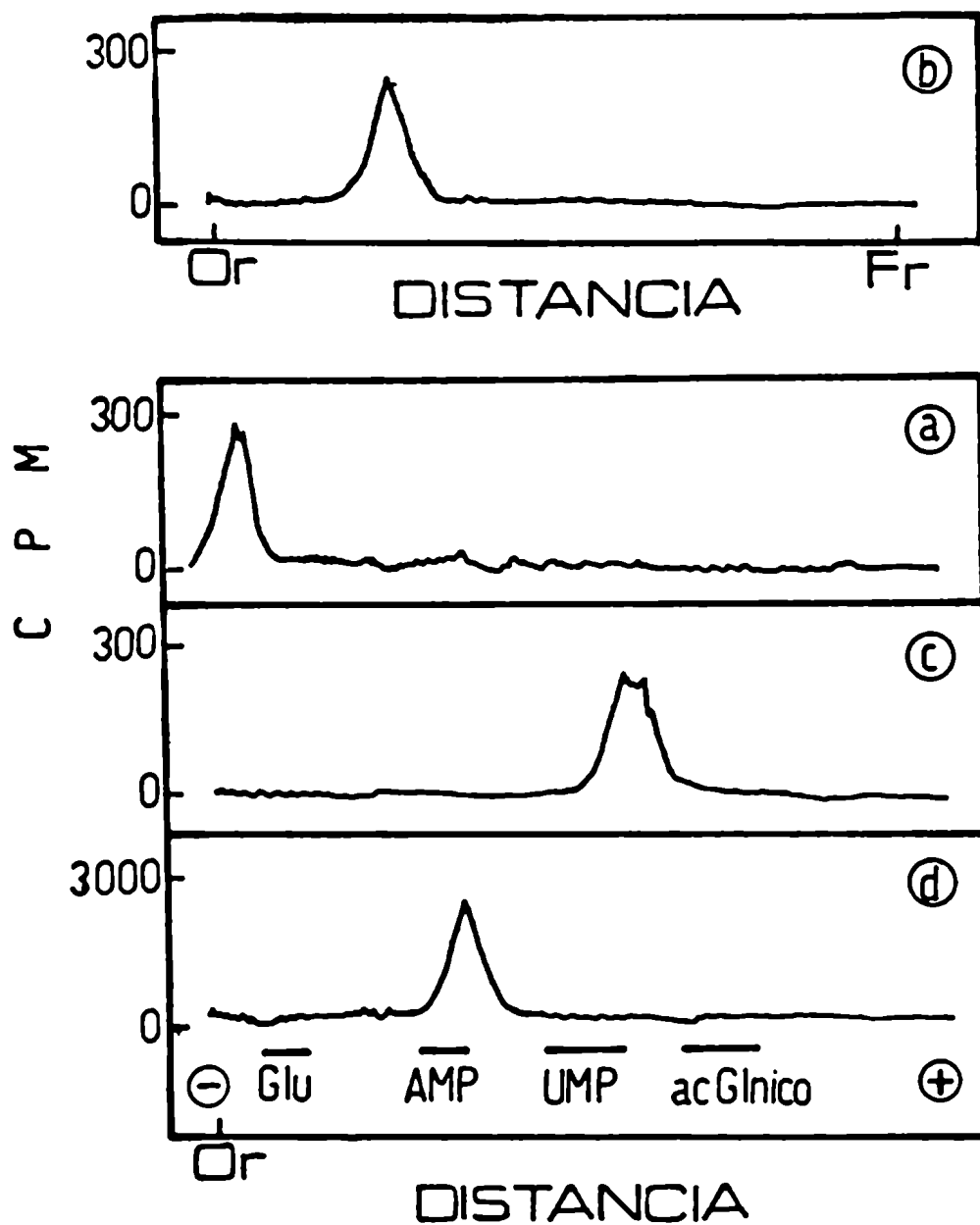
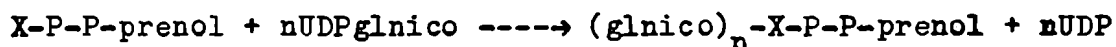


Figura 38: Análisis de la radioactividad incorporada en solvente 1,2,0.3: Se obtuvo el compuesto liposoluble marcado en ^{14}C glnico en las condiciones de la Fig.37, utilizando 360 ug de proteína. La radioactividad incorporada en solvente 1,2,0.3 se analizó por los siguientes criterios.

- Electroforesis en buffer I.
- Cromatografía en solvente D.
- Electroforesis en buffer I del compuesto eluido de b).
- Hidrólisis ácida suave y electroforesis en buffer I del producto hidrosoluble obtenido (100%).

hidrólisis ácida el oligosacárido libre y el producto de hidrólisis alcalina el oligosacárido-P-cíclico. Una comprobación de este esquema surge del hecho que el presunto oligosacárido-P-cíclico es sustrato de la fosfatasa alcalina para dar el oligosacárido libre sólo si se trató previamente con ácido, pH=1, 10 minutos, 100° C (datos no mostrados).

Cabe acotar también que el producto de la hidrólisis ácida tenía movilidad distinta de la del ácido glucurónico (Fig.38 d)), por lo tanto unido al lípido mediante un pirofosfato debería haber más de un azúcar. Este compuesto se podría haber originado mediante una reacción del tipo:



4.3.2. Obtención de $(\text{glnico})_n\text{-X-P-P-prenol}$ con marca en otros azúcares

4.3.2.1. Obtención del compuesto con marca en manosa.- El hecho de que el ácido glucurónico se incorporara sobre un aceptor del tipo oligosacárido-P-P-lípido nos hizo pensar en la posibilidad de que dicho aceptor (presente en las preparaciones enzimáticas) fuera igual a alguno de los compuestos cuya "síntesis de novo" habíamos estudiado.

El candidato más firme, puesto que su ulterior destino no conocíamos era el menosil-celobiosa-P-P-prenol. Los experimentos más obvios que surgían para confirmar o descartar esta hipótesis eran incubar en presencia de UDPglu, GDPman y UDPglnico, para tratar de

obtener $(\text{glnico})_n\text{-X-P-P-prenol}$ con marca en manosa o en glucosa. Sin embargo al realizar tales incubaciones se obtuvo un compuesto extraíble por solvente 1,2,0.3 con características distintas al buscado pues, como se verá más adelante, era de tamaño mayor. Hasta ese momento se pensaba que el compuesto obtenido a partir de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{glnico}$ en presencia o en ausencia de UDPglu era el mismo (sección 2.1.).

Surgió entonces la posibilidad de que el $(\text{glnico})_n\text{-X-P-P-prenol}$ se sintetizara en estas condiciones, pero que no se acumulara, pues a su vez serviría de aceptor a otros azúcares obteniéndose un producto distinto. Pareció razonable entonces que la presencia de UDPglu en la incubación fuera la responsable de la obtención de dicho compuesto.

Una posibilidad para sintetizar $(\text{glnico})_n\text{-X-P-P-prenol}$ con marca en manosa sin la presencia de UDPglu en la incubación, sería hacer uso de los aceptores endógenos. Recordando que se podía formar trisacárido sin agregado de UDPglu (algunas preparaciones enzimáticas lo hacían en cantidad apreciable) se intentó incubar simultáneamente con $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$ y UDPglnico e investigar los productos formados.

En la Tabla 7 A), se observa que si bien la cantidad de trisacárido-P-P-prenol obtenida fue pequeña, A_1 , al incubar simultáneamente con UDPglnico se obtuvo otro compuesto con propiedades de $\{(^{14}\text{C})\text{manosæ}\}(\text{glnico})_n\text{-X-P-P-prenol}$ a expensas de la desaparición del primero, A_2 .

Otra posibilidad que surgió fue realizar una incubación en dos etapas, de la siguiente manera:

1^a etapa: Sustratos utilizados; UDPglu y GDP(¹⁴C)man.

2^a etapa: Sustrato utilizado; UDPglnico no radioactivo.

En la primera etapa, de acuerdo a lo ya estudiado, debería sintetizarse manosil-celobiosa-P-P-prenol con marca en manosa. Dicho compuesto debería servir de aceptor de ácido glucurónico en la reincubación (en presencia de UDPglnico no radioactivo) obteniéndose (glnico)_n-X-P-P-prenol. La diferencia fundamental respecto de incubar con los tres nucleótidos simultáneamente reside en el lavado entre las dos incubaciones que elimina el exceso de nucleótidos utilizados en la primera, de manera que no esten presentes en la segunda.

En la Tabla 7 B) se aprecia claramente que prácticamente todo el compuesto formado en la primera incubación (B₁ es un control análogo a B₂ pero sin reincubar) sirvió de sustrato para la incorporación de ácido glucurónico en la reincubación, B₂.

El experimento C) de la Tabla 7, muestra otra forma de obtener (glnico)_n-X-P-P-prenol en dos etapas, con una pequeña variación. En la primera etapa se incubó con UDPglu no radioactivo para sintetizar celobiosa-P-P-prenol, que en la reincubación sirvió de sustrato para la entrada de (¹⁴C)manosa en C₁, y de (¹⁴C)manosa y ácido glucurónico en C₂.

Si se compara el experimento C con el A se observa que la diferencia de incorporación se puede justificar por un bajo nivel de

Tabla 7: Síntesis de (^{14}C)man(glnico-X-P-P-prenol)

	<u>1^a etapa</u>	<u>2^a etapa</u>	<u>(^{14}C)man-cel-P-P-prenol</u> <u>pmoles</u>	<u>(^{14}C)man(glnico-X-P-P-prenol)</u> <u>pmoles</u>
Exp A	A ₁	GDP(^{14}C)man	1	
	A ₂	{ GDP(^{14}C)man UDPglnico		1
Exp B	B ₁	{ UDPglu GDP(^{14}C)man	31	
	B ₂	{ UDPglu GDP(^{14}C)man	UDPglnico	29
Exp C	C ₁	UDPglu	GDP(^{14}C)man	23
	C ₂	UDPglu	{ GDP(^{14}C)man UDPglnico	24

Las incubaciones simples (Experimento A) se hicieron en las condiciones estandard, con 280 ug de proteína, 133 pmoles de GDP(^{14}C)man (227 uCi/umol) en ausencia, A₁, y en presencia, B₁, de 2.500 pmoles de UDPglnico durante 1 hora a 30°C.

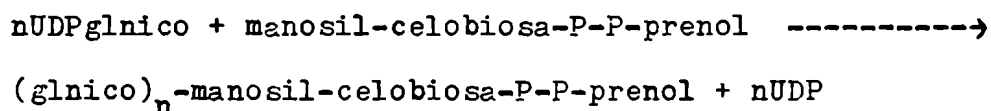
Las incubaciones en dos etapas se hicieron de dos maneras diferentes: en el Experimento B, se hizo una incubación estandard en escala doble (480 ug de proteína, 266 pmoles de GDP(^{14}C)man y 10 nmoles de UDPglu) durante 30 minutos a 30°C. El precipitado resuspendido se dividió en dos y una parte se reincubó durante 30 minutos tal cual, B₁, y la otra con el agregado de 2.5 nmoles de UDPglnico, B₂.

En el Experimento C también se hizo una incubación estandard en escala por dos pero sólo con 10 nmoles de UDPglu y 560 ug de proteína. El precipitado resuspendido se dividió en dos y se reincubó, durante 30 minutos; en presencia de 133 pmoles de GDP(^{14}C)man solamente, C₁, o con el agregado adicional de 2.5 nmoles de UDPglnico, C₂.

En todos los casos se procesó por el método B y se analizaron los productos extraídos con solvente 1,2,0.3 en solvente D.

aceptor endógeno (celobiosa-P-P-prenol) en el preparado enzimático.

Puede concluirse que el oligosacárido que denominamos X era manosil-celobiosa y que la ecuación planteada en la sección 4.3.1. puede resumirse ahora de la siguiente manera:



4.3.2.2. Obtención del compuesto con marca en glucosa.- Como una evidencia más de que el oligosacárido X era manosil-celobiosa, se sintetizó $(\text{glnico})_n\text{-manosil-}(^{14}\text{C})\text{celobiosa-P-P-prenol}$ siguiendo un esquema clásico de incubación en dos etapas similar al desarrollado para obtener el mismo compuesto con marca en manosa (Fig.39).

En una primera etapa se incubó en presencia de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{glu}$ y GDPman con el objeto de obtener $\text{manosil-}(^{14}\text{C})\text{celobiosa-P-P-prenol}$, y luego de eliminar el exceso de nucleótidos se reincubó con y sin UDPglnico frío.

En la Fig.39 se muestran los perfiles electroforéticos correspondientes a los oligosacáridos provenientes de los lípido-azúcares obtenidos en ausencia, a) y en presencia de UDPglnico , b).

En el primer caso, a), se observa un pico neto de radioactividad en la zona de los compuestos neutros (probable mezcla de $(^{14}\text{C})\text{glu}$, $(^{14}\text{C})\text{cel}$ y $\text{manosil-}(^{14}\text{C})\text{cel}$), y dos picos mucho más pequeños (ver nota).

En presencia del nucleótido, en cambio, se ven dos picos radioactivos principales, b). El mayor de los mismos migra con un $R_{\text{UMP}} =$

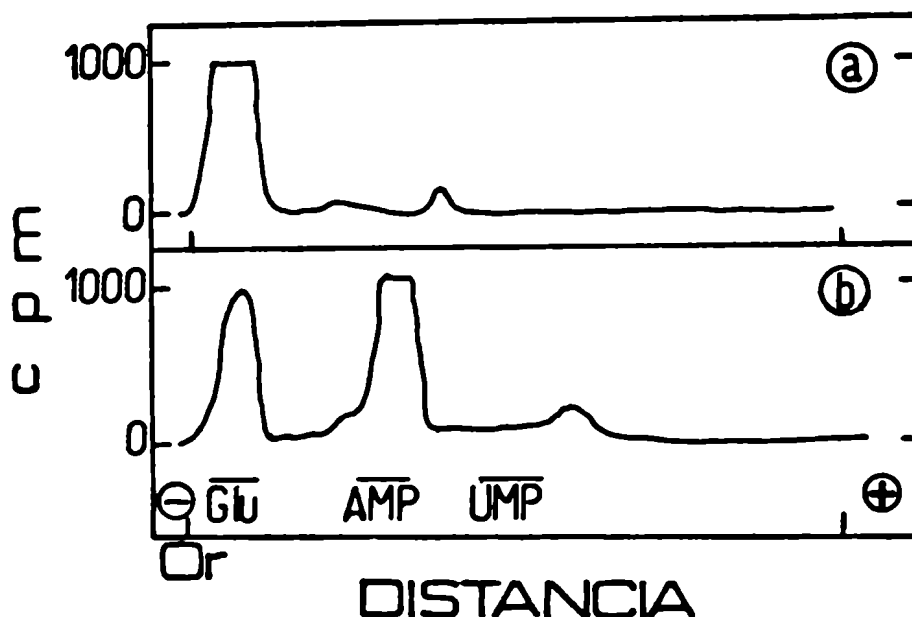


Figura 39: Síntesis de (glnico)_n-manosil-(¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol: Se realizaron dos incubaciones estándar con 80 ug de enzima de Wossal, 2.500 pmoles de UDP(¹⁴C)glu (309 uCi/umol) y 2.500 pmoles de GDPman, 30 minutos a 30°C. Se pararon ambas reacciones con EDTA y se reincubó siguiendo el procedimiento C. Ambos tubos se reincubaron 30 minutos a 30°C, el a) sin agregado de nucleóticos y el b) con el agregado de 2.500 pmoles de UDPglnico. Se procesaron según el método C₂, se le hizo hidrólisis ácida suave al extracto B, y se electroforetizó en buffer I.

0.7, la movilidad del (glnico)_n-manosil-celobiosa buscado. Concorde con este hecho vemos que el otro pico radioactivo importante, que está ubicado en la zona neutra, bajó ostensiblemente comparado con el del perfil a).

Estos resultados confirman la estructura asignada anteriormente ya que hemos podido obtener el (glnico)_n-manosil-celobiosa-P-P-prenol alternativamente con marca en cualquiera de los tres azúcares que lo componen.

Nota: Los picos radioactivos de $R_{UMP}=0.8$ (Fig.39 a)) y $R_{UMP}=1.1$ (Fig.39 b)) corresponden respectivamente a manosil- (^{14}C) celobiosa-2P y glnico-manosil- (^{14}C) celobiosa-2P. La razón de la existencia de los mismos es que los oligosacáridos-P-P-lípido son muy sensibles al manipuleo y se pueden romper en parte dando los ésteres fosfóricos cíclicos correspondientes; la hidrólisis ácida suave posterior rompe la unión del fosfato al C1 (hemiacetalico) y se convierten en los respectivos oligosacáridos-2P. Los picos radioactivos que aparecen en ambos perfiles de la misma figura con $R_{UMP}=0.5$ serán interpretados en el capítulo siguiente.

4.3.3. Estructura del (glnico)_n-manosil-celobiosa

Una vez demostrado que el aceptor del ácido glucurónico era el manosil-celobiosa-P-P-prenol faltaba dilucidar el número de moléculas de ácido glucurónico que entraban sobre el mismo y sobre cuál o cuáles de los azúcares se producían las uniones.

Para tener una idea del tamaño del oligosacárido, se recurrió en primer término a la filtración por geles. Por cromatografía en Biogel P-2 se obtuvo el perfil radioactivo de la Fig.40. Tomando en comparación los marcadores utilizados, el (^{14}C) oligosacárido eluyó de la columna con un volumen que correspondería aproximadamente a un hexasacárido, para ello deberían entrar tres moléculas de ácido glucurónico sobre el trisacárido. Pero se pensó que el ácido glucurónico, por tener un carboxilo en su molécula, podría interaccionar con el material de la columna distorsionando el volumen de elución del oligosacárido.

Para confirmar o descartar esta posibilidad se hizo una colum-

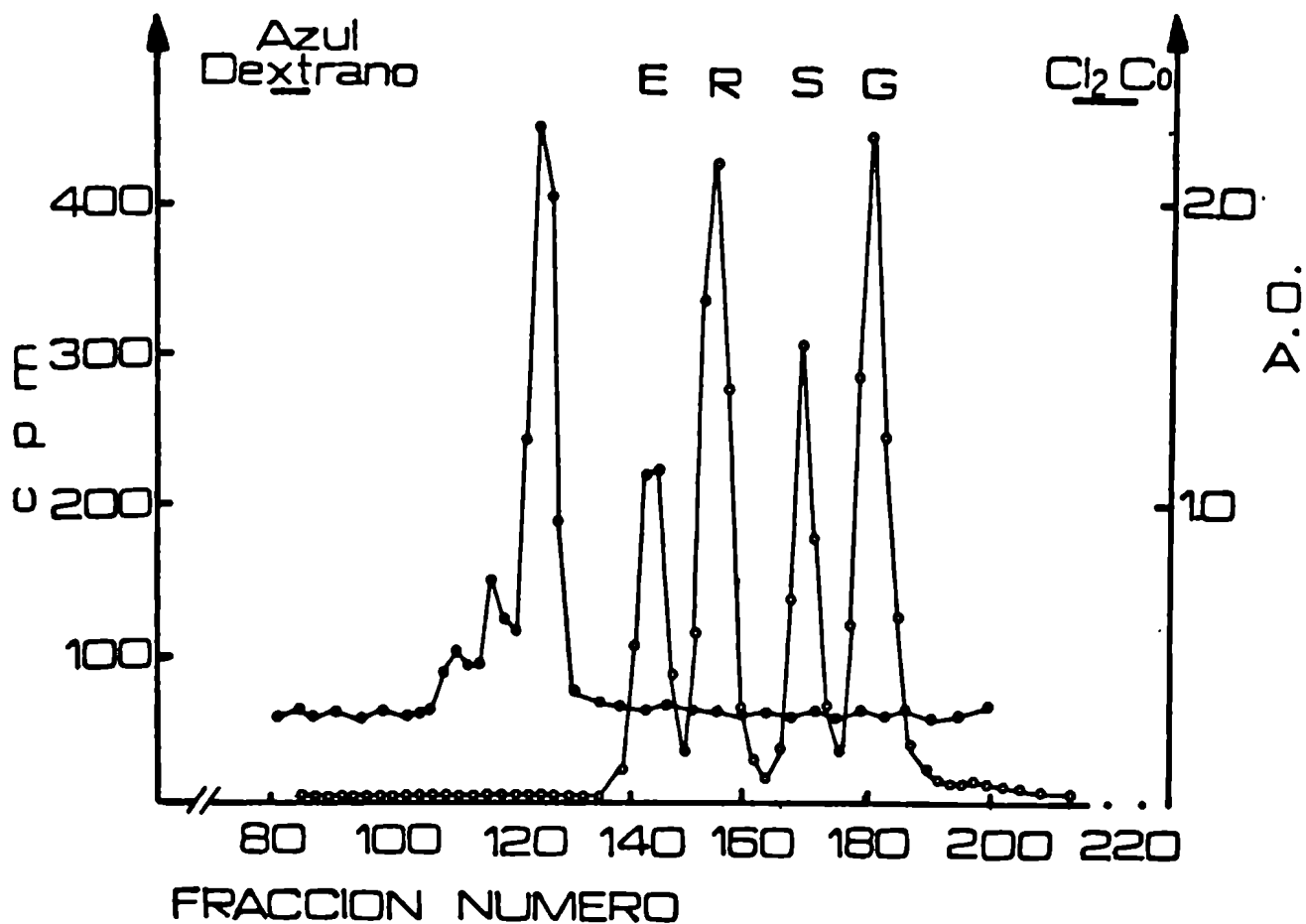


Figura 40: Cromatografía en columna de Biogel P-2 de (¹⁴C)(glucosil)manosil-celobiosa: Se utilizaron 10.000 cpm del compuesto. La columna se desarrolló como se indica en sección 3.5.2..

E= estaquiosa.

R= rafinosa.

S= soforosa.

G= glucosa.

●—● = radioactividad.

○—○ = fenol-sulfúrico.

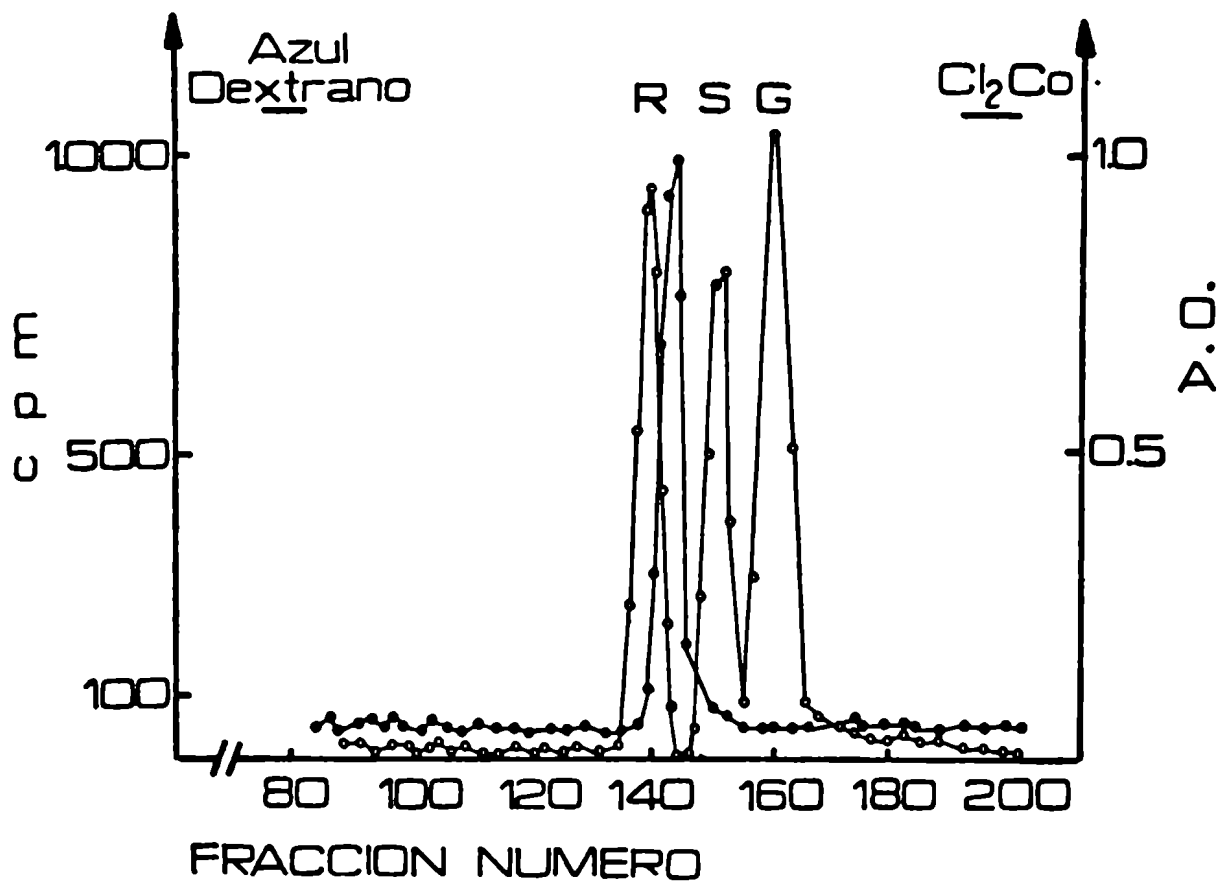


Figura 41: Cromatografía de (¹⁴C)glucosa en columna de Biogel P-2:
 Se utilizaron 22.000 cpm del compuesto. La columna se desarrolló como se indica en sección 3.5.2..

R= rafinosa.

S= soforosa.

G= glucosa.

●—● = radioactividad.

○—○ = fenol-sulfúrico.

na en iguales condiciones que el anterior pero utilizando esta vez ácido (^{14}C)glucónico y los mismos marcadores anteriores (Fig.41).

Se pudo ver claramente la distorsión que el carboxilo del ácido glucurónico introdujo en su volumen de elución pues se comportó aproximadamente como el trisacárido rafinosa. Para tratar de abolir este efecto se aumentó la fuerza iónica del buffer, pero prácticamente no variaron en nada los perfiles de elución (no mostrado). Se intentó solucionar el problema cambiando el gel, utilizando en este caso Sephadex G-15 (no mostrado) pero el (^{14}C)glucónico eluyó de la misma con un volumen similar al trisacárido rafinosa.

La distorsión en el volumen de elución del ácido glucurónico, que se desplaza dos puestos respecto de lo esperado, hizo pensar que el (^{14}C)glucónico-oligosacárido posiblemente fuera más pequeño de lo que indicaba su volumen de elución. Si la presencia de una molécula de ácido glucurónico en el oligosacárido produjera el corrimiento de dos puestos en el volumen de elución del mismo, podríamos pensar en un tetrasacárido glucónico-manosa-celobiosa. Sin embargo, debido a las ambigüedades que ocurrieron no alcanzamos por este criterio a establecer sin lugar a dudas su tamaño.

4.3.3.1. Hidrólisis ácida parcial de (glucónico)_n-man-glu-glu. - Para obtener información de la o las uniones del ácido glucurónico al man-sil-celobiosa, se realizaron hidrólisis ácidas parciales del oligosacárido con marca ya fuera en (^{14}C)manosa o en (^{14}C)glucónico.

Para mayor comprensión del texto al oligosacárido (glucónico)_n-man-glu-glu, se lo denominó X_4 y se representará (^{14}C)man X_4 o (^{14}C)

glnicoX₄ de acuerdo al azúcar en el cual se lo haya marcado.

En la Fig.42 se observa el perfil cromatográfico en solvente H de (¹⁴C)manX₄, a) y de (¹⁴C)glnicoX₄, b). En la misma figura se

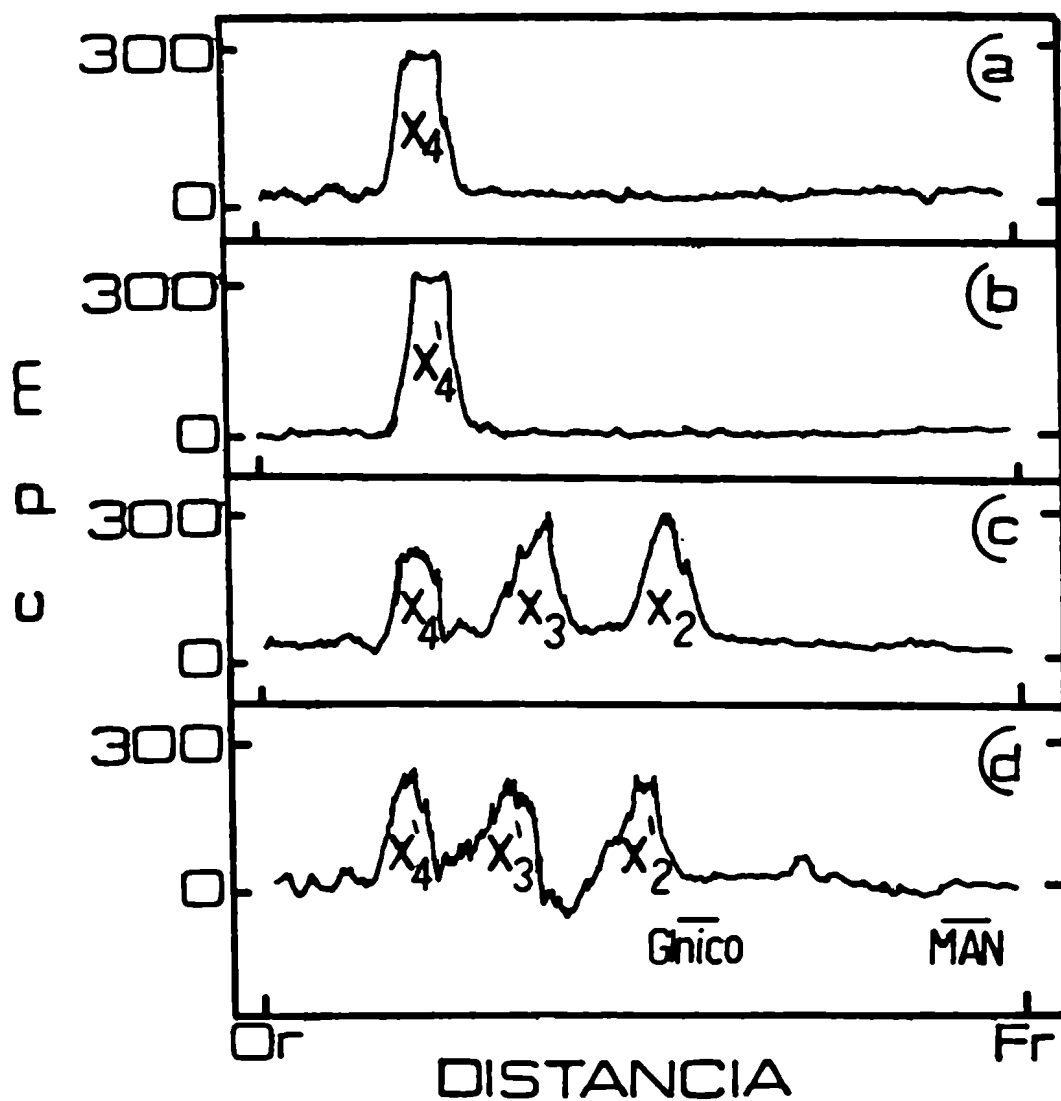


Figura 42: Hidrólisis parcial de X₄: Se preparó X₄-P-P-prenol marcado con (¹⁴C)man y (¹⁴C)glnico como se describió en la Tabla 7, B₂ y en la Fig.38, respectivamente. Los oligosacáridos correspondientes se obtuvieron por hidrólisis ácida suave y se cromatografiaron en solvente H: a) y b), tal cual; c) y d), después de someterlos a hidrólisis ácida (HCl 0.1N, Res. Dowex H⁺50 x 8, 5 horas 30 minutos).

a) y c): marca en (¹⁴C)man.

b) y d): marca en (¹⁴C)glnico.

observa el perfil radioactivo en el mismo solvente de los productos de hidrólisis ácida parcial de ambos compuestos (c) y d) respectivamente). Es interesante destacar dos puntos:

- 1.) Los perfiles c) y d) son idénticos; se obtuvo X₄ intacto y otros dos picos de movilidad mayor que denominamos X₃ y X₂.
- 2) No se obtuvo (¹⁴C)manosa libre en c) ni (¹⁴C)glnico libre en d).

Conociendo la resistencia a la hidrólisis ácida de las uniones glicosídicas que involucran el extremo reductor de los ácidos urónicos, estos resultados sugirieron que el ácido glucurónico estaba unido a la manosa.

Una probable interpretación de los resultados se muestra en el siguiente esquema:

X₄ = glnico-man-glu-glu.

X₃ = glnico-man-glu.

X₂ = glnico-man.

Cabe la aclaración que las glucosas liberadas no se venían en la Fig.42 debido a que no estaban marcadas.

Esta interpretación se reforzó al observar (por electroforesis en buffer I) que X₄, X₃ y X₂ poseían cargas negativas pues los tres

migraban con distintas movibilidades hacia el ánodo, e independientemente de que tuvieran marca en manosa o en ácido glucurónico. Tanto $(^{14}\text{C})\text{manX}_2$ como $(^{14}\text{C})\text{glnicoX}_2$ se estudiaron en cierto detalle (Fig. 43).

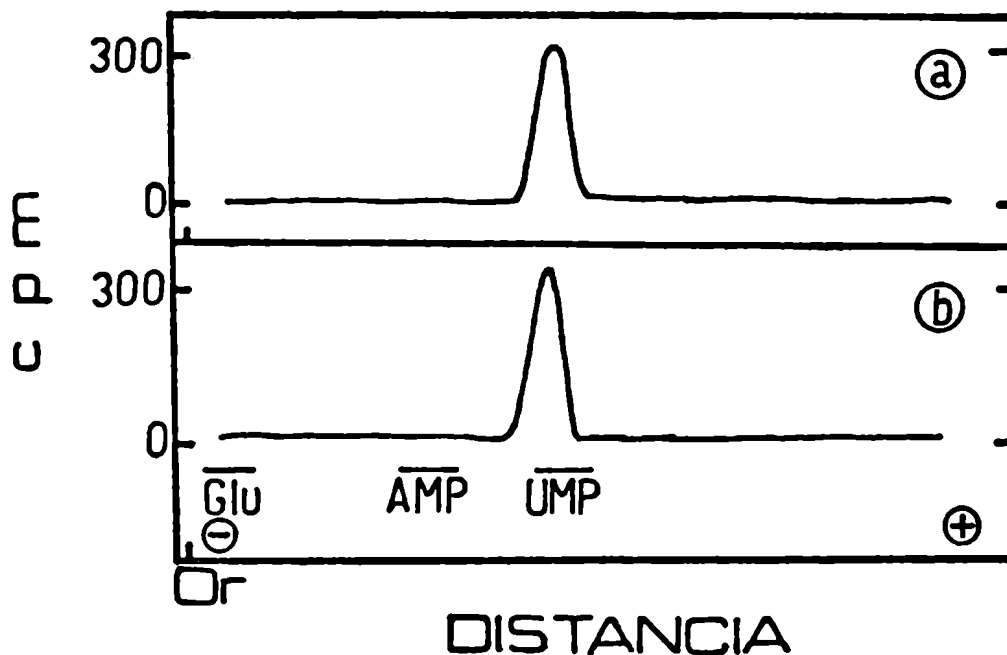


Figura 43: Electroforesis del oligosacárido X₂: Se obtuvieron los oligosacáridos $(^{14}\text{C})\text{manX}_2$, a) y $(^{14}\text{C})\text{glnicoX}_2$, b) en las condiciones de la Fig.42, se eluyeron del cromatograma en solvente H y 3.000 cpm de cada uno de los mismos se sometieron a electroforesis en buffer I.

Sus propiedades electroforéticas fueron coincidentes. En cada caso se observó un solo pico radioactivo con $R_{\text{UMP}}=0.9$. Ambos compuestos fueron sometidos a la acción de varias glicosidasas (manosidasas, glucosidasas y glucuronidasas). La única enzima que atacó

a ambos fue la β -glucuronidasa, que liberó (^{14}C)manosa o (^{14}C)glucurónico dependiendo de que azúcar estuviese marcado (datos no mostrados). Estos resultados sugirieron que X_2 era glucuronil-manosa.

Se realizaron los mismos tratamientos enzimáticos con X_3 y X_4 , inclusive en condiciones más drásticas (mayor número de horas, más enzimas, etc.) y haciendo tratamientos alternados con las distintas glicosidasas, pero los mismos permanecieron inalterados. Evidentemente estos oligosacáridos no resultaron buenos sustratos para las enzimas comerciales que se utilizaron.

Se puede concluir de estos experimentos que el glucurónico está unido a la manosa y que muy probablemente la estructura de X_4 sea glucuronil-manosil-celobiosa.

4.3.3.2. Determinación de la unión del ácido glucurónico a la manosa.

Como se verá en detalle en los próximos capítulos, se había observado que la unión del glucurónico a la manosa era lábil ante tratamientos de acetólisis parcial. Como en general la unión glicosídica más lábil ante dichos tratamientos degradativos es la 1,6 (118), se pensó que X_2 fuera un glucuronil(1,6)manosa.

Analizando las probables estructuras del oligosacárido X_4 marcado con (^{14}C)manosa se vio que frente a una oxidación con IO_4^- , la única que teóricamente liberaría (^{14}C)fórmico sería la 1,6. Los resultados de dicho tratamiento (Fig. 44) muestran claramente un pico con la movilidad del ácido fórmico. Su obtención a partir de (^{14}C)man X_4 confirmó que la unión del ácido glucurónico a la manosa era 1,6.

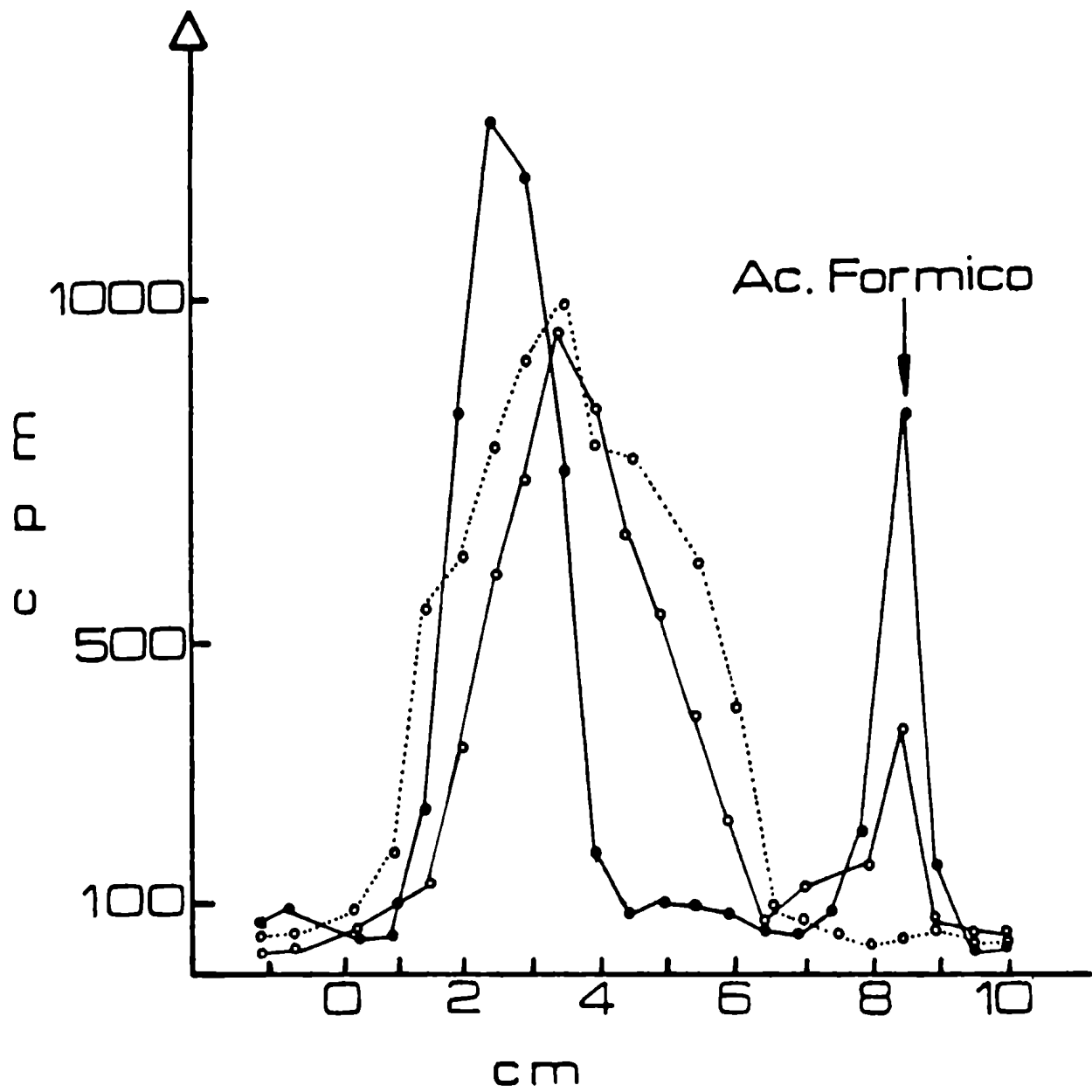


Figura 44: Oxidación con IO_4^- de $(^{14}\text{C})\text{manX}_4$: Fl $(^{14}\text{C})\text{manX}_4$ se preparó y aisló como en la Tabla 7, B₂, 6.200 cpm se trataron con IO_4^- (sección 3.3.7.) y se electroforetizaron en buffer O $\bullet\text{---}\bullet$. Otra fracción igual pero sin tratar se electroforetizó en el mismo buffer como control, $\bullet\text{-----}\bullet$.

$\bullet\text{---}\bullet$ Electroforesis en buffer O de (^{14}C) metil-glicósido (13.800 cpm) tratado con IO_4^- en las mismas condiciones que en la muestra. Las tiras de electroforesis se cortaron cada 1 cm y las mismas se contaron en el centellador.

Como control del método se sometió a oxidación con IO_4^- (^{14}C) metil-glicósido (Fig.44) que como era de esperar también liberó ácido (^{14}C) fórmico.

4.3.3.3. Obtención de $(\text{glnico})_n$ - (^{14}C) manosil-celobiosa-P-P-prenol a partir de UDPglnico y (^{14}C) manosil-celobiosa-P-P-prenol.-

Finalmente faltaba demostrar que el $(\text{glnico})_n$ -manosil-celobiosa-P-P-prenol se podía formar a partir de trisacárido P-P-prenol exógeno. Para ello se incubó (^{14}C) manosil-celobiosa-P-P-prenol en presencia y en ausencia de UDPglucurónico frío (Fig.45).

El (^{14}C) manosil-celobiosa-P-P-prenol (Fig.45.a) se mantuvo inalterado cuando se lo incubó sin agregado de nucleótidos (Fig.45 b)), en cambio cuando se incubó en presencia de UDPglnico formó en pequeña proporción $(\text{glnico})_n$ - (^{14}C) manosil-celobiosa-P-P-prenol (Fig. 45 c)).

El resultado obtenido fue más que satisfactorio aunque el porcentaje de sustrato transformado en el producto buscado fuera pequeño. Se debe tener en cuenta la dificultad de llegar a buen término en experimentos de formación de compuestos a partir de prenil-fosfoazúcares agregados en forma exógena.

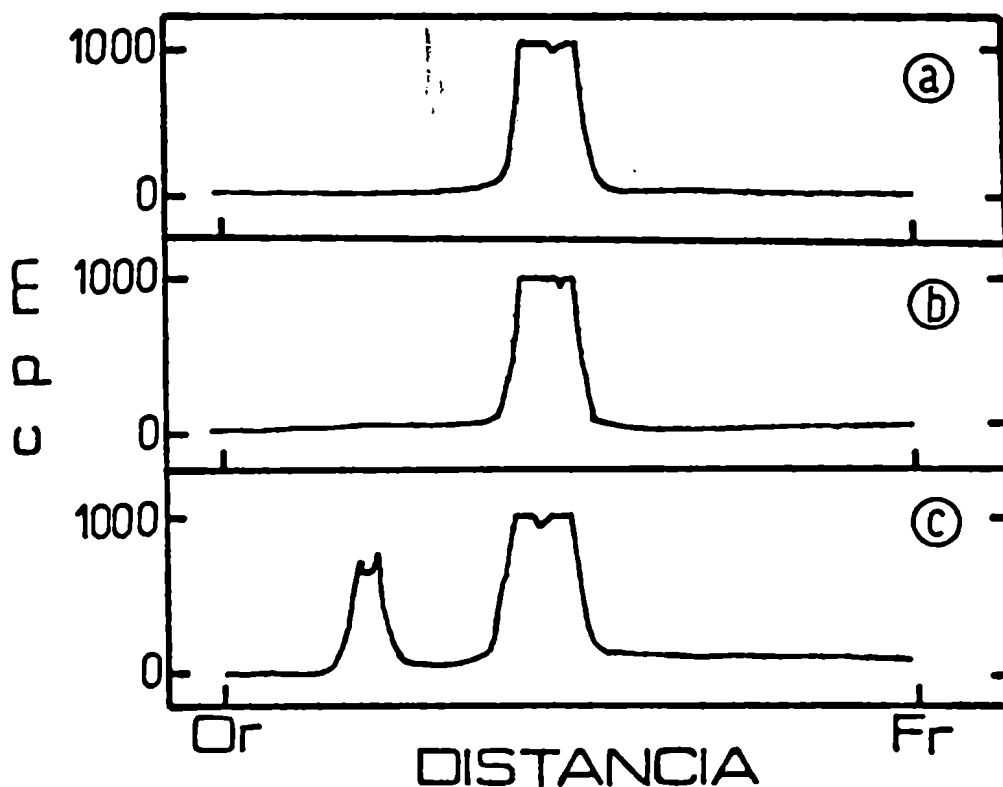
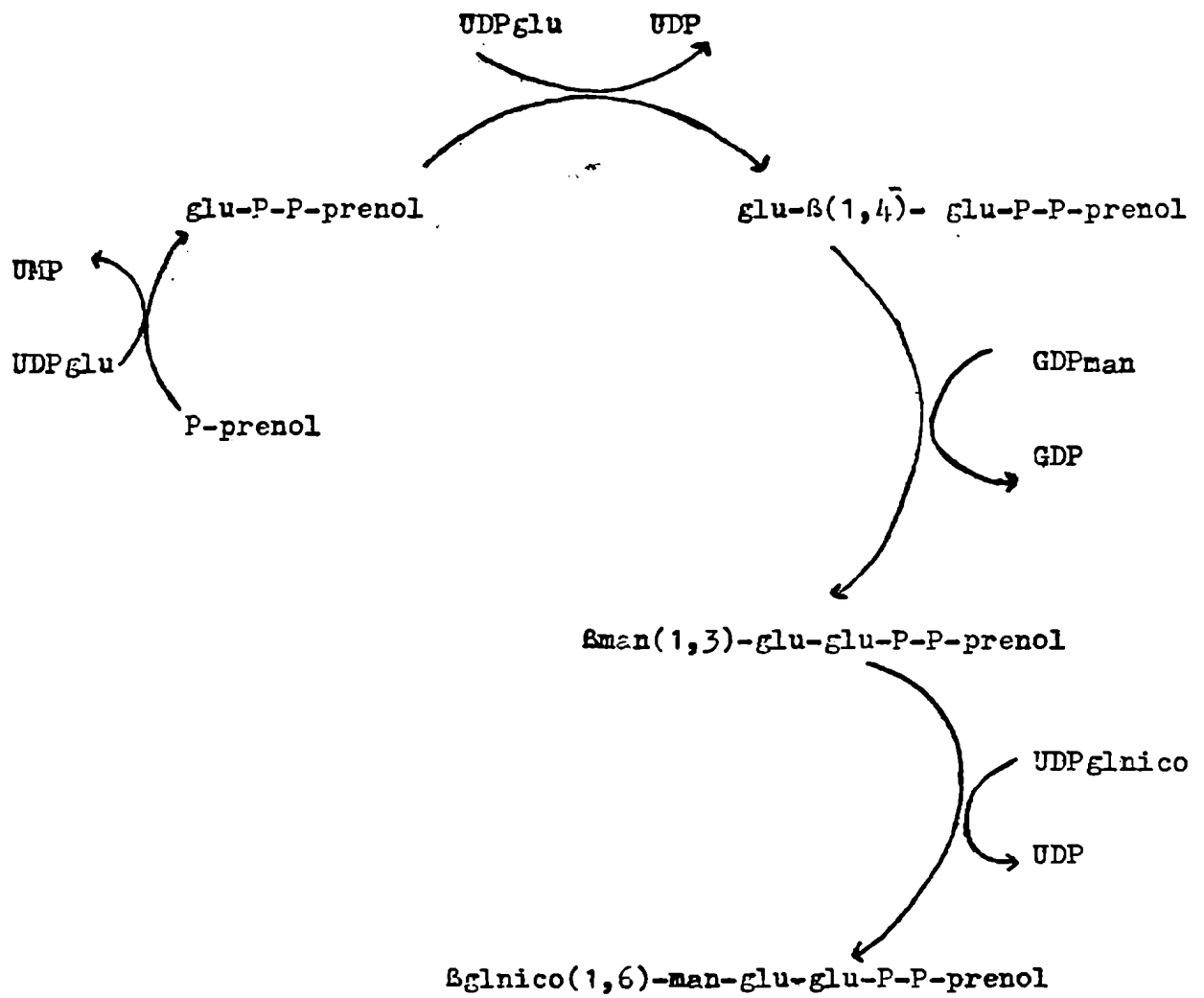


Figura 45: Obtención de $(\text{glucico})_n-(^{14}\text{C})\text{manosil-celobiosa-P-P-prenol}$ a partir de $(^{14}\text{C})\text{manosil-celobiosa-P-P-prenol}$: Se obtuvo el $(^{14}\text{C})\text{manosil-celobiosa-P-P-prenol}$ en las condiciones de la Fig. 19. 18.700 cpm se cromatografiaron directamente en solvente D, a). Una alícuota de 18.700 cpm se resuspendió en presencia de 1.5% de Tritón X-100 en una mezcla de incubación estándar con 200 ug de proteína, b). Otra alícuota de 18.700 cpm se resuspendió en la mezcla de resuspensión estándar en presencia de 1.5% de Tritón X-100, 2.500 pmoles de UDPglucico y 200 ug de proteína, c). Ambas mezclas se incubaron 30 minutos a 30°C , se procesaron según método A y los extractos butánolicos se cromatografiaron en solvente D.

En vista de los resultados obtenidos hasta esta altura del trabajo se propuso el siguiente esquema para la síntesis de glucico-man-glu-glu-P-P-prenol.



4.4. Incorporación de glucosa, 2ª serie

4.4.1. Generalidades

Hemos señalado en capítulos anteriores que incubando simultáneamente con UDPglu y UDPglnico, en presencia o en ausencia de GDP man, e incluso con UDPglu como único nucleótido (con algunas preparaciones enzimáticas), se obtenía un compuesto liposoluble con propiedades distintas a la de los vistos hasta el momento. Dicho compuesto se extraía parcialmente con butanol (utilizando el método A de procesamiento), pero luego se disolvía en el agua de lavado del mismo. Posteriormente se comprobó que procesando los incubados según el método B, se extraía perfectamente con solvente 1,2,0.3.

Vamos a estudiar en este capítulo dicho compuesto y su relación con los ya descriptos.

En la Tabla 8 se muestra la incorporación de (^{14}C)glucosa a solvente 1,2,0.3 utilizando distintas concentraciones de UDP(^{14}C)glu en presencia y en ausencia de UDPglnico no radioactivo.

Se observa que en presencia de UDPglnico aumentó la incorporación de (^{14}C)glucosa. Así mismo para la cantidad de enzima y UDPglnico presentes, utilizando una relación de aproximadamente 6/1 de UDPglu respecto de UDPglnico se llegó a un máximo de incorporación.

Tabla 8: Incorporación de (^{14}C)glu extraíble por solvente 1,2,0.3

Nucleótido incubado		(^{14}C)glu extraída con solvente 1,2,0.3 pmoles
UDPglu pmoles	UDPglnico pmoles	
1.000	---	21.92
1.000	500	36.5
3.000	500	83
5.000	500	76.3

Se realizó la incubación estándar en escala x 2, 504 ug de enzima, 500 pmoles de UDP(^{14}C)glu (309 uCi/umol) y la cantidad de UDPglu no radioactivo para alcanzar la cifra señalada en la tabla en cada caso. Se incubó 40 minutos a 30°C, se procesó según método B se contó la radioactividad extraíble por solvente 1,2,0.3.

4.4.1.1. Análisis del compuesto obtenido.- El material extraído con solvente 1,2,0.3 se analizó por diversos criterios. Por cromatografía en papel en el mismo solvente migró como un solo compuesto (Fig.46 a)) de $R_f=0.9$, confirmando así su naturaleza lipídica y descartando contaminaciones con azúcares libres o sus ésteres fosfóricos, de R_f mucho menor. Sometido a electroforesis en buffer I no se movió de su lugar de siempre (Fig.46 b)), otra propiedad típica de los lípido-azúcares. Por cromatografía en solvente alcalino se obtuvo un solo compuesto de $R_f=0.2$ c), que eluido y sometido a electroforesis d), migró, a diferencia del compuesto original, con $R_{UMP}=0.9$. Esta labilidad al medio alcalino sugiere la presencia de una unión difosfato entre el lípido y el azúcar.

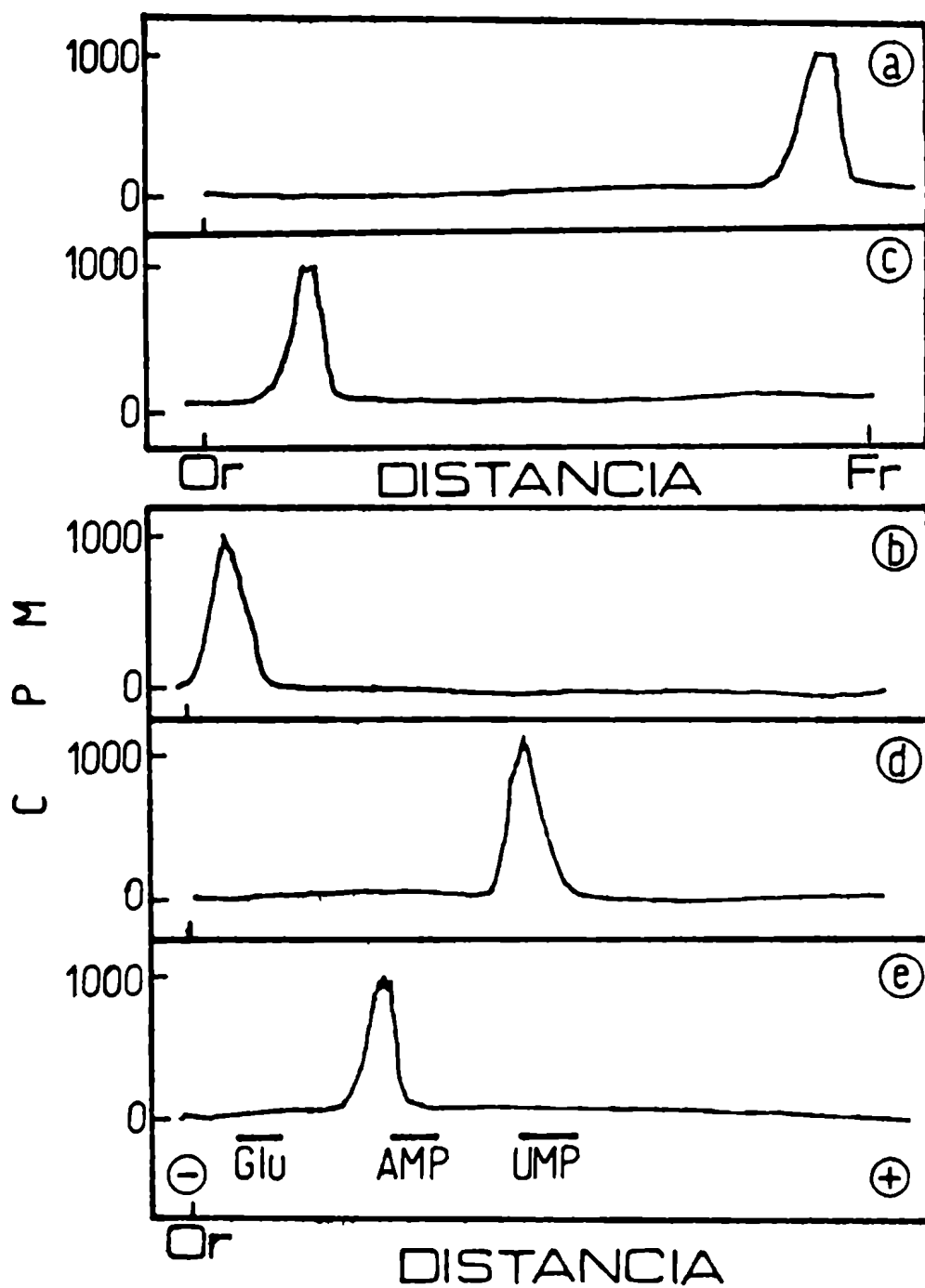


Figura 46: Propiedades del material extraíble con solvente 1,2,0.3:
 El material se obtuvo como se describe en la Tabla 8, utilizando 2.500 pmoles de UDP(¹⁴C)glu y 500 pmoles de UDPglúcnico como sustratos. Sobre alícuotas de 5.000 cpm de dicho material, concentradas bajo N₂ hasta casi seco, se realizaron los siguientes tratamientos:

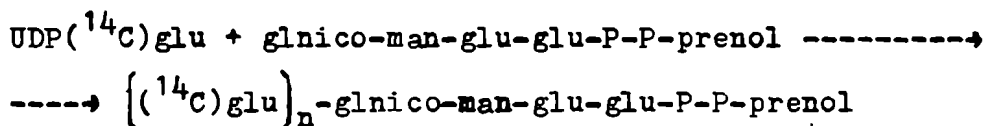
- Cromatografía en solvente N.
- Electroforesis en buffer I.
- Cromatografía en solvente D.
- El compuesto formado en c), se eluyó y sometió a electroforesis en buffer I.
- Una última alícuota del material extraíble con solvente 1,2,0.3 se trató a pH=2, 10 minutos, 100°C y la fase acuosa se sometió a electroforesis en buffer I.

Finalmente por hidrólisis ácida suave, toda la radioactividad (Fig.46 e)) dejó de ser soluble en solventes orgánicos y por electroforesis en buffer I migró, a diferencia del compuesto original y del producto de degradación alcalina con una movilidad $R_{UMP}=0.5$.

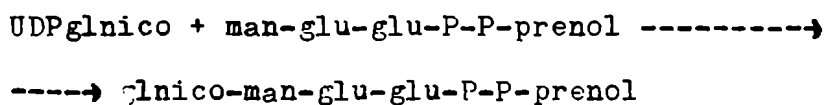
Todos estos resultados son compatibles con un compuesto donde un prenil está unido a la cadena de azúcares mediante un puente pirofosfato.

Es conveniente prestar especial atención al hecho de que la parte hidrofílica de la molécula (Fig.46 e)) migró como un anión en electroforesis en buffer I aunque se la haya obtenido en ausencia de UDPglúcnico, y la movilidad es la misma, así se haya obtenido el compuesto en presencia o no de dicho nucleótido (no mostrado). Este nucleótido-azúcar permite incrementar la incorporación de (¹⁴C) glucosa (Tabla 8) pero se obtiene un material con las mismas propiedades que sin él. Una posible interpretación de esto sería suponer la presencia en lo que denominamos "preparados enzimáticos" de oligosacáridos-P-P-prenil idénticos a los vistos en los capítulos anteriores que actuarían como aceptores endógenos. Por ejemplo

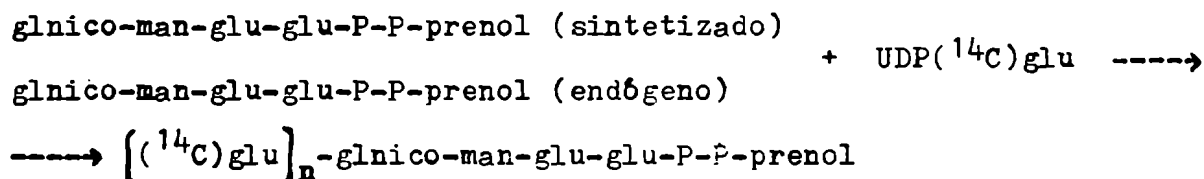
en presencia de UDP(¹⁴C)glu únicamente ocurriría una reacción del tipo:



pero si además hay UDPglnico se habilitaría un nuevo aceptor endógeno:



que justificaría las estimulaciones observadas (Tabla 8):



pero el producto sigue siendo el mismo.

Por razones de simplicidad y para facilitar la comprensión del problema, en adelante a este oligosacárido hipotético se le asignará la estructura (glu)_n-glnico-man-glu-glu y se lo denominará X₆ y al compuesto total lípido-X₆. En lo que sigue se tratará de demostrar esta hipótesis de trabajo. Una de las primeras tareas consistió en obtener lípido-X₆ marcado en los distintos azúcares para confirmar su presencia.

4.4.1.2. Obtención del lípido-X₆ con marca en ácido glucurónico.

Como se describió ya en la sección 4.3., utilizando como sustrato

radioactivo UDP(^{14}C)glúcnico se obtiene (^{14}C)glúcnico-man-glu-glu-P-P-prenol (Fig.47 a)). La presencia adicional de UDPglu en las incubaciones provoca la formación de un compuesto distinto (Fig.47 b)).

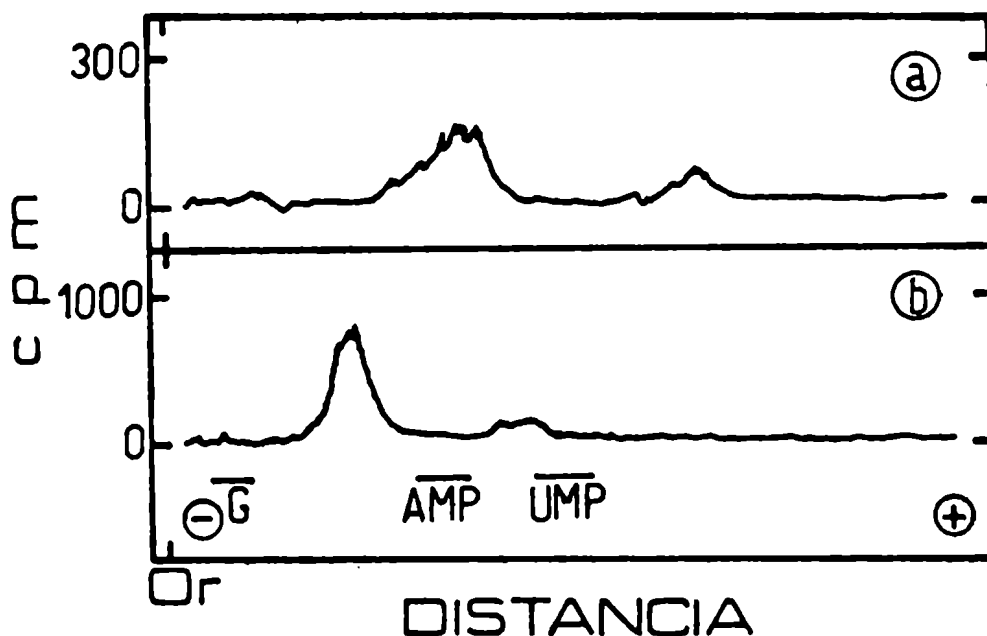


Figura 47: Efecto del UDPglu en la incorporación de (^{14}C)glúcnico: Se realizó una incubación estándar con 340 μg de proteína y 528 pmoles de UDP(^{14}C)glúcnico (309 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 30 minutos a 30°C , a). En b) se procedió igual pero la incubación contenía además 2.500 pmoles de UDPglu no radioactivo. Ambos tubos se procesaron por el método B, los extractos 1,2,0.3 se hidrolizaron a $\text{pH}=2$ y luego se sometieron a electroforesis en buffer I.

Los perfiles cromatográficos muestran que en ausencia de UDPglu (Fig.47 a)) se formó un compuesto radioactivo que luego de la hidrólisis ácida migró con un $R_{\text{UMP}}=0.7$ (analizado por electroforesis) que corresponde a la movilidad del X_4 ya descrito. En cambio, en presencia del nucleótido (Fig.47 b)) se formó un compuesto principal que analizado por el mismo criterio, migró con un $R_{\text{UMP}}=0.5$, idén-

tico a la del (^{14}C)gluX₆ ya visto. Además, todas las propiedades que se señalaron para el lípido-(^{14}C)gluX₆ coincidieron con las del compuesto obtenido a partir de UDP(^{14}C)glucónico en presencia de UDP glu no radioactivo.

Nota: Los picos radioactivos más pequeños que migran por delante del UMP en a) y por detrás del UMP en b) corresponden a los derivados 2-P de los oligosacáridos respectivos (ver nota en sección 4.3.2.2.).

4.4.1.3. Presencia de manosa en X₆.— La presencia de glucosa y ácido glucurónico en X₆ estaba bien demostrada por el hecho de poder obtenerlo marcado en cualquiera de dichos azúcares, faltaba confirmar la presencia de manosa. Con ese objeto se investigó si la formación de lípido-X₆ se estimulaba con GDPman y si se incorporaba (^{14}C)manosa a partir de GDP(^{14}C)man y los correspondientes nucleótidos no radioactivos. Para verificar lo primero se realizaron incubaciones con UDP(^{14}C)glu y UDPglucónico, sin GDPman (Fig.48 a)) y con GDPman (Fig.48 b)).

En a) se observa el (^{14}C)gluX₆ con movilidad $R_{\text{UMP}}=0.5$ pero también bastante radioactividad en la zona neutra, atribuible a (^{14}C)glu y a (^{14}C)celobiosa. Como en b) se ha incubado además en presencia de GDPman, los compuestos neutros disminuyeron en relación con a) y aumentó el pico de (^{14}C)gluX₆. Esto está de acuerdo con lo esperado porque el GDPman presente en la incubación permite que celobiosa-P-P-prenol puede incorporar manosa y servir de aceptor al ácido glucurónico y posteriormente a más glucosas para formar el

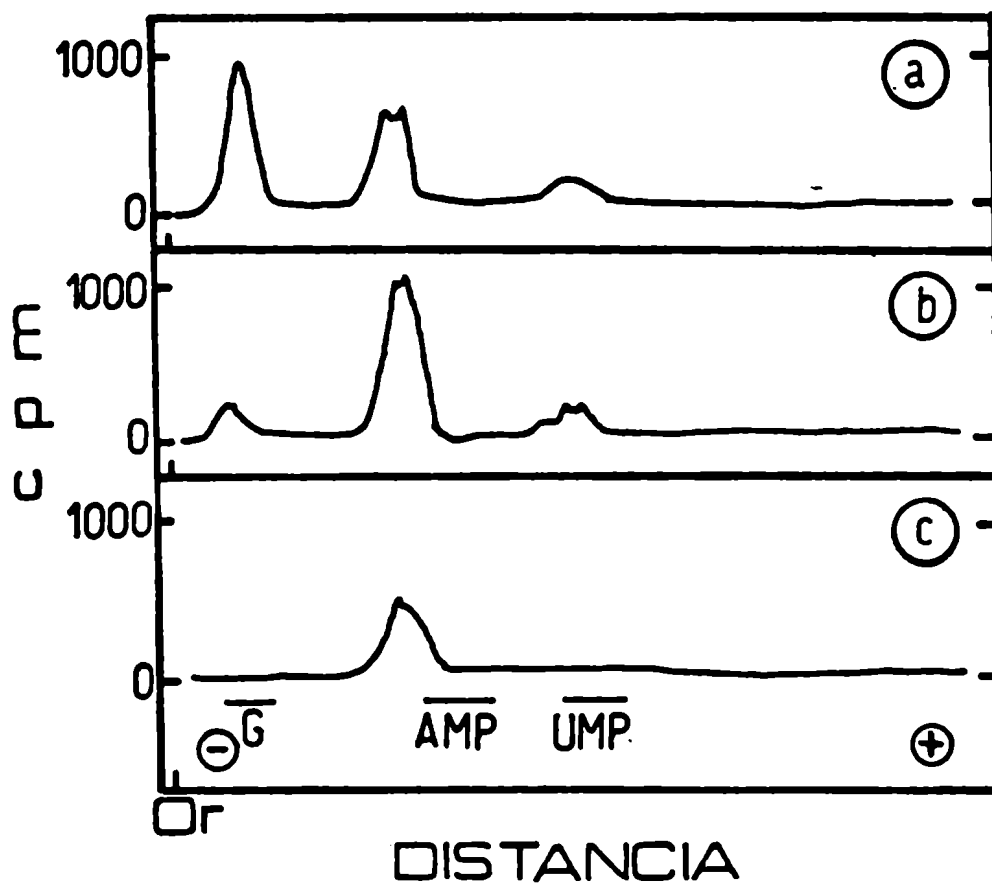


Figura 48: Obtención de $(^{14}\text{C})\text{manX}_6\text{-P-P-prenol}$: Las condiciones de las incubaciones fueron las estándar. En a) y en b) se utilizaron como sustratos 2.500 pmoles de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{glu}$ (268 uCi/ μmol) y 500 pmoles de UDPglu ; b) contiene además 500 pmoles de GDPman . En c) se incubó con 133 pmoles de $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$ (227 uCi/ μmol), 2.500 pmoles de UDPglu y 500 pmoles de UDPglu . En los tres casos se incubó 30 minutos a 30°C con 400 μg de enzima, se procesaron los incubados según método B y el extracto B se sometió a hidrólisis ácida suave. Los productos hidrosolubles de dicho tratamiento se electroforesizaron en buffer I.

compuesto que se denominó X_6 .

Este esquema se confirmó utilizando $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{man}$, UDPglu y UDPglu pues se obtuvo un compuesto con movilidad $R_{\text{UMF}}=0.5$, idéntico a la de X_6 pero con marca en manosa (Fig.48 c)).

4.4.2. Propiedades del lípido- X_6

4.4.2.1. Condiciones óptimas de obtención.- Con el objeto de disponer de cantidades grandes de lípido- X_6 para poder estudiarlo, se realizaron curvas de concentración de enzimas (Fig.49), de tiempo (Fig.50) y de sustrato (Fig.51). Se mantuvo una relación 5/1 de $\text{UDPglu}/\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{glu}$.

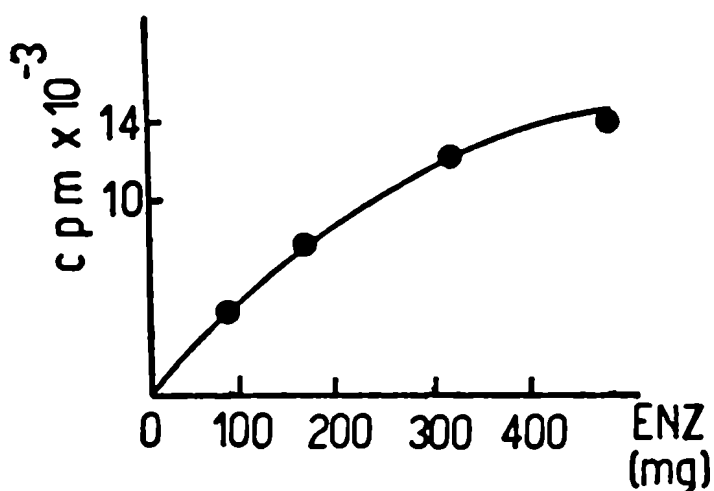


Figura 49: Curva de concentración de enzima: Cada punto de la figura representa la incorporación de radioactividad al extracto 1,2,3 de una incubación estándar 30 minutos a 30°C, con 528 μmoles de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{glu}$ (309 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 2.500 μmoles de UDPglu y la cantidad de enzima señalada en cada caso.

Aparentemente entre 300 y 500 μg de proteína (Fig.49) con gradualmente el aumento de incorporación. Una probable interpretación de estos resultados es que para dicha cantidad de enzima y de accep-

tores endógenos comienza a ser limitante el sustrato agregado. Se trató de trabajar con exceso de enzima-sustratos endógenos.

La curva de tiempo (Fig.50) muestra que en 30 minutos se llega a un máximo de incorporación que no decae hasta por lo menos 2 horas.

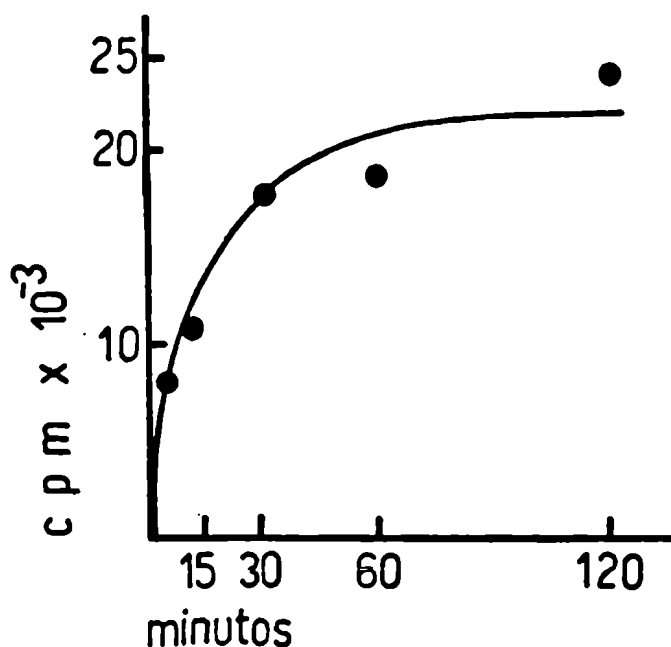


Figura 50: Curva de tiempo: Cada punto representa la incorporación de radioactividad al extracto 1,2,0.3 en las mismas condiciones de la Fig.49, con 336 ug de enzima y para el tiempo de incubación señalado en cada caso.

Finalmente la curva de sustrato (Fig.51) indica que para la cantidad de enzima utilizada, no se llegó a saturar la incorporación con las concentraciones de sustratos agregados. Estas eran las condiciones buscadas para asegurar buenas incorporaciones con un

mínimo de nucleótidos radioactivos.

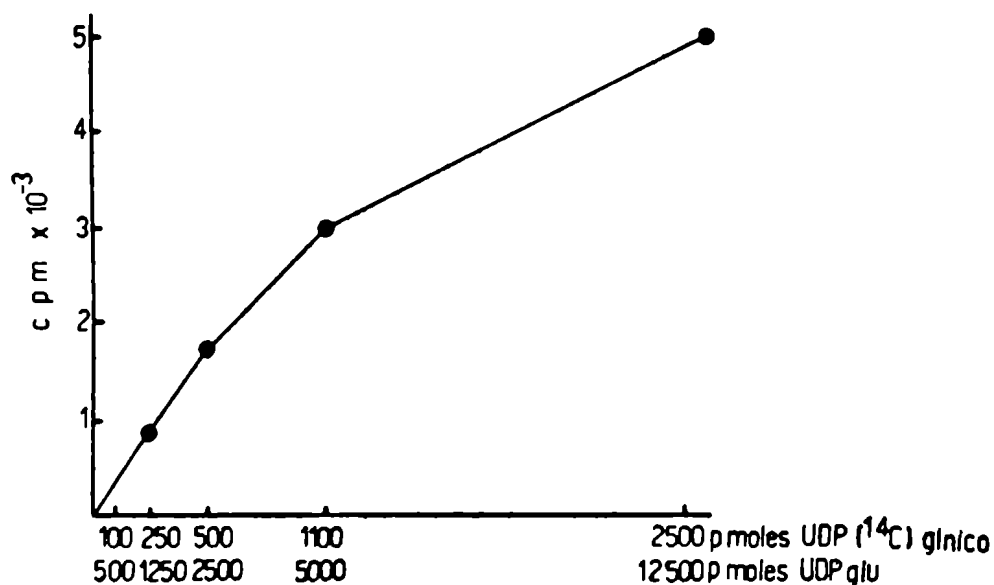


Figura 51: Curva de concentración de sustrato: Cada punto representa la incorporación de radioactividad al extracto 1,2,0.3 de una incubación realizada en las condiciones de la Fig.49 pero con 504 ug de enzima y con las concentraciones de sustrato indicadas en cada caso.

Por otra parte hacer estudios cinéticos con un sistema tan complejo pareció poco provechoso, pues hubiera resultado muy difícil sacar conclusiones.

4.4.2.2. Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa.- La cromatografía en columnas de DEAE-celulosa en CH₃OH 99% con un gradiente de AcONH₄ como eluyente, ha sido utilizada para separar azúcares-P-lípidos de azúcares-P-P-lípidos y estos últimos entre sí, dependiendo del tamaño del oligosacárido (97). Se cromatografió en dicho sistema el X₆-P-P-lípido con marca ya fuera en (¹⁴C)glucosa o en (¹⁴C)glnico (Fig.52 y 53 respectivamente).

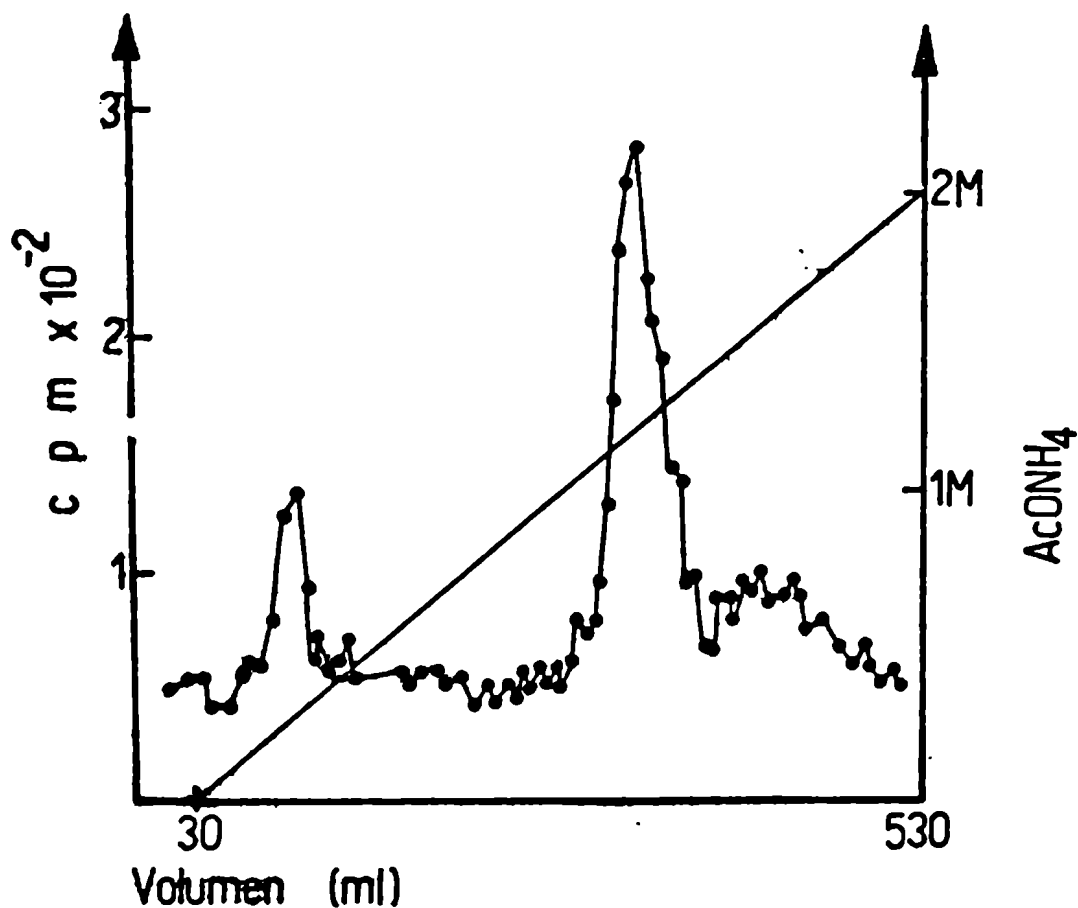


Figura 52: Cromatografía en DEAE-celulosa de $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6\text{-P-P-lípido}$: El $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6\text{-P-P-lípido}$ se preparó mediante una incubación estándar en escala $\times 3$ (volumen total=210 μl) con 760 pmoles de UDP(^{14}C)glu (266 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 800 pmoles de UDPglicico y 900 μg de enzima. Se incubó 3 horas a 30°C , se procesó según método A y se cromatografiaron 22.000 cpm de los lavados acuosos del extracto butanólico. La columna se desarrolló como se indica en la sección 3.4.1.1.. Se contó radioactividad en alícuotas de 1 ml de cada tubo.

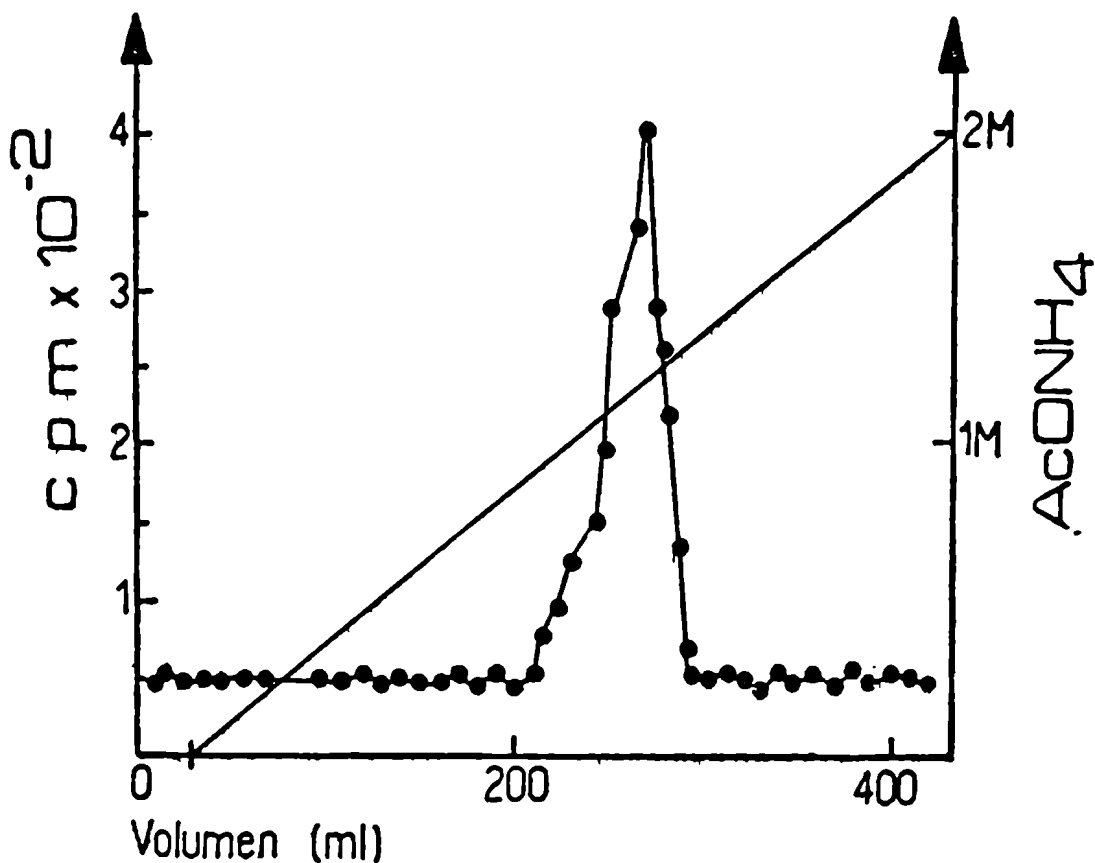


Figura 53: Cromatografía en DEAE-celulosa de (¹⁴C)glucosyl-6-P-P-prenol: El (¹⁴C)glucosyl-6-P-P-prenol se preparó mediante una incubación estándar en escala x 5 (volumen total=350 ul) con 500 pmoles de UDP(¹⁴C)glucosa (308 uCi/umol), 2.500 pmoles de UDPglu y 930 ug de enzima. Se incubó 1 hora a 30°C, se procesó según método A y se cromatografiaron 20.000 cpm de los lavados acuosos del butanol. La columna se desarrolló como se indica en sección 3.4.1.1.. Se contó radioactividad en alícuota de 1 ml de cada tubo.

Ambos compuestos se eluyeron con AcONH₄ 1.25M. El hecho de que los perfiles de elución fueran similar dió otro argumento más para afirmar que se trataba del mismo lípido-oligosacárido; por otra parte la alta molaridad necesaria para su elución, comparado con

otros azúcares-P-lípidos o azúcares-P-P-lípidos descriptos, puede atribuirse a la presencia del ácido glucurónico. Se investigó también el comportamiento del oligosacárido libre X_6 .

Se cromatografiaron $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$ y $(^{14}\text{C})\text{glnicoX}_6$ (Fig.54 y 55) en columnas de DEAE-celulosa en agua. Se eluyeron de las mismas con un gradiente lineal de AcONH_4 .

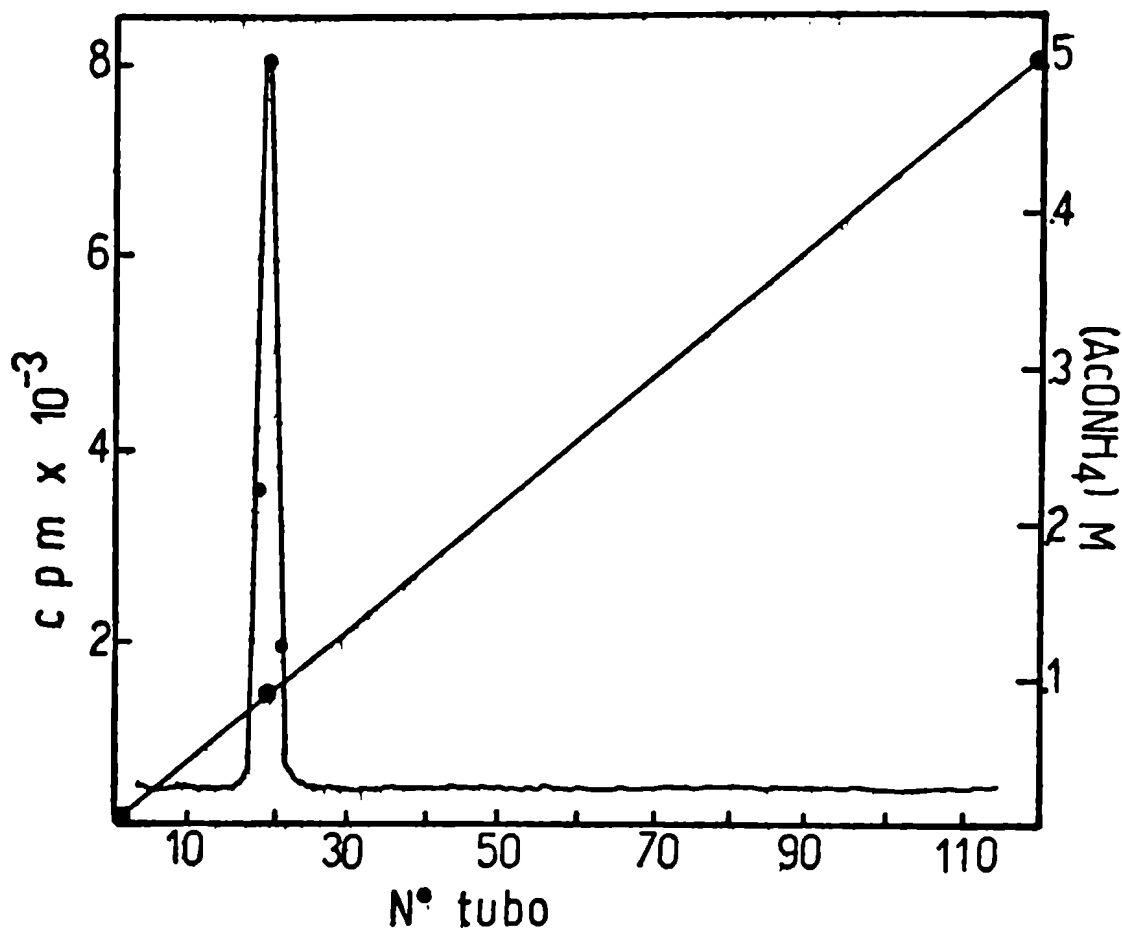


Figura 54: Cromatografía en DEAE-celulosa de $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$: El oligosacárido $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$ se obtuvo en las condiciones de la Fig.46 c). Se cromatografiaron 33.500 cpm. Se desarrolló como se indica en la sección 3.4.1.1..

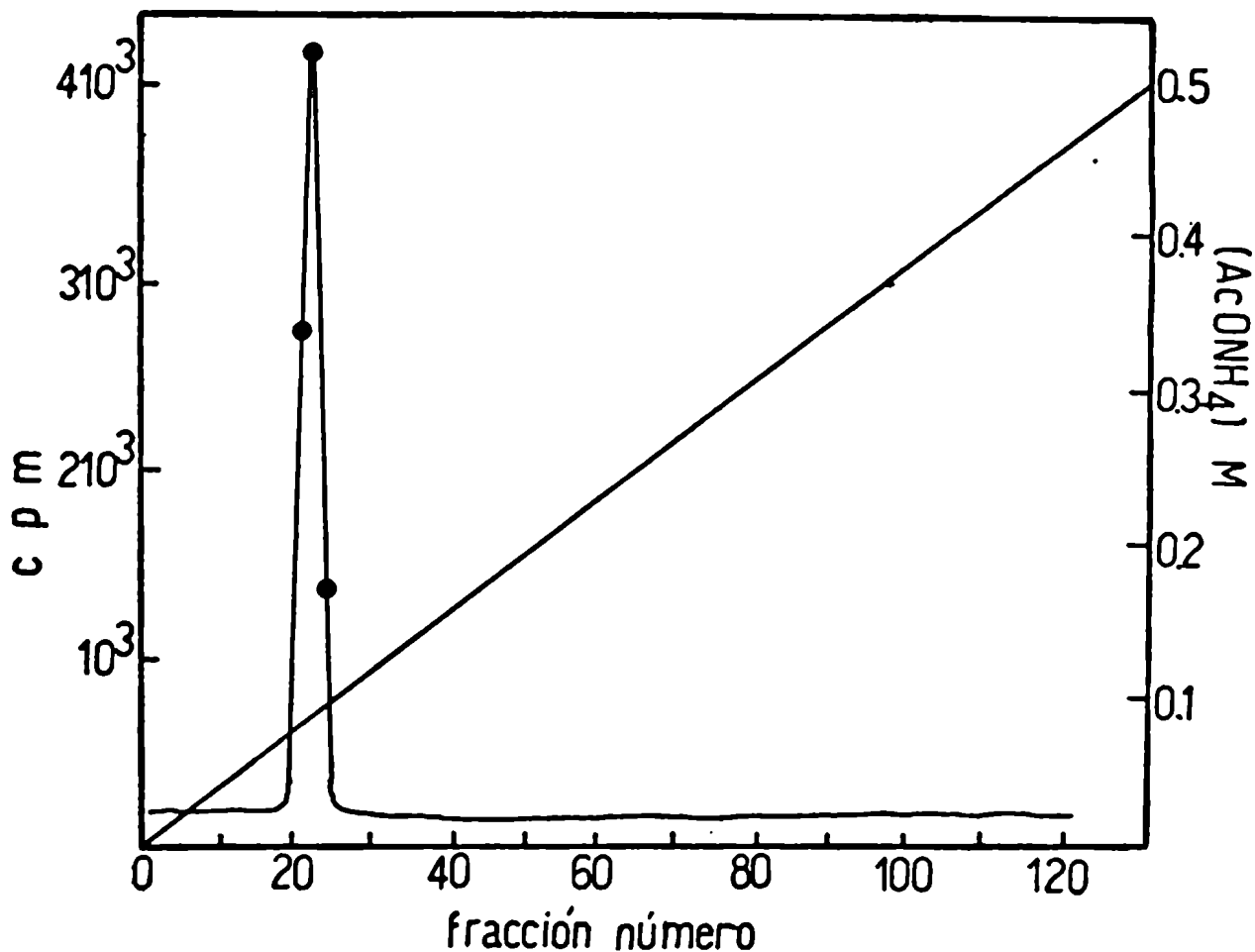


Figura 55: Cromatografía en DEAE-celulosa de (¹⁴C)glnicoX₆: El oligosacárido (¹⁴C)glnicoX₆ se obtuvo en las condiciones de la Fig.48 b). Se cromatografieron 30.700 cpm. La columna se desarrolló como se indica en la sección 3.4.1.1..

Como era de esperar, en ambos casos los perfiles de elución coincidieron dando un pico radioactivo único que eluyó de la columna con 0.1M de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

4.4.3. Estructura del lípido-X₆

4.4.3.1. Determinación de la unión entre la parte lipídica y el oligosacárido X₆.- Las características vistas hasta el momento del lípido-X₆ hacían pensar que se estaba ante un oligosacárido-P-P-prenol análogo a los ya descritos en capítulos anteriores, pero de estructura más compleja en la porción de azúcares. Para confirmar el tipo de unión entre el lípido y el azúcar se investigaron en detalle los productos de ruptura ácida y alcalina del mismo, Fig.56.

Los resultados obtenidos fueron los esperados. Por hidrólisis ácida suave se obtuvo el oligosacárido libre ya visto, de $R_{\text{UMP}}=0.5$ (Fig.56 a)).

El compuesto de movilidad $R_{\text{UMP}}=0.9$ obtenido por tratamiento alcalino (Fig.56 b)), se comportó como un éster-fosfórico-cíclico. En efecto, por ataque con fosfatasa alcalina (Fig.56 c)) o por hidrólisis ácida a pH=1 (Fig.56 d)) no varió su movilidad. Los dos tratamientos combinados, en cambio, produjeron el compuesto de $R_{\text{UMP}}=0.5$ (Fig.56 e)), ya observado en a). Vestigios de este compuesto también se observaron en c), esto era esperable porque el medio básico puede abrir en parte el oligosacárido-P-cíclico dando oligosacárido-2P que es sustrato de la fosfatasa alcalina.

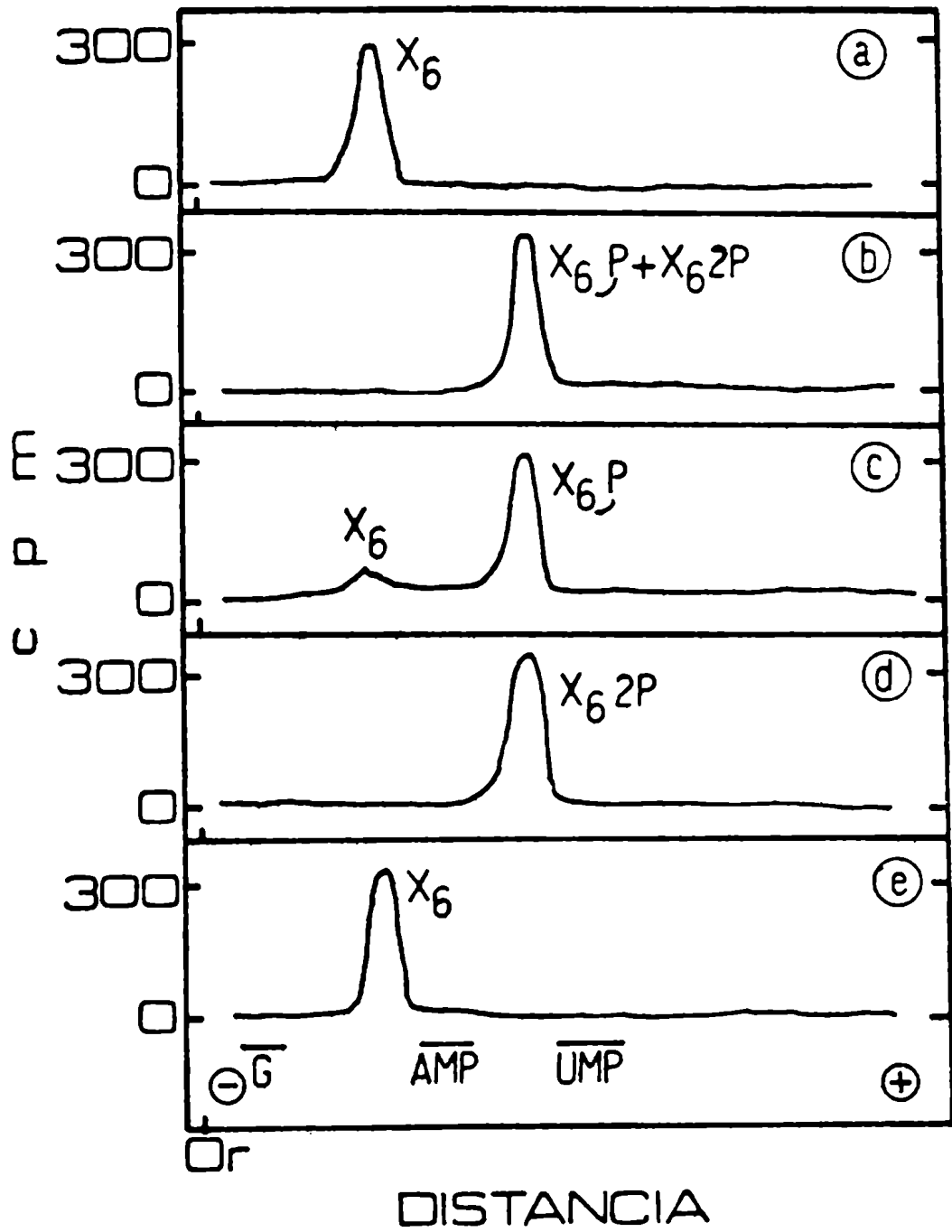


Figura 56: Determinación de la unión entre el lípido y el oligosacárido: Se preparó lípido- (^{14}C) glucos X_6 mediante incubaciones estándar, con 321 pmoles de UDP($^{14}\text{C})$ glucó (268 uCi/umol), 10.000 pmoles de UDPglu y 300 ug de enzima. Se procesaron las mismas por el método A, y se analizaron los lavados con los del butanol. Una parte de este material (5.000 cpm) se hidrolizó a pH=2, 10 minutos, 100°C y la fase acuosa se sometió a electroforesis en buffer I, a). 20.000 cpm del mismo material se cromatografiaron en solvente C, el producto de ruptura alcalina se eluyó, se dividió en cuatro partes iguales que se electroforetizaron en buffer I luego de los siguientes tratamientos:

- b) Tal cual.
- c) Fosfatasa alcalina, 2 horas a 37°C.
- d) Hidrólisis ácida (ClH 0.1N, 10 minutos, 100°C).
- e) Hidrólisis ácida (ClH 0.1N, 10 minutos, 100°C) seguido de fosfatasa alcalina 2 horas.

X_6 = oligosacárido libre.

X_6P = oligosacárido 1,2 fosfato cíclico.

X_6-2P = oligosacárido-2P.

Para lograr mayor resolución de los productos de los distintos tratamientos se analizaron los mismos por electroforesis en buffer L (Fig.57). En este sistema el oligosacárido X_6 tiene una movilidad $R_{AMP}=0.3$ (Fig.57 a)). La alcalinidad del buffer (pH=9.2) hace que los OH^- secundarios de los restos fosfato estén más disociados y las diferencias de movilidad de los distintos compuestos sea mayor que en buffer I. Esto permite, por ejemplo, la separación del oligosacárido 1,2P-cíclico= X_6P ($R_{AMP}=0.57$), del oligosacárido-2P= X_6-2P ($R_{AMP}=0.67$), ambos obtenidos por tratamiento alcalino (Fig.57 b)).

Se pudo ver claramente también que la fosfatasa alcalina no ataca al primero mientras que al segundo lo defosforila (Fig.57 c)), produciendo el oligosacárido libre, X_6 , de $R_{AMP}=0.3$. También se visualizó el efecto de la hidrólisis ácida transformando X_6P de $R_{AMP}=0.57$ en X_6-2P de $R_{AMP}=0.67$ (Fig.57 d)). El ataque combinado: ácido-

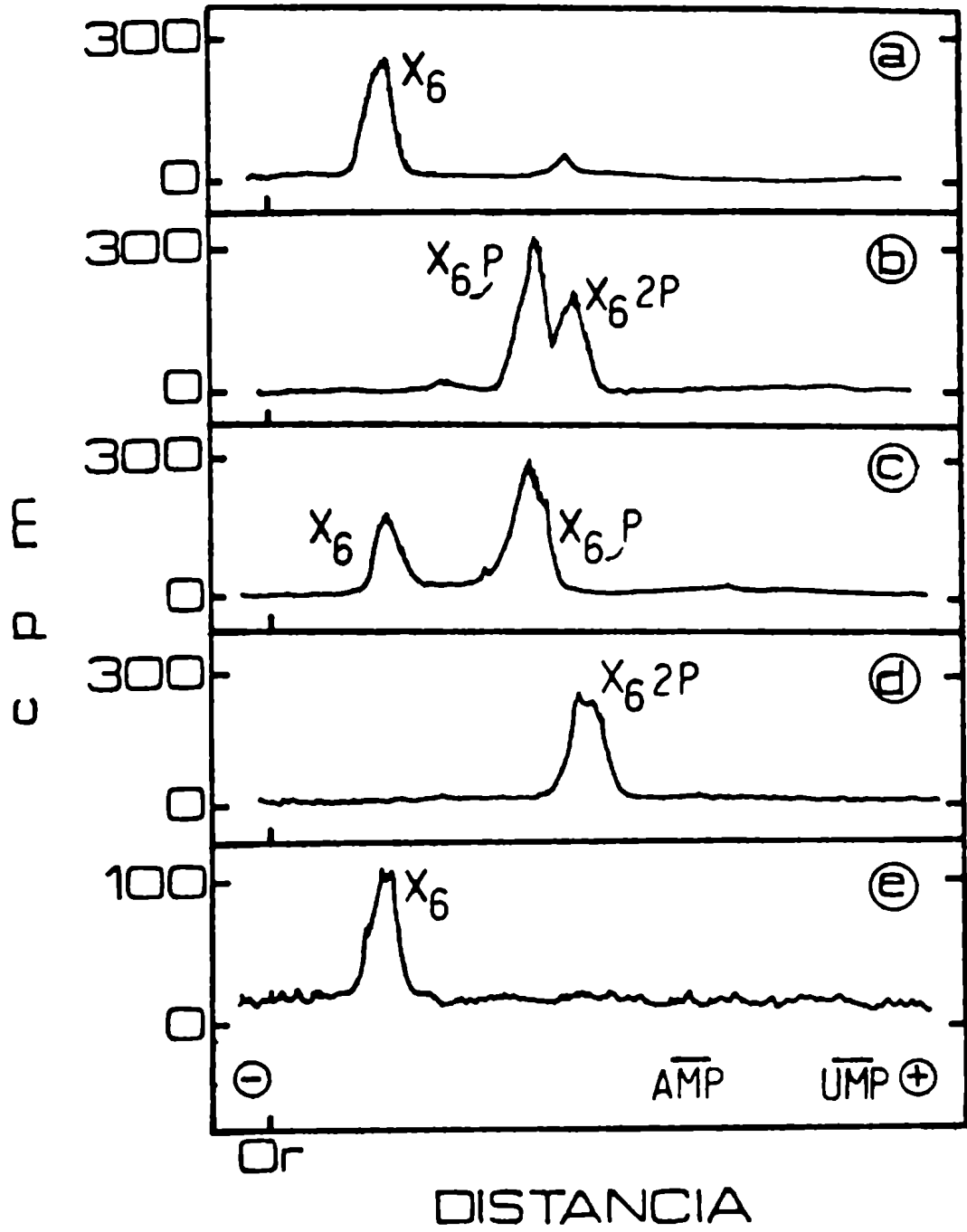


Figura 57: Determinación de la unión entre el lípido y el oligosacárido: Los mismos materiales analizados en la Fig.56 se sometieron a electroforesis en buffer L;

- a) Producto de la hidrólisis ácida suave.
- b) Producto de la hidrólisis alcalina suave.
- c) Idem b) + fosfatasa alcalina.
- d) Idem b) + hidrólisis ácida.
- e) Idem b) + hidrólisis ácida + fosfatasa alcalina.

X_6 , X_6P , X_6-2P , ver Fig.56.

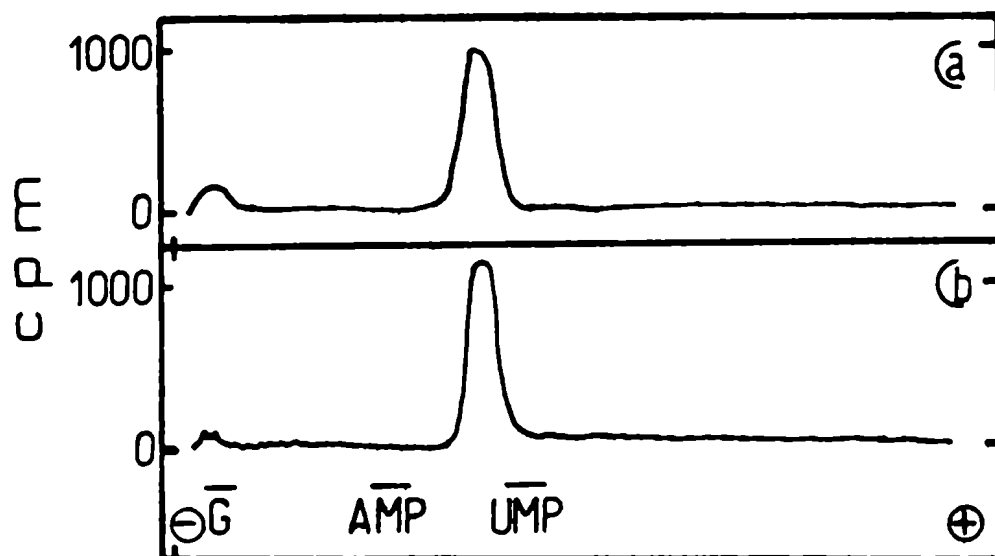
fosfatasa alcalina naturalmente produjo el oligosacárido libre (Fig. 57 e)).

Todos estos resultados son compatibles con una unión difosfato entre el lípido y el oligosacárido X_6 .

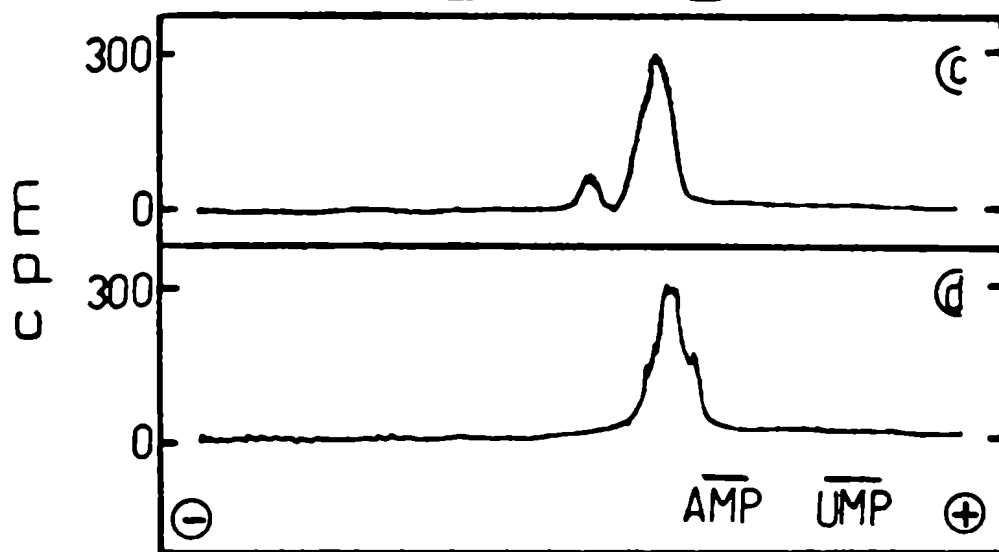
Finalmente se hicieron dos experimentos que confirmaron la existencia de la unión difosfato y la naturaleza alílica del prenol.

El lípido- X_6 se trató con fenol 50%, y se lo hidrogenó en presencia de Pt. Ambos procedimientos rompen la unión P-prenol siempre y cuando el prenol sea del tipo α no saturado (alílico). Los resultados se ven en la Fig.58.

Ambos tratamientos rompieron la molécula, la hidrogenación catalítica un 100% y el fenol un 85%. Ambos productos migraron en buffer I (Fig.58 a) y b)) y en buffer L (Fig.58 c) y d)). En este último sistema el $R_{AMP}=0.77$ es el mayor de todos los observados para derivados de X_6 . Este compuesto, obtenido por cualquiera de los dos procedimientos, fue sometido a la acción de la fosfatasa alcalina y de hidrólisis ácida (pH=1, 10 minutos, 100 C) produciendo en ambos casos X_6 (no mostrada); se trataba pues, del oligosacárido-P-P. Además de por los tratamientos mencionados se pudo obtener este difosfato por hidrólisis



DISTANCIA



DISTANCIA

Figura 58: Fractura con fenol e hidrogenación catalítica de lípido-X₆: Lípido-(¹⁴C)gluX₆ obtenido como se describió en la Fig. 58 (4.000 cpm) se trató con fenol 50% durante 30 minutos. Otra fracción (3.500 cpm) se trató con H₂ gaseoso en presencia de Pt durante 4 horas. Las fases acuosas de ambos tratamientos se analizaron en buffer I y L.

	a) Electroforesis en buffer I.
Fenol	c) Electroforesis en buffer L.
	b) Electroforesis en buffer I.
Hidrogenación catalítica	d) Electroforesis en buffer L.

ácida a pH=2, 1 hora, 37°C (resultados no mostrados).

En conclusión, se puede asignar al lípido-X₆ la estructura X₆-P-P-prenol (alílico) como era de esperar teniendo en cuenta la estructura de sus precursores.

4.4.3.2. Tamaño del oligosacárido X₆.- Se cromatografió el oligosacárido (¹⁴C)manX₆ en columna de Biogel P-2 conjuntamente con (¹⁴C)manosil-celobiosa (Fig. 59). Teniendo en cuenta la distorsión en los volúmenes de elución que introduce la carga del ácido glucurónico (sección 4.3.3.), este tipo de columnas sólo permiten tener una idea aproximada del tamaño del oligosacárido.

El (¹⁴C)manosil-celobiosa eluyó de la columna con un volumen similar al del trisacárido rafinosa (confirmó lo obtenido con columnas de Sephadex G-15, Fig. 24), mientras que el (¹⁴C)manX₆ eluyó con un volumen mucho menor. Comparado con el X₄ (Fig. 40), se desplazó alrededor de dos puestos. Si la comparación es válida, el oligosacárido X₆ sería un hexasacárido.

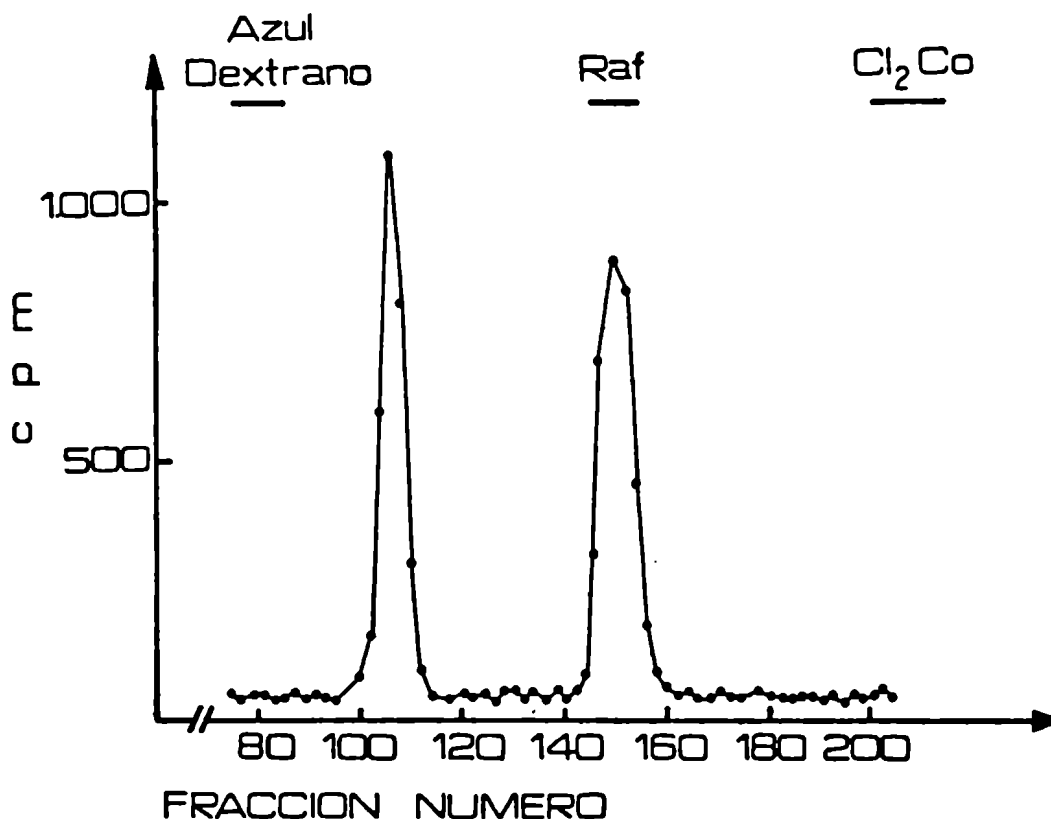
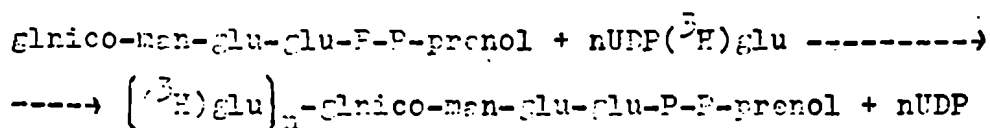


Figura 59: Cromatografía en Biogel P-2: Se cromatografiaron 14.000 cpm de (¹⁴C)manX₆ (obtenido como en la Fig.48 c)) y 15.000 cpm de (¹⁴C)manosil-celobiosa (obtenido como en la Fig.23). La columna se desarrolló como se indica en la sección 3.4.2. .

4.4.3.3. Cálculo del número de nuevas glucosas que entran por cada molécula de ácido glucurónico.- Para obtener una relación del número de glucosas que entran sobre el X₄-P-P-prenol para formar X₆-P-P-prenol, se realizaron incubaciones con doble marca utilizando UDP(³H)glucosa y UDP(¹⁴C)glucurónico. Se buscó el número de nuevas glucosas que se incorporaban por cada molécula de ácido glucurónico, para ello era necesario obviar el problema de los aceptores endógenos; a saber, la presencia de glicó-man-glu-glu-P-P-prenol implicaría la posibilidad de la reacción :



la misma distorsionaría los resultados puesto que la entrada de $(^3\text{H})\text{glu}$ se realizaría sin previa entrada de ácido glucurónico. Otro factor que conduciría a errores sería la presencia de UDP glucico o UDPglu en la preparación enzimática. Se planeó entonces un experimento tal que en la primera etapa de la incubación (en presencia de GDPman y UDPglu no radioactivos) se diera lugar a las siguientes reacciones:

- a) P-prenol + UDPglu -----> glu-P-P-prenol + UMP
- b) glu-P-P-prenol + UDPglu -----> glu-glu-P-P-prenol + UDP
- c) glu-glu-P-P-prenol + GDPman -----> man-glu-glu-P-P-prenol + GDP
- d) glucico-man-glu-glu-P-P-prenol + nUDPglu -----> $(\text{glu})_n\text{-glucico-}$
man-glu-glu-P-P-prenol + nUDP

El objetivo era saturar los aceptores endógenos llevándolos a man-glu-glu-P-P-prenol (reacciones a) --> c)) que quedaba listo para aceptar ácido glucurónico y consiguientemente glucosas. Por otra parte se saturaría el glucico-man-glu-glu-P-P-prenol con glucosas no radioactivas para no distorsionar los resultados de la segunda etapa (reacción d)).

En la segunda etapa se incubó en tres condiciones distintas: en presencia de UDP(^3H)glu, de UDP(^{14}C)glucico, y de ambos (Fig.60)

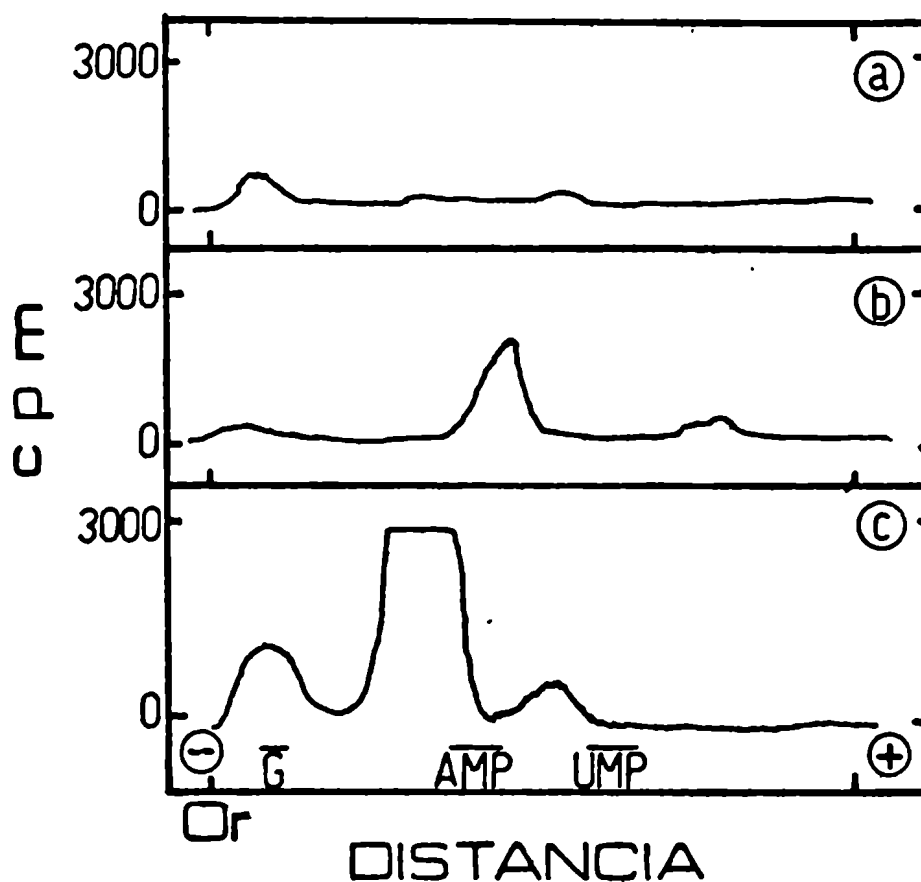


Figura 60: Obtención de $(^3\text{H})\text{glu}$ - $(^{14}\text{C})\text{glnico}$ X6: Se obtuvo el compuesto mediante una incubación en dos etapas. En una primer etapa se realizó una incubación estándar en escala x 3, con 630 μg de proteína, 20 nmoles de UDPglu y 2.500 pmoles de GDPman, 40 minutos a 30°C . Luego de parar la reacción con EDTA y lavar el "pellet", se dividió la resuspensión en tres partes iguales: a), b) y c) y se realizaron los siguientes agregados.

- a) 497 pmoles de UDP(^3H)glu.
- b) 528 pmoles de UDP(^{14}C)glnico.
- c) 497 pmoles de UDP(^3H)glu + 528 pmoles de UDP(^{14}C)glnico.

Se incubaron a), b) y c) 30 minutos a 30°C y se procesaron según método C₂. El producto hidrosoluble obtenido se electroforétizó en buffer I.

- a) Cuando se incubó en la segunda etapa con UDP(^3H)glu únicamente (Fig.60 a)) se obtuvieron solamente compuestos neutros (probablemente (^3H)glu, man-(^3H)celobiosa y (^3H)glucano, que se extrajo parcialmente con solvente 1,2,0.3). No se formó (^3H)gluX₆.
- b) Cuando se incubó con UDP(^{14}C)glnico en la segunda etapa (Fig. 60 b)), se obtuvo solamente (^{14}C)glnicoX₄ ($R_{\text{UMP}}=0.7$) y nada de (^{14}C)glnicoX₆. También se obtuvieron dos picos más pequeños, uno neutro correspondiente a (^{14}C)glucuronolactona y otro de $R_{\text{UMP}}=1.1$ correspondiente a (^{14}C)glnico-X₄-P-cíclico.
- c) Finalmente cuando se incubó con los dos nucleótidos radioactivos simultáneamente (Fig.60 c)), si bien se observaron dos picos pequeños, uno neutro (corresponde a neutros de a) + b)) y otro de $R_{\text{UMP}}=0.9$ de (^3H)glu-(^{14}C)glnico-X₆-P-cíclico, se obtuvo un pico principal de (^3H)glu-(^{14}C)glnicoX₆, de $R_{\text{UMP}}=0.5$, y aparentemente nada de (^{14}C)glnicoX₄, lo que implicaría que la transferencia de X₄ a X₆ fue completa. Se cluyó el (^3H)glu-(^{14}C)glnicoX₆ y se contó diferencialmente (^3H) y (^{14}C) (sección 3.5.1.). La relación obtenida fue de 2,0/1.

Estos resultados indican que el oligosacárido investigado es un hexasacárido, o sea, X₆=(glu)₂-glnico-man-glu-glu, confirmando lo interpretado anteriormente respecto de su volumen de elución de la columna de Biogel P-2.

4.4.3.4. Hidrólisis ácida parcial de (^{14}C)(glu)₂-glnico-man-glu-glu

Para tener información acerca de la forma en que las dos nuevas glucosas se unían al tetrasacárido X₄, se realizaron hidrólisis

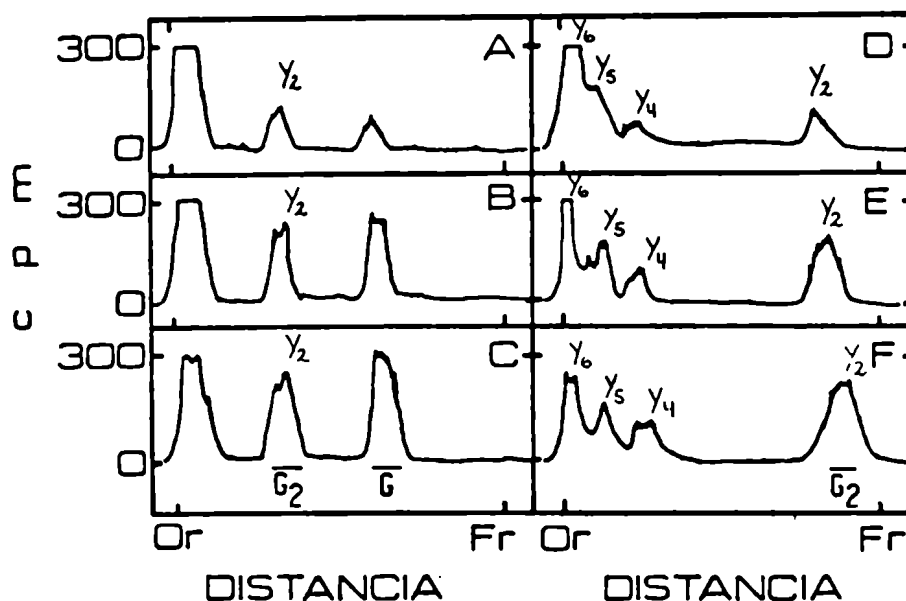


Figura 61: Hidrólisis ácida parcial de $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$: Se obtuvo $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$ incubando 30 minutos a 30°C con 400 μg de enzima, 2.500 pmoles de $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{glu}$ (266 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y 500 pmoles de UDPgluc . Se procesaron los incubados según el método B, el extracto liposoluble se sometió a hidrólisis ácida suave y el producto hidrosoluble (100%) se electroforizó en buffer I. Se eluyó el pico correspondiente a $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$, se dividió en tres partes iguales (8.000 $\text{cpm}/\text{c}/\text{u}$) y las alícuotas se hidrolizaron (HCl 0.1N, + Resina Dowex E^+ 50 x 8) durante 1 hora, A), 2 horas B) y 3 horas C). Los hidrolizados se cromatografiaron durante 20 horas (A, B, y C) en solvente H, y se rechromatografiaron en el mismo solvente durante 72 horas (D, E y F).

ácidas parciales de $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$ durante distintos tiempos y se analizaron los productos formados (Fig.61).

Los perfiles cromatográficos muestran que ya en la primera hora de hidrólisis (Fig.61 A) se liberó $(^{14}\text{C})\text{glucosa}$ y un compuesto que se denominó Y_2 (cocromatografió con el disacárido genciobio

sa). En dos y tres horas de hidrólisis (Fig.61 B y C) aumentó la proporción de ambos compuestos. Tanto en A), B), como en C) se obtuvo un tercer pico que migró cerca del origen.

Al recromatografiar las tiras por 72 horas más, en los tres casos (D, E y F) desapareció la (^{14}C)glucosa pues se fue con el frente del solvente, y el pico del origen se resolvió en otros tres que denominamos Y_4 , Y_5 e Y_6 . Los tres se comportaron como aniones en electroforesis en buffer I (datos no mostrados).

El compuesto Y_2 cuya unión al resto de la molécula parece ser bastante ácido lábil se estudió en cierto detalle.

4.4.3.5. Estudio del compuesto (^{14}C)glu Y_2 ..- Sometido el (^{14}C)glu Y_2 a cromatografía en solvente H, migró con un R_{glu} coincidente con el de los disacáridos de glucosa: genciobiosa (β glucosil(1,6)glucosa) e isomaltosa (α glucosil(1,6)glucosa). Luego de hidrólisis ácida total (HCl 1N, 3 horas 100°C) dió un solo producto que cocromatografió con glucosa estándar en solvente F (datos no mostrados). Electroforetizado en buffer I se comportó como un compuesto neutro (Fig.62 a)) mientras que en buffer J migró en la zona de las hexosas neutras, es decir, no formó complejos con el molibdato (Fig.62 b)). Reducido con borohidruro, el poliol correspondiente migró en electroforesis en buffer J con un R_{sorbitol} similar al de genciobitol e isomaltitol (Fig.62 c)). Por hidrólisis total del mismo se obtuvo (^{14}C)glucosa y (^{14}C)sorbitol en cantidades iguales (Fig.62 d)).

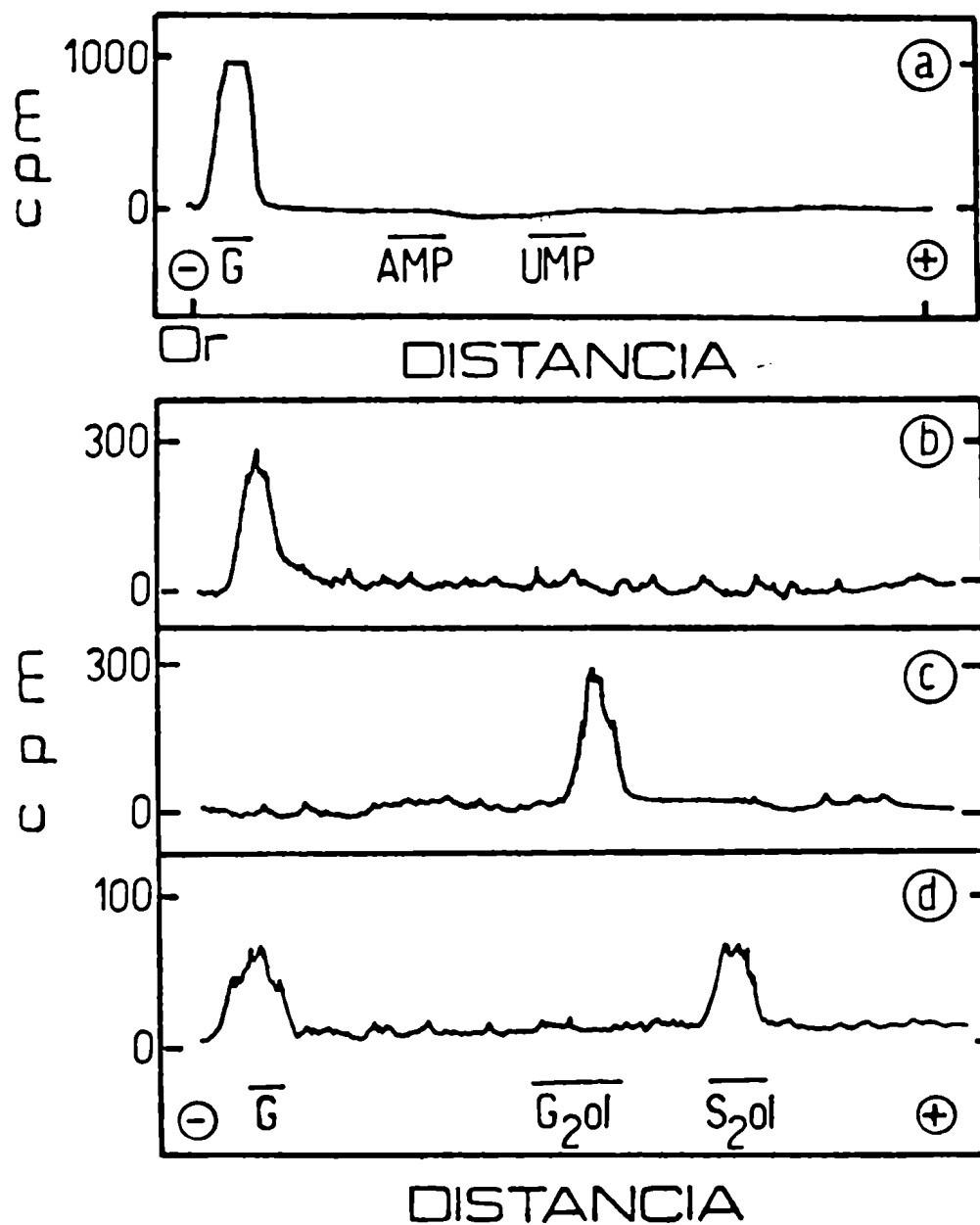


Figura 62: Análisis del $(^{14}\text{C})\text{gluY}_2$: El compuesto se obtuvo y caracterizó como en la Fig. 61 (tres horas de hidrólisis). Eluido del cromatograma en solvente H se dividió en cuatro fracciones, que fueron analizadas de la siguiente manera:
 a) Electroforesis en buffer I y b), en buffer J.
 c) Electroforesis en buffer J del $(^{14}\text{C})\text{gluY}_2$ reducido con borohidruro y d), del producto de hidrólisis ácida total de este último (F3AcOH 0.2M, 100°C, 2 horas).

Todas estas características confirmaron que se estaba ante un disacárido de glucosa; faltaba determinar si era genciobiosa o isomaltosa (no se pueden distinguir por ninguno de los criterios utilizados). Para dilucidar el problema se recurrió al uso de glicosidasas; como no se disponía de α y β glucosidasas puras, se buscaron condiciones para que actuara la β sin contaminación de la α y viceversa (Fig.63).

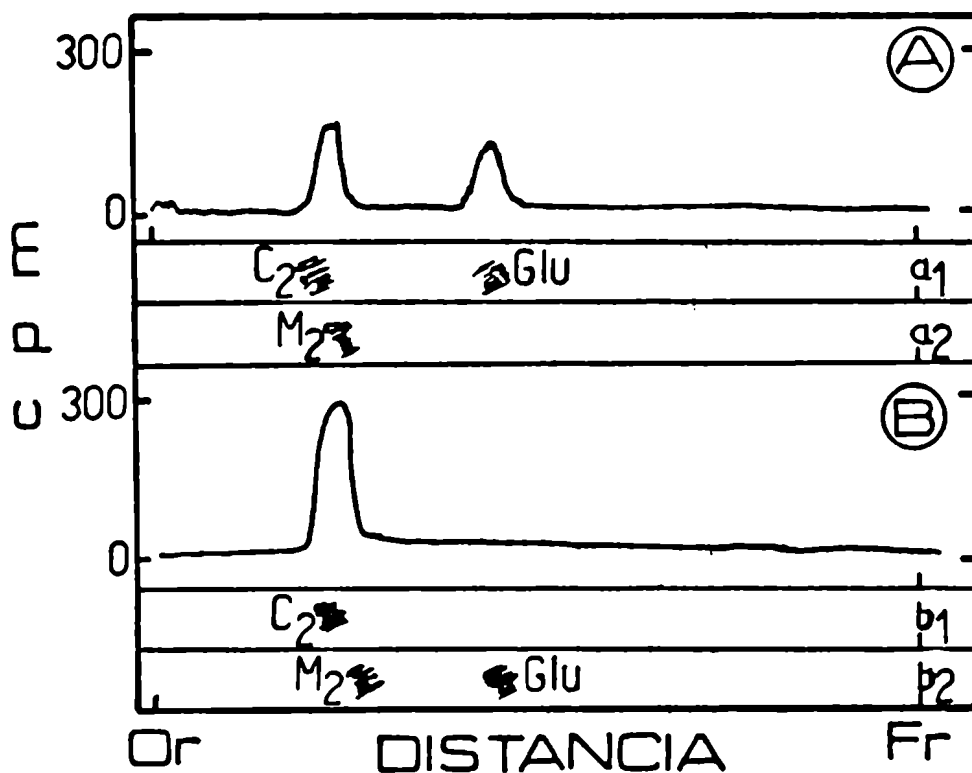


Figura 63: Tratamiento enzimático de (^{14}C)gluY₂: El compuesto se obtuvo como en la Fig.61 y se eluyó con agua, 3.000 cpm del mismo se trataron con β -glucosidasa en condiciones en que no actúa la α -glucosidasa contaminante (sección 3.3.9.), A. En las mismas condiciones se trataron 0.2 μmoles de celobiosa (a₁) y de maltosa (a₂). Los productos de dichos tratamientos se cromatografiaron en solvente H. Otra alícuota de 3.000 cpm se trató con α -glucosidasa en condiciones en que no actúa la β -glucosidasa contaminante (sección 3.3.9.), B. En las mismas condiciones se trataron 0.2 μmoles de celobiosa y de maltosa, (b₁) y (b₂) respectivamente. Los productos de dichos tratamientos se cromatografiaron en solvente H.

El oligosacárido (^{14}C)gluY₂ se hidrolizó parcialmente frente a la acción de la β -glucosidasa (Fig.63 A) en condiciones con las cuales a la celobiosa le sucede lo mismo (Fig.63 a₁) y la maltosa permanece inalterada (Fig.63 a₂)).

Por otra parte el oligosacárido permaneció inalterado frente a la acción de la α -glucosidasa (Fig.63 B), en condiciones en que la celobiosa no se ataca (Fig.63 b₁) y la maltosa se hidroliza parcialmente (Fig.63 b₂)).

Estos resultados indican que Y₂ posee una unión E-D-glucosa y por lo tanto, de acuerdo a lo visto anteriormente se concluyó que Y₂ es gencibiosa, o sea β glucosil(1,6)glucosa:

4.4.3.6. Hidrólisis ácida parcial de (^{14}C)glucoX₆ y (^{14}C)manX₆.

Como una confirmación más de que el oligosacárido X₆ que marcábamos alternativamente con manosa, glucosa o ácido glucurónico era el mismo compuesto y con el objeto de poder tener alguna información adicional, se sometió a hidrólisis ácida parcial a (^{14}C)glucoX₆ y (^{14}C)manX₆ y los productos de dicho tratamiento se analizaron cromatográficamente (Fig.64 a) y b) respectivamente).

Los perfiles cromatográficos de los productos de ruptura de ambos resultaron muy similares. En a) se obtuvo un pico radioactivo pequeño que migró como (^{14}C)gluco y en b) un pico que coincidió con manosa estándar, señal evidente de que al menos en pequeña proporción se rompió la unión glucuronil-manosa.

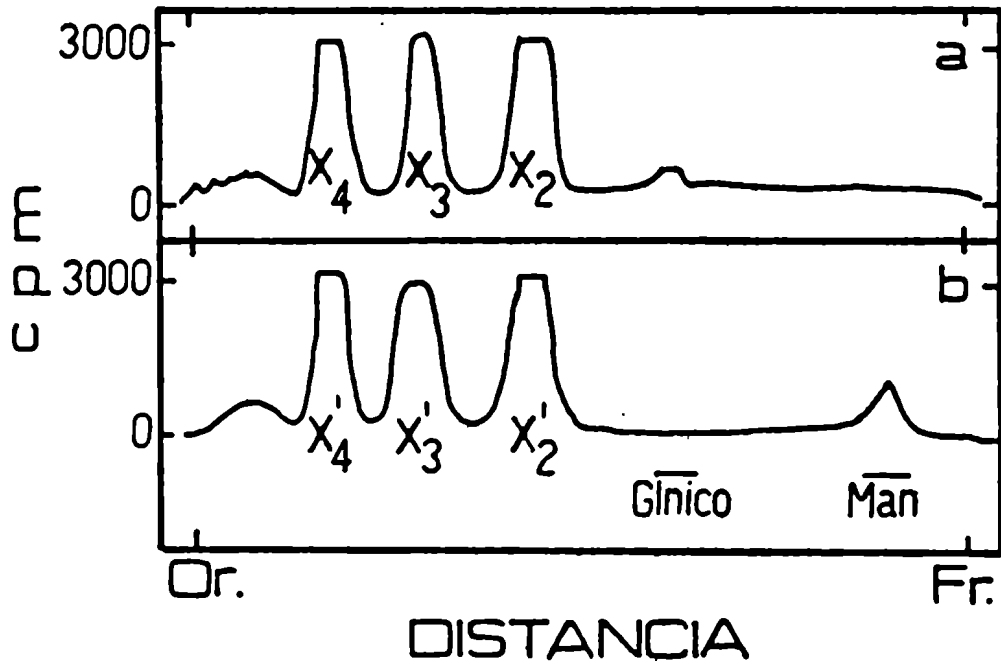


Figura 64: Hidrólisis ácida parcial de $(^{14}\text{C})\text{glucosilX}_6$ y $(^{14}\text{C})\text{manosilX}_6$: Se obtuvo lípido- $(^{14}\text{C})\text{glucosilX}_6$ incubando 30 minutos a 30°C , con 480 μg de proteína, 528 pmoles de UDP($^{14}\text{C})\text{glucosil}$ (309 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 500 pmoles de GDPMan y 2.500 pmoles de UDPglu y lípido- $(^{14}\text{C})\text{manosilX}_6$ en las mismas condiciones pero utilizando como nucleótidos 500 pmoles de GDP($^{14}\text{C})\text{man}$ (208 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 500 pmoles de UDPglucosil y 2.500 pmoles de UDPglu. Mediante hidrólisis ácida suave de los lípido-azúcares correspondientes y posterior electroforesis en buffer I de los productos de ruptura de los mismos, se aislaron $(^{14}\text{C})\text{glucosilX}_6$ y $(^{14}\text{C})\text{manosilX}_6$. Se cromatografiaron en solvente H los productos de hidrólisis ácida parcial (HCl 0.1N + Resina Dowex H^+ 50 x 8, 5 horas 30 minutos, 100°C) de $(^{14}\text{C})\text{glucosilX}_6$, a) y $(^{14}\text{C})\text{manosilX}_6$, b).

Los tres picos radioactivos más importantes de a) X_2 , X_3 y X_4 y los correspondientes X'_2 , X'_3 y X'_4 de b) coincidieron, por su movilidad en solvente H, con los productos de hidrólisis ácida del tetrasacárido: glucuronil-manosa, glucuronil-manisil-glucosa y glucuronil-manosil-celobiosa (sección 4.3.3.1.).

La similitud de los perfiles cromatográficos de los productos de hidrólisis de los hexasacáridos (Fig.64) con la de los tetrasacáridos (Fig.42) es perfectamente explicable si se tiene en cuenta la labilidad a la hidrólisis ácida de la unión de la genciobiosa al resto de la molécula (sección 4.4.3.2.) (considerar que las glucosas no están marcadas).

A diferencia de los perfiles de hidrólisis ácida parcial del tetrasacárido, en a) y en b) se observa radioactividad en la zona cercana al origen que puede corresponder a X_6 (compuesto de partida) o a un pentasacárido X_5 resultante de la pérdida de un azúcar de un extremo del mismo.

4.4.3.7. Confirmación de la estructura de X_2 .- Como una comprobación más de que los productos de degradación del hexasacárido con marca en (^{14}C)manosa y en (^{14}C)glucurónico eran los que se sospechaba, se sintetizó el (^{14}C)man(^{14}C)glucosil- X_6 -P-P-prenol, se sometió el oligosacárido a hidrólisis ácida parcial y se estudió con cierto detalle el oligosacárido X_2 . Este compuesto había sido estudiado como producto de degradación del oligosacárido X_4 ya sea con marca en (^{14}C)manosa o en (^{14}C)glucurónico (sección 4.3.3.1.).

Se realizó una incubación en dos etapas (Fig.65). En la prime-

ra etapa se incubó con UDP(^{14}C)glucurónico, para transformar el posible manosil-celobiosa-P-P-prenol endógeno en glnico-manosa-celobiosa-P-P-prenol, de manera que en la reincubación no se cargara con ácido glucurónico un compuesto que no tuviera manosa marcada.

En la segunda etapa se incubó en presencia de GDP(^{14}C)manosa, UDP(^{14}C)glucurónico y UDPglucosa no radioactivo, para obtener (^{14}C)glnico(^{14}C)manX₆-P-P-prenol.

Los productos liposolubles obtenidos se cromatografiaron en solvente C (Fig.65 a)), se obtuvo un compuesto radioactivo principal de $R_f=0.2$ que migra en la posición de X₆1,2P-cíclico (sección 4.4.3.1.). Se eluyó dicho compuesto, se sometió a hidrólisis ácida parcial durante más tiempo que en la Fig.64 y los productos de dicho tratamiento se sometieron a electroforesis en buffer I (Fig.65 b)). Se eluyó el compuesto de $R_{\text{UMP}}=0.9$ (movilidad de X₂ en este sistema) que en este caso es mayoritario debido a la hidrólisis más prolongada y se cromatografió en solvente H (Fig.65 c)).

Se obtuvo un sólo pico radioactivo con la movilidad de X₂ en este sistema. Se eluyó, se sometió a β -glucuronidasa y el producto del tratamiento se electroforetizó en buffer I (Fig.65 d)). Puede apreciarse en la misma que la mayoría del compuesto se degradó obteniéndose un pico neutro y otro que migró como ácido glucurónico. Ambos se eluyeron, se cromatografiaron en solvente H y migraron respectivamente como (^{14}C)manosa y (^{14}C)glucurónico (Fig.65 e) y f)).

Los resultados obtenidos indican que: se sintetizó (^{14}C)man (^{14}C)glnicoX₆ y que el principal producto de la hidrólisis ácida a que fue sometido se comportó como β (^{14}C)glucuronil-(^{14}C)manosa.

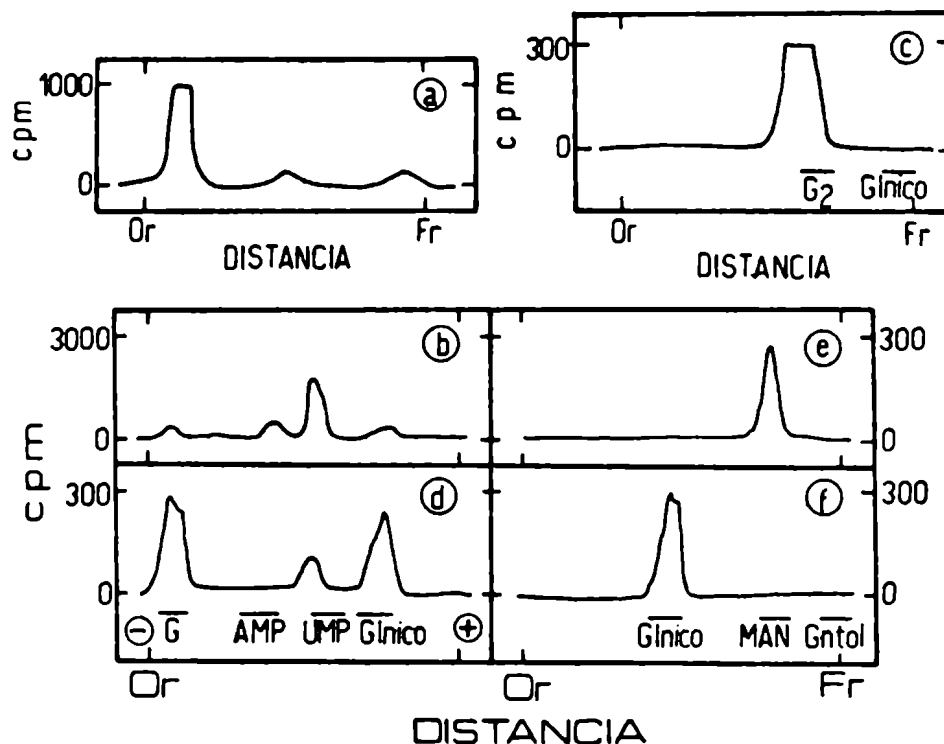


Figura 65: Obtención de $(^{14}\text{C})\text{glnico}$ ($(^{14}\text{C})\text{manX}_6$ y caracterización de $(^{14}\text{C})\text{glnico}$ - $(^{14}\text{C})\text{man}$ obtenido por hidrólisis del mismo: Se realizó una incubación estándar con 120 μg de enzima, 2.5 nmoles de UDP glnico, 30 minutos a 30°C . Se procesó según método C. El "pellet" lavado se incubó 30 minutos a 30°C con 20 nmoles de UDPglu, 528 pmoles de UDP $(^{14}\text{C})\text{glnico}$ (309 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y 3.008 pmoles de GDP $(^{14}\text{C})\text{man}$ (226 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). Se procesó según método C₂ y el extracto liposoluble se cromatografió en solvente C, a). El X₆-P-cíclico eluido de a) se hidrolizó con HCl 0.1N + Res Dowex 50 x 8 a 100°C durante 7 horas, el producto de hidrólisis se electroforetizó en buffer I, b). El compuesto de R_{UMP}=0.9 de b), se eluyó y se cromatografió en solvente H, c). Se eluyó de c) y se trató con β -glucuronidasa, luego de lo cual se electroforetizó en buffer I, d). e) y f) corresponden a cromatografías en solvente H de los compuestos que en d) migraron respectivamente como glucosa y ácido glucurónico.

4.4.4. Determinación de la unión del disacárido genciobiosa al oligosacárido X₄

Con los resultados obtenidos hasta el momento se podrían plantear cuatro posibles estructuras para el oligosacárido X₆, a saber:

- a)

glnico-manosa-glucosa-glucosa-P-P-prenol

↑

glucosa-glucosa
- b)

glnico-manosa-glucosa-glucosa-P-P-prenol

↑

glucosa-glucosa
- c)

glnico-manosa-glucosa-glucosa-P-P-prenol

↑

glucosa-glucosa
- d)

glnico-manosa-glucosa-glucosa-P-P-prenol

↑

glucosa-glucosa

De las cuatro estructuras planteadas, a) y b) parecían las más improbables por el hecho de que en las hidrólisis ácidas parciales del hexasacárido con marca en glucosa, no se liberaban oligosacáridos neutros mayores que un disacárido (Fig. 61, sección 4.4.3.4.). En el caso de que la configuración correcta fuera la c) o la d) esto sería explicable porque al ser la unión del ácido glucurónico a la manosa muy resistente a la hidrólisis ácida, no se obtendrían por dicho método oligosacáridos neutros distintos de celobiosa o genciobiosa.

Una manera de establecer si la estructura correcta de X₆ era c) o d) consistía en poder obtener respectivamente, por algún méto-

do degradativo, glucosil-manosa o glucosil-glucurónico. Se pensó en fragmentar el oligosacárido por acetólisis, teniendo en cuenta que la unión del glucurónico a la manosa era 1,6 (sección 4.3.3.2.) y que las uniones 1,6 son lábiles a este tipo de tratamiento.

En lo que sigue, se van a describir los resultados obtenidos por acetólisis parcial del hexasacárido marcado alternativamente en los distintos azúcares que lo componen.

4.4.4.1. Acetólisis parciales sobre el hexasacárido con marca en manosa, glucosa, o en ácido glucurónico. - Se obtuvo el hexasa-

cárido-P-P-prenol mediante incubaciones similares a las descritas hasta el momento, utilizando como sustratos radioactivos los distintos nucleótidos-azúcares de acuerdo a la parte de la molécula que se quería marcar. Se hicieron las siguientes combinaciones:

- 1) Sustratos: UDP(¹⁴C)glu y UDPglnico. Se obtuvo el compuesto marcado únicamente en las glucosas del extremo no reductor (genciobiosa). Es conveniente recordar que en este caso al no estar presente el GDPman en la incubación, aunque se formara (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol, este no podría seguir creciendo porque no incorporaría manosa. Por lo tanto se obtuvo el hexasacárido-P-P-prenol marcado, por incorporación de ácido glucurónico y posteriormente (¹⁴C)glucosas sobre el manosil-glucosil-glucosa-P-P-prenol endógeno.
- 2) Sustratos: UDP(¹⁴C)glnico, GDPman y UDPglu. Se obtuvo el compuesto con marca en ácido glucurónico.
- 3) Sustratos: UDP(¹⁴C)glu, GDPman y UDPglnico. De esta manera al incubarse con los tres nucleótidos simultáneamente, se obtuvo el hexa-

sacárido-P-P-prenol marcado en las glucosas del extremo reductor (celobiosa) y no reductor (genciobiosa).

4) Sustratos: GDP(^{14}C)man, UDPglu y UDPglnico. Se obtuvo el compuesto con marca en manosa.

Una vez obtenido el hexasacárido-P-P-prenol marcado, se lo sometió a hidrólisis ácida suave, se aisló el oligosacárido correspondiente y se acetolizó este último. Los productos desacetilados se cromatografiaron en solvente H. En la Fig.66 a) se observan los productos obtenidos por acetolisis del compuesto sintetizado según la combinación 1).

Se obtuvieron dos productos radioactivos principales: el compuesto que denominamos I cocromatografió con glucosa y también se comportó como glucosa en electroforesis en buffer K (datos no mostrados) El compuesto II que migró con un $R_{\text{genciobiosa}}=0.9$, eluido y sometido a electroforesis (Fig.66 b)) dió dos picos radioactivos que denominamos IIa) y IIb). Prestamos especial atención al IIa) porque el hecho que tuviera carga implicaba que poseía en su estructura alguna molécula de ácido glucurónico y por otra parte su movilidad (tanto en solvente H como en electroforesis en buffer I) era igual que la del disacárido glucuronil-manosa, ya conocido. Pareció probable que se estuviera ante el disacárido (^{14}C)glucosil-glucurónico, en cuyo caso no cabría dudas de que la configuración del hexasacárido sería la d).

El compuesto IIa) migró en electroforesis en buffer J (Fig.66 c)) con un $R_{\text{sorbitol}}=0.8$; reducido con borohidruro, al transformar

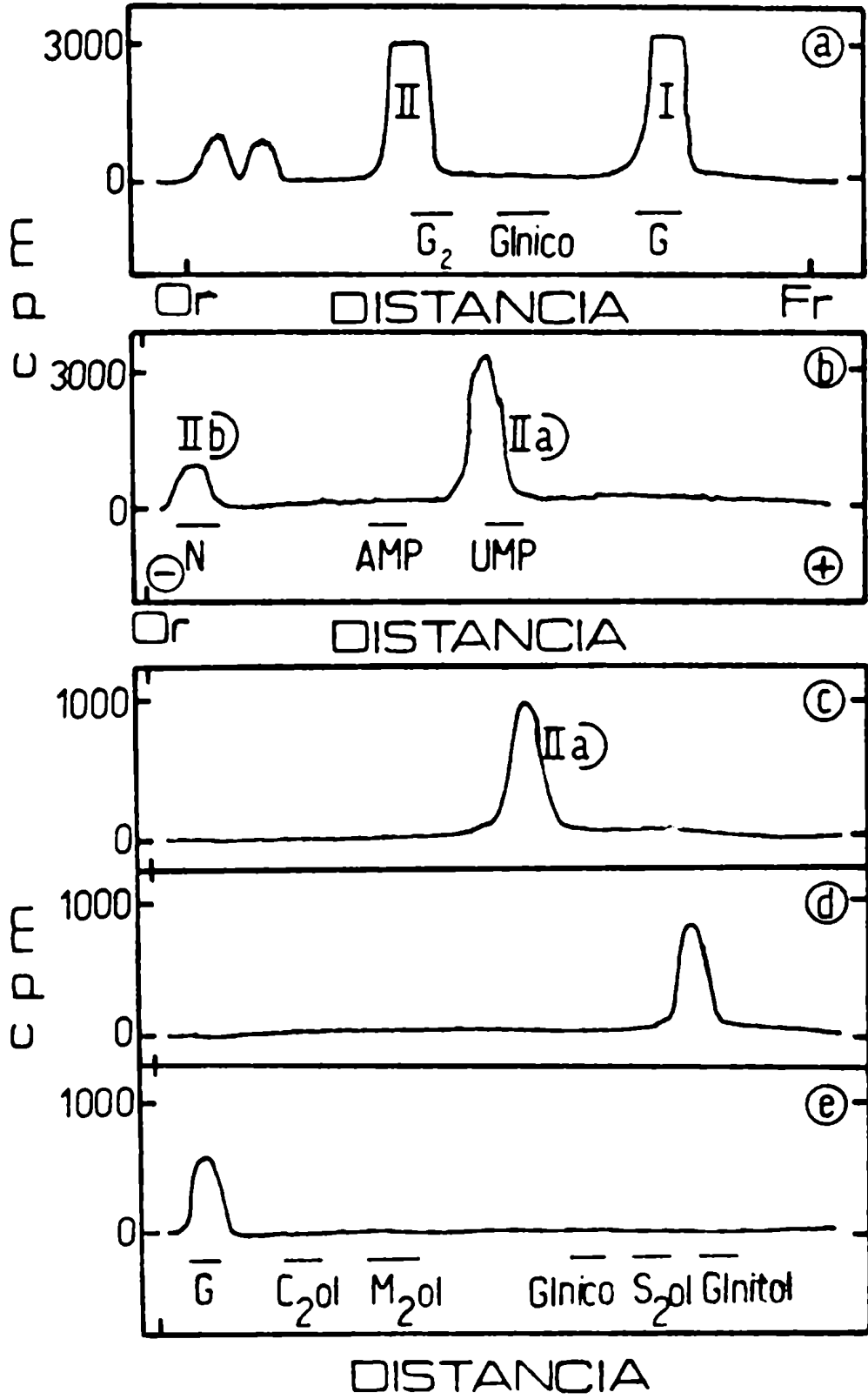


Figura 66: Acetólisis de (^{14}C)gluX₆: Se incubó 1 hora a 30°C con 2.500 pmoles de UDP(^{14}C)glu (268 uCi/umol), 500 pmoles de UDPglucónico (combinación 1), 410 ug de enzima en las condiciones estándar. Se procesó según método B; el extracto B se sometió a hidrólisis ácida suave, el producto hidrosoluble obtenido se electroforetizó en buffer I y se eluyó el oligosacárido correspondiente. 20.000 cpm (de un "pool" de incubaciones) se acetolizaron (sección 3.3.6.) y el producto se cromatografió en solvente H, a).

El compuesto II se eluyó de a) y se electroforetizó en buffer I, b). El compuesto IIa) se eluyó de b) y se dividió en tres partes iguales que se sometieron a electroforesis en buffer J luego de:

- c) tal cual.
- d) reducción con borohidruro.
- e) reducción con borohidruro seguida de hidrólisis ácida total ($\text{H}_2\text{F}_3\text{AcOH}$ 0.2N, 1 hora, 100 C).

el azúcar del extremo reductor en el polialcohol correspondiente, pasó a tener un $R_{\text{sorbitol}}=1.16$ en el mismo sistema (Fig.66 d)) y este último luego de hidrólisis total liberó como único compuesto radioactivo (^{14}C)glucosa (Fig.66 e)) (confirmado por cromatografía en solvente H, no mostrado).

Estos resultados estarían en concordancia con la hipótesis de que IIa) sería (^{14}C)glucosil-glucurónico, pues la (^{14}C)glucosa al estar en el extremo no reductor no sufriría ninguna alteración con el borohidruro. Su producto de reducción (Fig.66 d)) sería por lo tanto (^{14}C)glucosil-glucuronitol que por hidrólisis ácida daría (^{14}C)glucosa y glucuronitol no radioactivo.

Parte del compuesto IIb) de la Fig.66 b), por un tratamiento alcalino suave se transformó en un compuesto con las mismas propiedades que el IIa) (datos no mostrados). Esto es compatible con el hecho de que IIb) sería la lactona de IIa) que por tratamiento alcalino abre su ciclo y se convierte en este último.

Una confirmación total de lo visto hasta el momento lo daría el poder aislar el compuesto glucosil-(^{14}C)glucurónico.

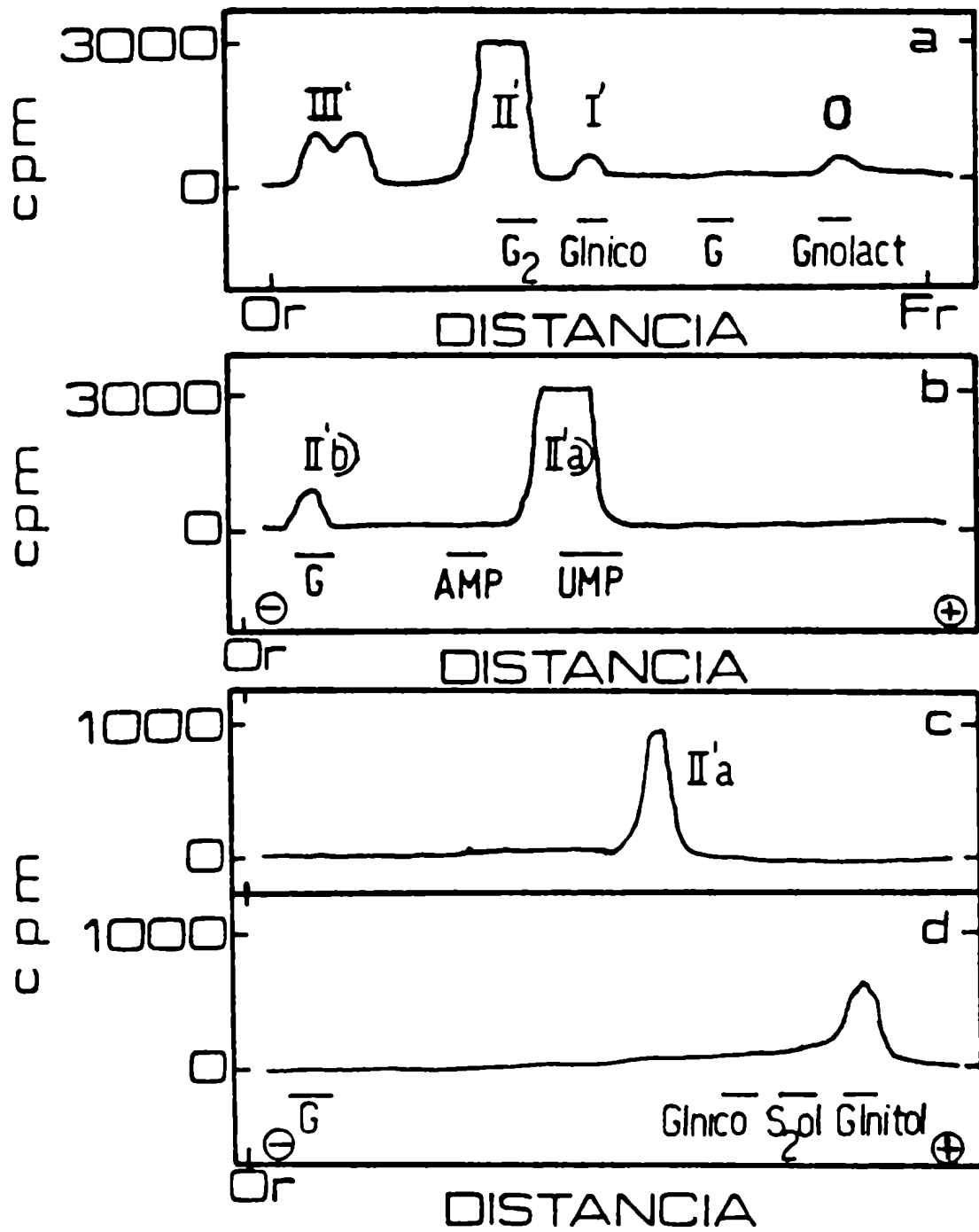


Figura 67: Acetolisis de (^{14}C)glucosilX₆: Se incubó 1 hora a 30°C con 528 pmoles de UDP(^{14}C)glucosil (309 uCi/umol), 2.500 pmoles de UDPglu, 2.500 pmoles de GDPman (combinación 2), 410 ug de proteína en las condiciones estándar. Se procesó según método B; el extracto E se sometió a hidrólisis ácida suave y el producto hidrosoluble se electroforesizó en buffer I. Se eluyó el oligosacárido correspondiente y 20.000 cpm (de un "pool de incubaciones") se acetolizaron y el producto se cromatografió en solvente H, a). El compuesto II' eluido de a) se electroforesizó en buffer I, b). El compuesto II'a) se eluyó de b) y se dividió en dos partes; una se electroforesizó en buffer J tal cual, c) y la otra luego de reducción con borohidruro y posterior hidrólisis ácida (F₂AcOH 0.2N, 1 hora 100°C), d).

En la Fig.67 se observan los productos de acetolisis de (^{14}C)glucosilX₆ obtenido según la combinación 2). Los compuestos I' y O se caracterizaron como ácido glucurónico y su lactona, respectivamente (datos no mostrados); esto concuerda con el hecho de que la acetolisis rompe la unión glucuronil-manosa.

El compuesto III' no se estudió.

El pico que llamamos II', con $R_{\text{genciobiosa}} = 0.9$ (ídem al II de la Fig.66 a)) se sometió a electroforesis (Fig.67 b)) y también en este caso se observaron dos compuestos, uno neutro y otro cargado, II'b) y II'a) respectivamente.

El compuesto II'a) migró en electroforesis en buffer J (Fig.67 c)) con $R_{\text{sorbitol}} = 0.79$, similar a la movilidad de IIa) de la Fig.66 c). Finalmente por hidrólisis total de II'a) reducido se obtuvo (^{14}C)glucuronitol (Fig.67 d)).

Todos estos resultados son compatibles con que el compuesto que denominamos II'a) es glucosil-(^{14}C)glucosil, confirmando que la estructura de X₆ es la propuesta como d), o sea:

glucosa-glucosa-glucurónico-manosa-glucosa-glucosa

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

...the ...

Las acetolisis realizadas sobre el X_6 obtenido con las combinaciones 3) y 4) dieron productos que son compatibles con la interpretación arriba mencionada (Fig.68).

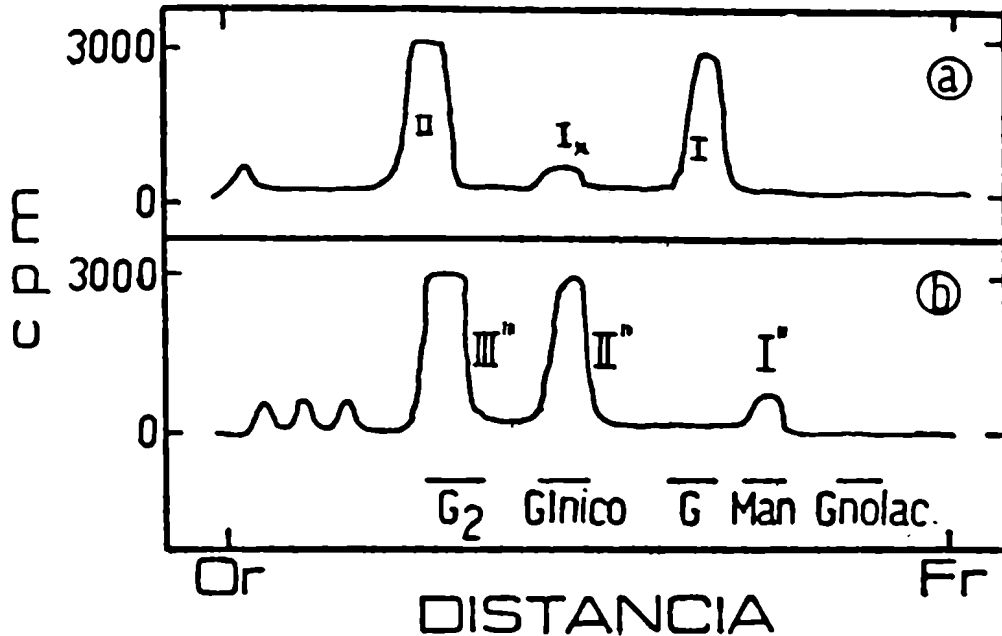


Figura 68: Acetolisis de $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$ y de $(^{14}\text{C})\text{manX}_6$: El $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$ se obtuvo y aisló de la misma manera que en la Fig.66 con la única diferencia que en las incubaciones, además de UDPglnico se agregó 2.500 pmoles de GDPman (combinación 3)). El $(^{14}\text{C})\text{manX}_6$ se obtuvo por incubación 1 hora a 30°C con 133 pmoles de GDPman (227 uCi/umol), 2.500 pmoles de UDPglu y 500 pmoles de UDPglnico (combinación 4)), 410 ug de enzima, en las condiciones estándar. Se procesó según método B, el extracto B se sometió a hidrólisis ácida suave y se eluyó el oligosacárido correspondiente. 20.000 cpm (de un "pool" de incubación) se acetolizaron. Se cromatografiaron en solvente H los productos de acetolisis de $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$, a) y de $(^{14}\text{C})\text{manX}_6$, b).

El perfil obtenido en a) con la combinación 3) (Fig.68 a)) es similar al de la Fig.66 a), con la diferencia de la aparición de un compuesto I_x con la movilidad del ácido glucurónico. Por electrofres-

sis en buffer I (no mostrado) se determinó que dicho compuesto era neutro. El R_{glu} del mismo en solvente H coincidió con el de manosil-glucosa, ya conocido (Fig.32, sección 4.2.3.7.). La obtención de manosil- $(^{14}C)glu$ con la combinación 3) era esperable, por el hecho de que en este caso poseen marca las glucosas del extremo reductor del oligosacárido X_6 .

En cuanto al perfil con marca en manosa (combinación 4)), b), los productos obtenidos I''', II''' y III''' se caracterizaron en forma análoga como $(^{14}C)manosa$, $(^{14}C)manosil-glucosa$ y $(^{14}C)manosil-celobiosa$ respectivamente.

4.4.5. Obtención de $X_6-(^{32}P)-P-prenol$

Se comentó en la sección 2.1. que al encontrar por primera vez el compuesto que actualmente conocemos como $X_6-P-P-prenol$, se lo intentó obtener con marca en (^{32}P) utilizando como sustratos $UD(^{32}P)glu$ y $UD(^{32}P)glnico$ y se fracasó en dicho intento. Con los conocimientos que posteriormente se adquirieron sobre el mismo se pudo sintetizar $X_6-(^{32}P)-P-prenol$ utilizando como sustrato $UD(^{32}P)glu$ en presencia de $UDPglnico$ y $GDPman$.

En la Fig.69 a) se observa que incubando sólo con $UD(^{32}P)glu$ se obtuvo un pico radioactivo de $R_f=0.5$ (mezcla de $glu-P-cíclico$ y $celobiosa-P-cíclico$, pues este solvente no lo separa claramente). En cambio cuando se incubó con $UD(^{32}P)glu$ en presencia de $UDPglnico$ y $GDPman$, se obtuvo un pico de radioactividad en la zona de $R_f=0.2$ donde migra el $X_6-(^{32}P)-cíclico$ buscado (Fig.69 b)). La identidad de este

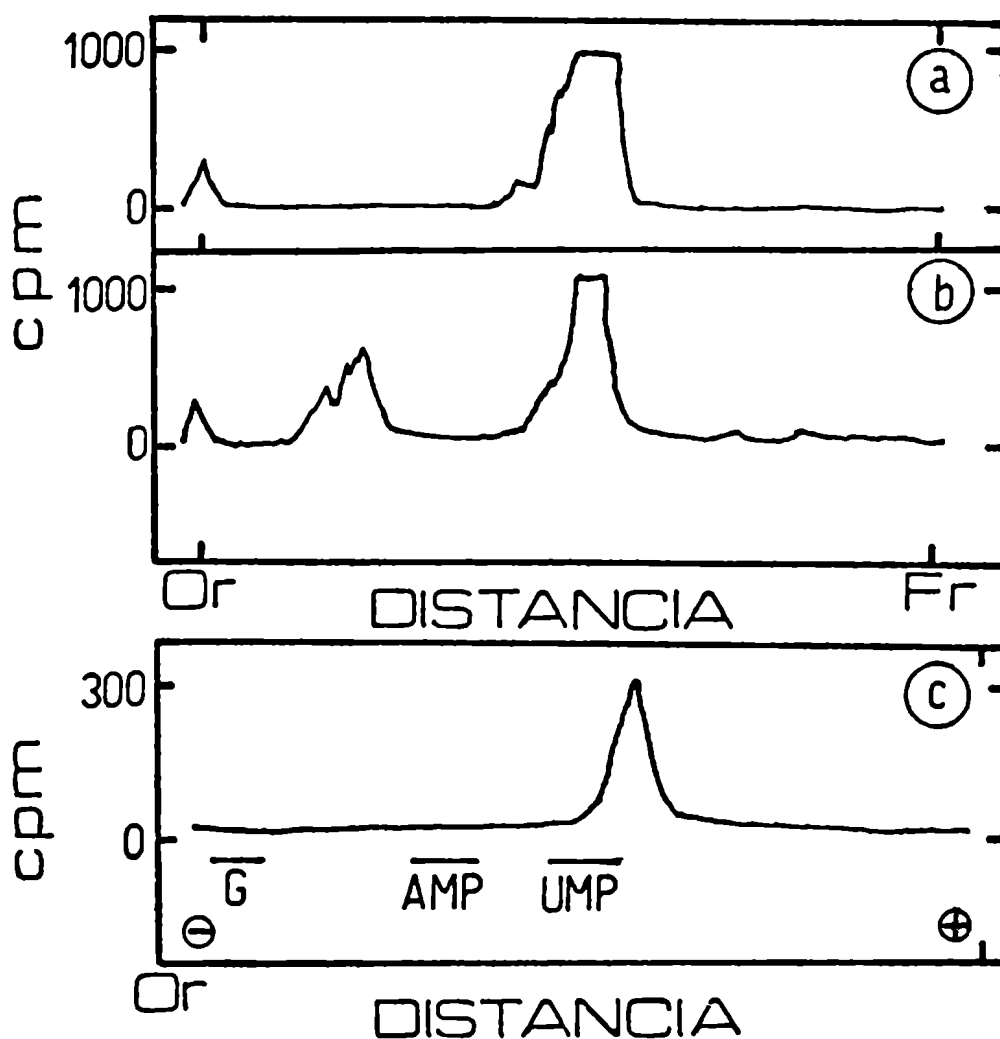


Figure 69: Obtención de $X_6-(^{32}\text{P})\text{-P-phenol}$: Se realizaron dos incubaciones estándar, 1 hora a 30°C con 150 μg de proteína, utilizando como sustratos, en a) 5.000 pmoles de $\text{UD}(^{32}\text{P})\text{glu}$ (209×10^6 cpm) y en b) 5.000 pmoles de $\text{UD}(^{32}\text{P})\text{glu}$ (208×10^6 cpm), 5.000 pmoles de UDPglu y 2.500 pmoles de GDPman . Se procesaron ambas según método B y el extracto B se cromatografió en solvente B; ver a) y b) respectivamente. Se eluyó el compuesto que en b) migró con $R_f=0.2$ y se lo electroforétizó en buffer I, c).

último se confirmó por su movilidad ($R_{\text{UMP}}=1.1$) en buffer I (Fig.69 c)).

Todos estos resultados justifican los obtenidos anteriormente (sección 2.1) y constituyen una confirmación más de todo lo que se ha propuesto a lo largo de este estudio.

4.4.6. Obtención de (^{14}C)manX₆-P-P-prenol a partir de (^{14}C)man-celobiososa-P-P-prenol

Finalmente se realizaron experimentos para sintetizar X₆-P-P-prenol a partir de un precursor lipídico agregado en forma exógena a la mezcla de incubación. De manera análoga a la seguida en la obtención de glnico-manosa-celobiososa-P-P-prenol (Fig.45) se incubó esta vez con (^{14}C)man-celobiososa-P-P-prenol en presencia de UDPglnico y UDPglu.

El (^{14}C)manosil-celobiososa-P-P-prenol inicial (Fig.70 a)) incubado en presencia de UDPglu y UDPglnico se transformó en parte en (^{14}C)manX₆-P-P-prenol (Fig.70 b)). Prácticamente este último resultado permite decir que todas las etapas de síntesis de X₆-P-P-prenol se han podido realizar incubando él o los nucleótido-azúcares correspondientes en presencia del precursor lipídico respectivo agregado en forma exógena.

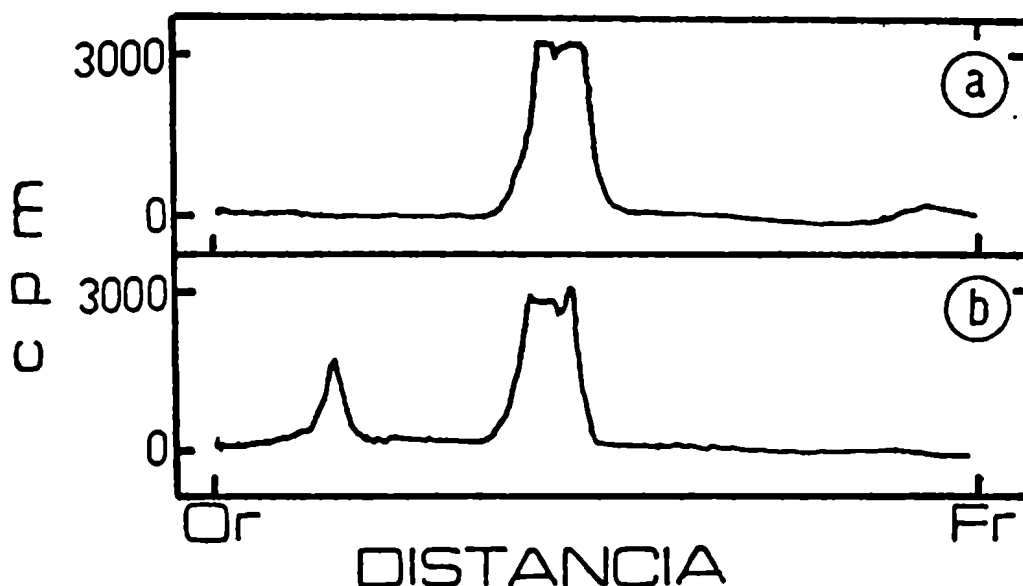


Figura 70: Obtención de $(^{14}\text{C})\text{manX}_6\text{-P-P-prenol}$ a partir de $(^{14}\text{C})\text{man-celobiosa-P-P-prenol}$: Se obtuvo el $(^{14}\text{C})\text{man-celobiosa-P-P-prenol}$ en las condiciones de la Fig.19, 19.700 cpm se cromatografiaron en solvente D, a). Una alícuota igual se resuspendió en presencia de 1.5% de Tritón X-100 en una mezcla de incubación estándar con 210 ug de proteína y se incubó 30 minutos a 30°C en presencia de 2.500 pmoles de UDPglucónico y 20 nmoles de UDPglu. Se procesó primeramente según método A, los precipitados se extrajeron luego con solvente 1,2,0.3 y se reunió el agua del lavado del butanol con el extracto 1,2,0.3; se cromatografiaron en solvente D.

4.5. Incorporación de ramnosa

4.5.1. Generalidades

En la sección 2. se mencionó la aislación de dos polisacáridos aniónicos β y γ . El primero, por hidrólisis ácida liberó ácidos urónicos, manosa y glucosa, y el segundo produjo además ramnosa.

La composición de azúcares del oligosacárido X_6 hizo pensar en la posibilidad de que el X_6 -P-P-prenol fuese intermediario en la síntesis del polisacárido β . Como no se pudo probar esta función pareció interesante explorar la incorporación de ramnosa utilizando TDP(^{14}C)ram como sustrato radioactivo, Tabla 9.

Los resultados de la Tabla 9 muestran que hubo incorporación de (^{14}C)ramnosa en material liposoluble y que esta aumentó en presencia de GDPman, UDPglúcnico y UDPglu. La secuencia de activación indicó además que la ramnosa se incorporó una vez formado el X_6 -P-P-prenol.

La gran activación aún en ausencia de GDPman (Tabla 9) es perfectamente explicable ya que en la mayoría de las preparaciones enzimáticas hay alto nivel de manosil-celobiosa-P-P-prenol.

Tabla 9: Incorporación de (^{14}C)ramnosa a material liposoluble

UDPglu	GDPman	UDPglnico	(^{14}C)ram en material liposoluble cpm
-	-		1.017
	+		1.097
			1.456
			2.000
			3.322
	-	+	6.947
+	+	+	7.977

Se realizaron incubaciones estándar con 280 ug de proteína, TDP (^{14}C)ram (200.000 cpm) (261 uCi/umol) y 2.500 pmoles de los nucleótidos no radioactivos donde se indica, durante 30 minutos a 30°C. Se procesaron según el método B y se contó la radioactividad incorporada en el extracto liposoluble.

4.5.1.1. Análisis del compuesto obtenido.- El compuesto liposoluble obtenido a partir de TDP(^{14}C)ram, en presencia o en ausencia de otros nucleótidos, fué sometido a hidrólisis ácida suave (pH=2, 10 minutos, 100°C) y el producto hidrosoluble de dicho tratamiento se electroforetizó en buffer I (Fig.71).

El perfil muestra dos picos radioactivos, el más pequeño que migró en la zona de los azúcares neutros se caracterizó como ramnosa por cromatografía en solventes H y F (datos no mostrados). El pico de mayor radioactividad migró en este sistema con un $R_{\text{UMP}}=0.5$, idéntico al del oligosacárido X_6 y en adelante lo denominaremos X_7 .

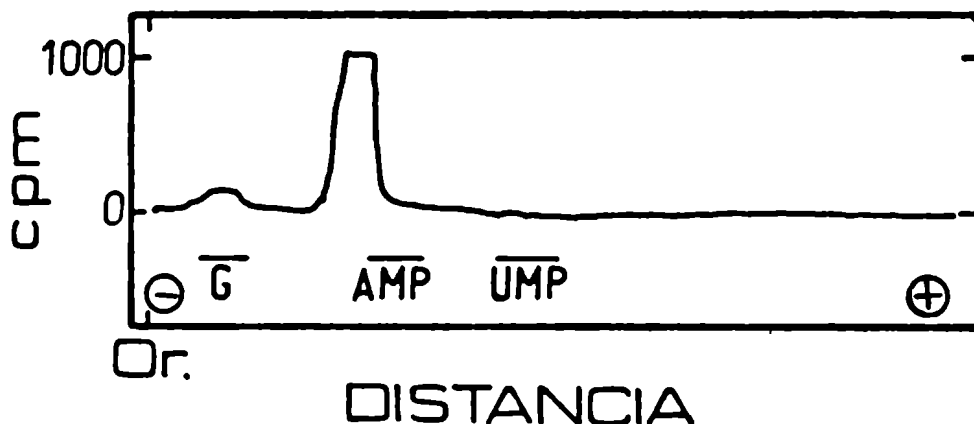


Figura 71: Hidrólisis ácida del material liposoluble (^{14}C)ram: Material liposoluble obtenido en las condiciones de la Tabla 9 (renglón 7), se sometió a hidrólisis ácida suave y el producto de ruptura (hidrosoluble) se electroforatizó en buffer I. Con material obtenido en ausencia de nucleótidos no radiactivos, Tabla 9 (renglón 1), se obtuvieron los mismos resultados (datos no mostrados).

4.5.2. Estructura de (^{14}C)ramX₇

4.5.2.1. Hidrólisis ácida parcial de (^{14}C)ramX₇.- El oligosacárido (^{14}C)ramX₇ se sometió a una hidrólisis ácida con HCl 0.1N, 30 minutos, 100°C y los productos de ruptura se cromatografiaron en vente II (Fig.72).

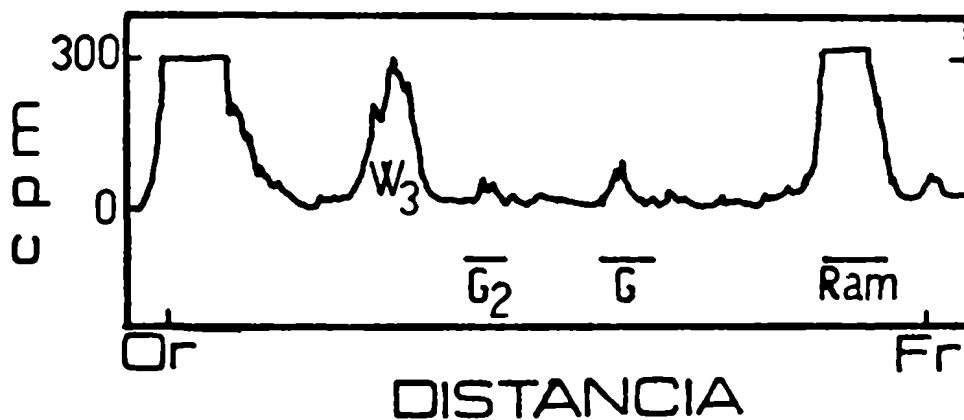


Figura 72: Hidrólisis ácida parcial de (^{14}C)ramX7: Se preparó (^{14}C)ramX7 en las condiciones de la Tabla 9 (renglón 7). Se tomaron 10.000 cpm de dicho material, se hidrolizaron en medio ácido (HCl 0.1N, 30 minutos, 100°C) y los productos hidrosolubles resultantes del tratamiento se cromatografiaron en solvente H.

El perfil de radioactividad muestra tres compuestos. Uno de ellos migró como (^{14}C)ram, otro que denominamos W_3 , con un $F_{\text{glu}} = 0.4$ y el tercero en el origen, corresponde a material no hidrolizado. Las uniones glicosídicas donde esté involucrado el extremo reductor de la ramnosa son muy lábiles en medio ácido (146) y esto explicaría que en las condiciones de hidrólisis suave que se utilizaron se haya obtenido tanta (^{14}C)ram libre.

El compuesto W_3 migró con una movilidad que podría corresponder a la de un trisacárido. Este podría ser explicado pensando que la ramnosa estuviera unida a una de las dos glucosas del extremo no reductor de X_6 dado que la unión glucosil-glucurónico es también muy ácido lábil (sección 4.4.3.2.). Si el razonamiento fuera correcto W_3 debería ser ramnosil-gencibiosa.

Para confirmar o descartar la hipótesis propuesta se incubó con UDP(^{14}C)glu, UDPgluco y GDPman con y sin TDPram.

El perfil radiocromatográfico de los oligosacáridos marcados con (^{14}C)glu obtenidos en ausencia, (Fig.73 a)), o en presencia, (Fig.73 b) de TDPram, fue muy similar. En ambos casos se obtuvo un compuesto principal con $F_{\text{UMP}} = 0.5$ y material que migró en la zona de los azúcares neutros ((^{14}C)glu y (^{14}C)celobiosa).

Los compuestos de $F_{\text{UMP}} = 0.5$, es decir, (^{14}C)gluX₆ y, presumiblemente, (^{14}C)gluX₇ fueron eluidos e hidrolizados. Analizados los

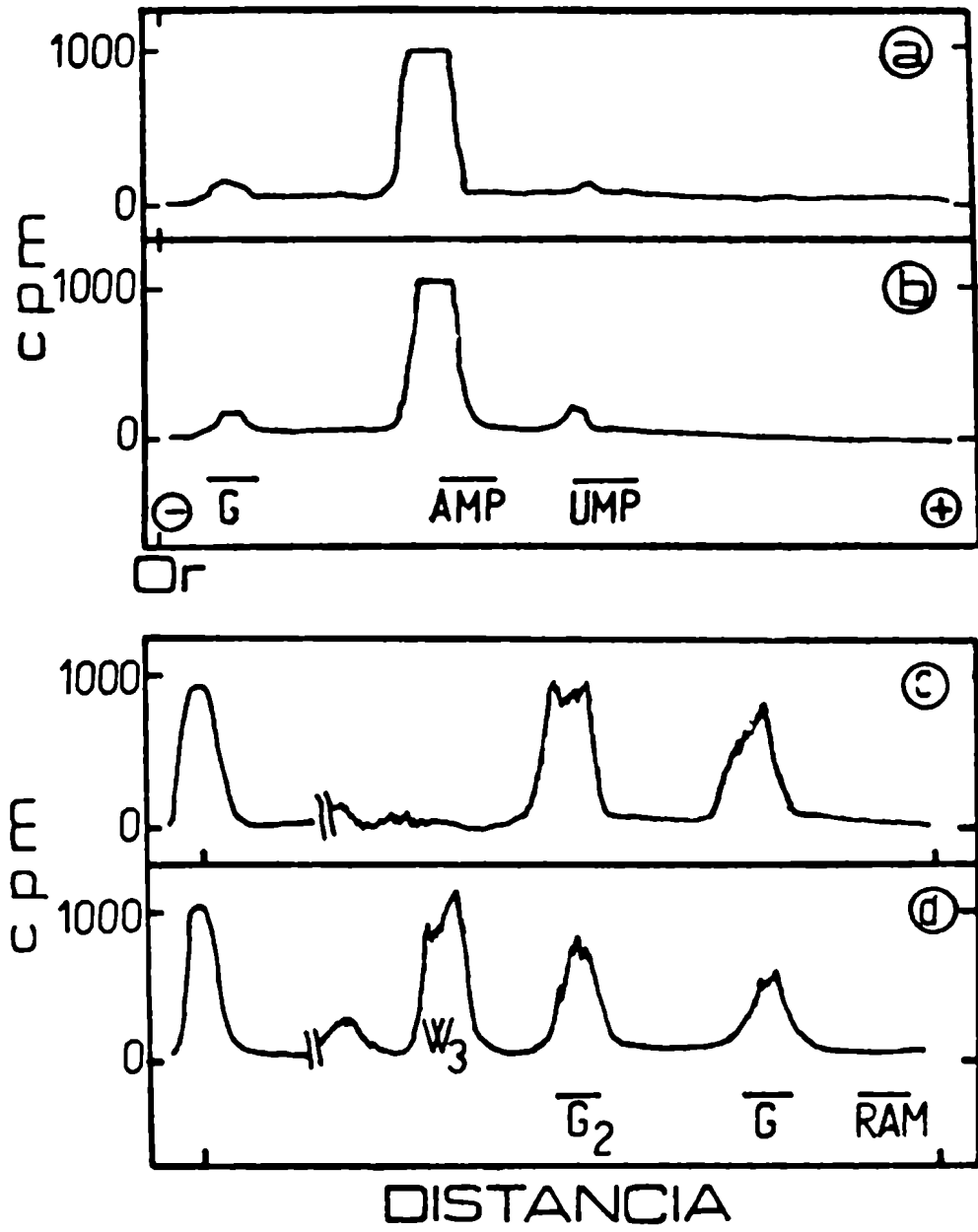


Figura 73: Hidrólisis ácida parcial de (^{14}C)gluX₆ y (^{14}C)gluX₇: Se obtuvo lípido-(^{14}C)gluX₆ y lípido-(^{14}C)gluX₇ mediante incubaciones estándar, 180 ug de enzima, 2.500 pmoles de UDP(^{14}C)glu' (268 uCi/umol), 2.500 pmoles de GDPman, 2.500 pmoles de UDPglucico, y en el caso de X₇ 2.500 pmoles de TDPram. Se procesaron según método B, y el extracto liposoluble se sometió a hidrólisis ácida suave para obtener los oligosacáridos correspondientes.

a) Electroforesis en buffer I de (^{14}C)gluX₆.

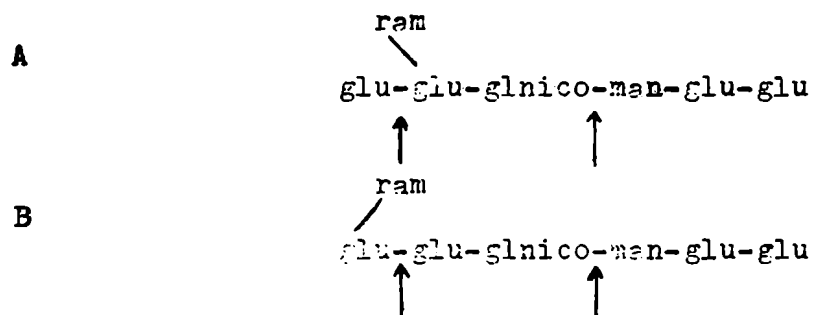
b) Electroforesis en buffer I del presunto (^{14}C)gluX₇.

Los oligosacáridos X₆ x X₇ eluidos de las electroforesis correspondientes a) y b) fueron hidrolizados con HCl 0.1N, 30 minutos, 100°C y los productos de dicho tratamiento cromatografiados en solvente H (c) y d) respectivamente).

productos por cromatografía en solvente H, (^{14}C)gluX₆ produjo X₆ sin degradar, (^{14}C)glu y (^{14}C)gencibiosa. Esto último implicó que al menos parte de la unión glucosil-glucurónico se había roto. El presunto (^{14}C)gluX₇ produjo un perfil idéntico, pero se pudo observar además un compuesto con la movilidad de W₃; concomitantemente se observó una disminución en la (^{14}C)gencibiosa. Se consideró a este resultado como otra evidencia en favor de que W₃ es ramosil-gencibiosa y X₇, ramosil-hexasacárido.

4.5.2.2. Estudio sobre la unión ramosil-gencibiosa. → La labilidad de la unión de la ramosa al oligosacárido X₆ ante la hidrólisis ácida, hacía difícil determinar, por un estudio de este tipo, a cuál de las glucosas de la gencibiosa estaba unida la ramosa. Se sometió entonces al oligosacárido (^{14}C)ramX₇ a una acetólisis en las condiciones empleadas en experimentos anteriormente mencionados (sección 3.5.6.) pero la ramosa se liberó totalmente (datos no mostrados). Por este motivo se probaron condiciones de acetólisis más suaves para aislar un oligosacárido con ramosa que pudiera proveer información.

El oligosacárido X_7 tenía dos estructuras posibles: A y B.



En ambos casos las flechas señalan las uniones 1,6. Estas uniones son muy lábiles ante tratamientos de acetólisis y la unión de la ramnosa al oligosacárido era de una labilidad comparable.

Se buscaron entonces condiciones donde las uniones 1,6 fueran parcialmente atacadas, para intentar aislar el trisacárido ram+glu-glnico en el caso de que la estructura correcta fuera la A, o el disacárido ramosil-glucosa, en el caso de que fuera la B.

Se usó como modelo el disacárido genciobiosa, y se vió que haciendo el tratamiento a 37°C , durante 15 minutos, se degradaba parcialmente.

Sometidos a dicho tratamiento los oligosacáridos (^{14}C)ram X_7 , (^{14}C)glu X_7 y (^{14}C)glu X_6 y analizados los compuestos neutros obtenidos por cromatografía en solvente H se observó:

- 1) Un compuesto que migró con $R_{\text{glu}}=0.80$ con marca en ramnosa Fig. 74 a) y con marca en glucosa, Fig. 74 b).
- 2) Ausencia de dicho compuesto en el perfil de los productos de hidrólisis de (^{14}C)glu X_6 , Fig. 74 c).

Estas características hicieron pensar que se estaba ante ramosil-glucosa.

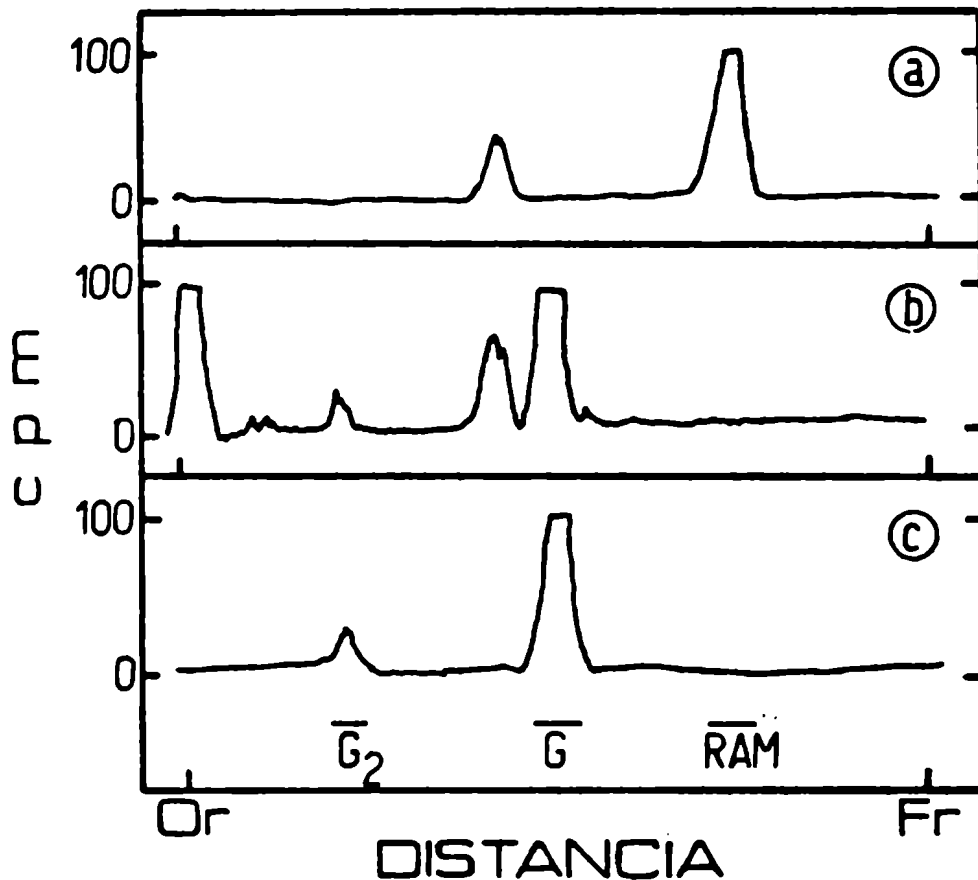


Figura 74: Acetólisis parcial de $(^{14}\text{C})\text{ramX}_7$, $(^{14}\text{C})\text{gluX}_7$ y $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$: El $(^{14}\text{C})\text{ramX}_7$ se obtuvo en las condiciones de la Tabla 9 (número 7). $(^{14}\text{C})\text{gluX}_7$ y $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$ fueron obtenidos en las condiciones de la Fig. 73. Sobre alícuotas de cada compuesto se realizó una acetólisis utilizando las condiciones descritas en la sección 3.3.6. pero durante 15 minutos a 37°C . Se desacetiló el material y en cada caso se aislaron los compuestos neutros por electroforesis en buffer I. Los productos neutros de $(^{14}\text{C})\text{ramX}_7$: a), $(^{14}\text{C})\text{gluX}_7$: b) y $(^{14}\text{C})\text{gluX}_6$: c); se cromatografiaron en solvente H durante 48 horas.

Analizados los compuestos aniónicos, producidos por acetólisis de $(^{14}\text{C})\text{ramX}_7$ y $(^{14}\text{C})\text{gluX}_7$, no se aisló ningún oligosacárido con las propiedades esperadas para ramosil-glicosil-glucurónico (da-

tos no mostrados).

Estos resultados sugerirían que la ramnosa se une a la glucosa no reductora del disacárido gencibiosa en la configuración lineal B.

4.5.2.3. Obtención de $(^{14}\text{C})\text{ram-glu-glu-glnico-man-glu-glu-}(^{32}\text{P})\text{-P-prenol}$. - Se intentó obtener $X_7\text{-P-P-prenol}$ marcado simultáneamente en $(^{14}\text{C})\text{ram}$ y en (^{32}P) , para ello se incubó con $\text{UD}^{32}\text{Pglu}$, $\text{TDP}(^{14}\text{C})\text{ram}$, GDPman y UDPglnico , Fig.75. Como control se sintetizó $(^{14}\text{C})\text{ramX}_7\text{-P-P-prenol}$.

Los resultados obtenidos cumplen totalmente con las expectativas con que fue realizado el experimento, a saber:

- 1) El $(^{14}\text{C})\text{ramX}_7\text{-P-P-prenol}$ obtenido, cromatografiado en solvente alcalino, Fig.75 a), dio un sólo pico radioactivo de $R_f=0.2$ que correspondería a $(^{14}\text{C})\text{ramX}_7\text{1,2-P-cíclico}$ (posee el mismo R_f que el conocido para $X_6\text{1,2-P-cíclico}$).
- 2) Al incubarse en presencia de $\text{UD}(^{32}\text{P})\text{glu}$, $\text{TDP}(^{14}\text{C})\text{ram}$ y los demás nucleótido-azúcares no radioactivos, se obtuvo en la zona de $R_f=0.2$ radioactividad de (^{14}C) y de (^{32}P) , Fig.75 b) (además se obtuvo un pico en la zona de glucosa-1,2-P-cíclico).
- 3) Los probables oligosacáridos-1,2-P-cíclicos eluidos de a) y b), y electroforetizados en buffer I, migraron con $R_{\text{UMP}}=0.9$ que era el esperable para dichos compuestos, Fig.75 c) y d), respectivamente.
- 4) Sometidos los oligosacáridos cíclicos a hidrólisis ácida suave, seguida de tratamiento con fosfatasa alcalina (sección 3.4.1.) y analizados los productos por electroforesis en buffer I, se

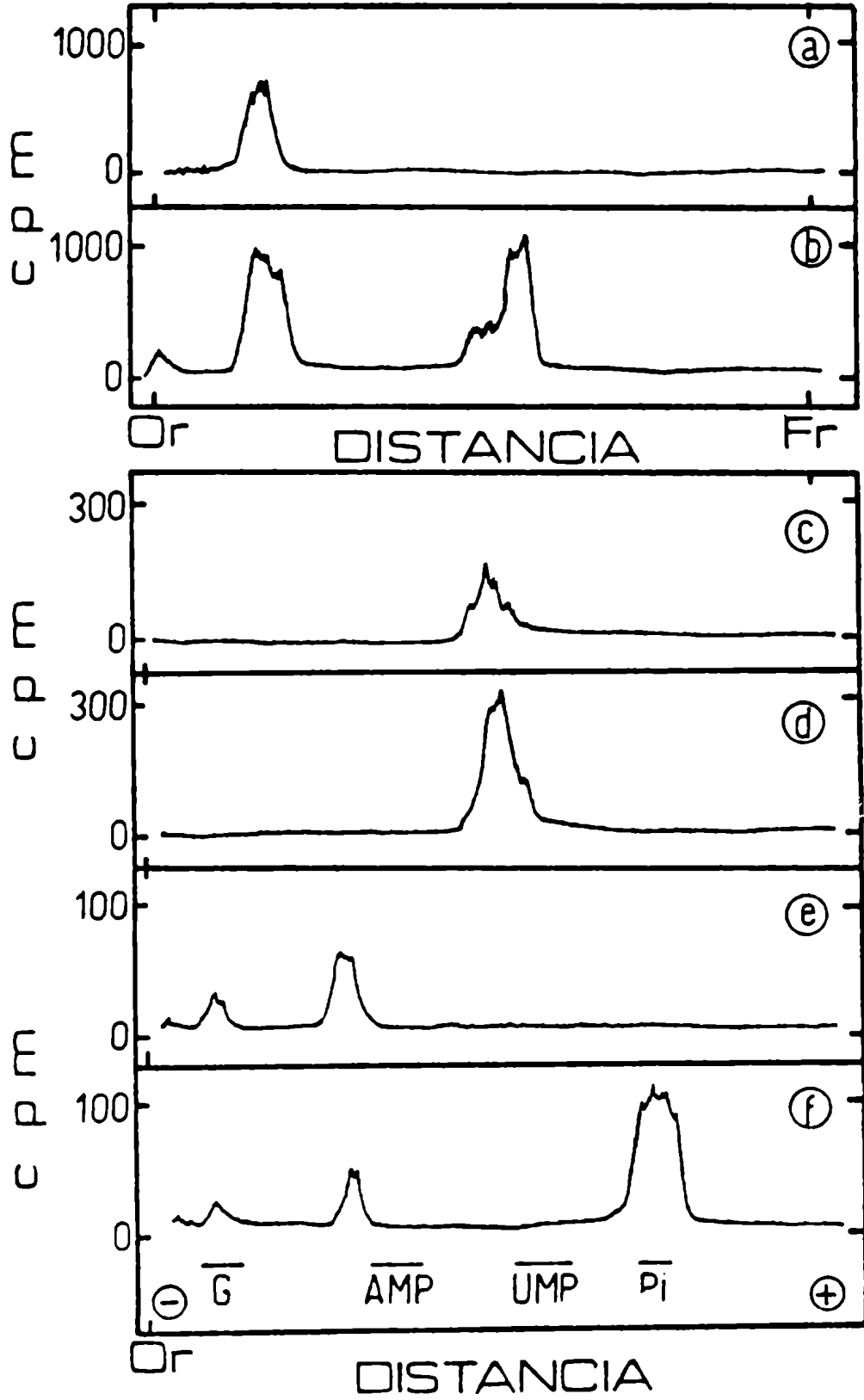


Figura 75: Obtención de (^{14}C)ram-glu-glu-glnico-man-glu-glu-(^{32}P)-P-prenol: Se incubó con 4.500 pmoles de UDPglu, 2.500 pmoles de GDPman, 2.500 pmoles de UDPglnico y 766 pmoles de TDP(^{14}C)ram (261 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), 180 μg de proteína durante 1 hora a 30°C , para obtener (^{14}C)ramX₇-P-P-prenol, a).

En b), para obtener (^{14}C)ramX₇-(^{32}P)-P-prenol se incubó de manera análoga a la anterior pero con el agregado de 738 pmoles de UD(^{32}P)-glu (23 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$).

Se procesaron las incubaciones según método B y los extractos B se cromatografiaron en solvente D, a) y b) respectivamente.

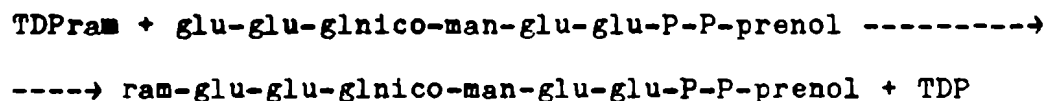
c) El compuesto de $R_f=0.2$ eluido de a) se electroforetizó en buffer I.

d) El compuesto de $R_f=0.2$ eluido de b) se electroforetizó en buffer I.

Los presuntos (^{14}C)ramX₇-P-cíclico de c) y (^{14}C)ramX₇-(^{32}P)-cíclico de d) se eluyeron, se sometieron a hidrólisis ácida suave (CH_3COOH , 0.1M, 10 minutos, 100°C), se trataron luego con fosfatasa alcalina y se electroforetizaron en buffer I, e) y f) respectivamente.

obtuvo en el caso del compuesto con radioactividad en (^{14}C)ram un solo pico con $R_{\text{UMP}}=0.5$ (Fig.75 e)), en la zona del oligosacárido X₇. Con el producto doblemente marcado se obtuvo un compuesto en la misma zona y otro correspondiente a (^{32}P), (Fig.75 f)).

Estos resultados confirmaron los hasta aquí descritos y permiten concluir que la incorporación de ramnosa a material liposoluble se hace según la reacción:



4.6. Incorporación de ácido glucurónico, 2ª parte

4.6.1. Obtención de lípido-glucurónico

Hemos comentado en la sección 4.3.1., que al incubar el preparado de *Acetobacter xylinum* con UDP(¹⁴C)glucónico se obtenían dos productos radioactivos, uno de los cuales fue caracterizado como glucómano-6-fosfato-1,6-bis-fosfato. Procesando las incubaciones por el método A, ambos compuestos se extraían con butanol, pero mientras que el arriba nombrado pasaba a los lavados acuosos del mismo, el otro de los compuestos que se denominó "lípido-glucurónico" permanecía soluble en la fase orgánica. Esta propiedad diferencial permitió obtenerlo como único compuesto en la fase butanólica, lo que facilitó en parte los estudios.

A diferencia de los glucuronidos descritos (147) (148) este compuesto es rápidamente hidrolizado a pH=2, liberando ácido glucurónico. Como esta es una característica de los lípidos intermedios, se lo estudió con cierto detalle. Esta tarea se realizó en colaboración con Rodolfo C. García.

En la Fig.76 se observa que la síntesis de lípido-glucurónico depende de la presencia de Mg^{+2} en el medio de incubación.

En ausencia del catión no hay formación del compuesto, mientras que con una concentración del mismo de 8mM, hasta por lo menos 14mM, la síntesis se hace máxima.

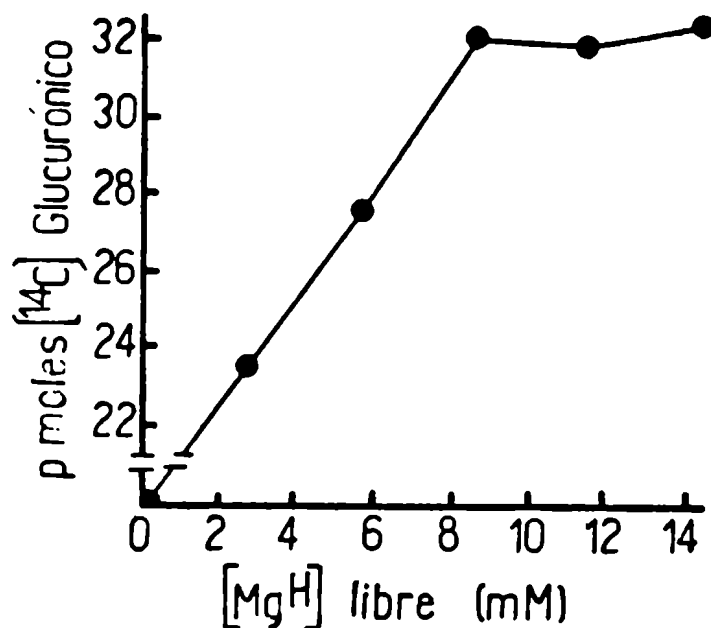


Figura 76: Curva de concentración de Mg^{+2} : Se realizaron incubaciones estandar 30 minutos a $30^{\circ}C$ con 730 pmoles de $UDP(^{14}C)glucico$ (207 uCi/umol), 280 ug de proteína y la concentración de Mg^{+2} indicada en cada caso. Se procesaron las mismas según método A y se graficó $(^{14}C)glucico$ incorporado en la fase butanólica en función de la concentración de Mg^{+2} en la incubación.

Se investigó la posibilidad del reemplazo de Mg^{+2} por otro catión divalente, el Mn^{+2} pero resultó menos eficiente (Tabla 10).

Tabla 10: Síntesis de lípido-glucurónico en presencia de Mg^{+2} y de Mn^{+2}

Catión utilizado	Lípido- $(^{14}C)glucico$ sintetizado cpm	pmoles/ug de proteína
-----	43	----
Cl_2Mg	2.171	13,8
Cl_2Mn	294	1,9

Se realizaron incubaciones estandar 30 minutos a 30°C, con 420 pmoles de UDP(¹⁴C)glucico (207 uCi/umol), 280 ug de proteina y 8mM de Mg⁺² o Mn⁺² según se indica. Se procesó según método A y se midió radioactividad incorporada en fase butanólica.

Se estudió también la dependencia de la formación del compuesto con el tiempo de incubación, Fig.77, y se encontró que hasta 120 minutos era aproximadamente lineal.

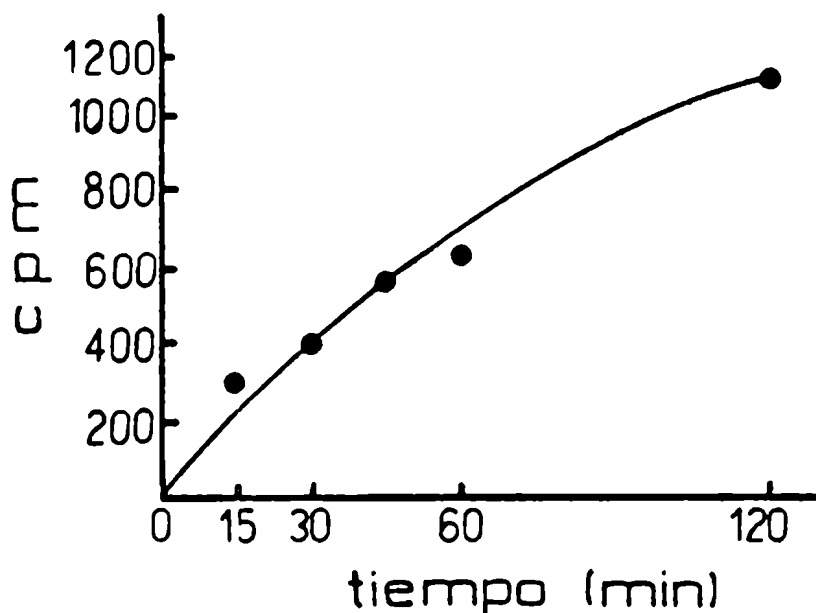


Figura 77: Curva de tiempo de incubación: Se realizaron incubaciones estandar a 30°C y a distintos tiempos, utilizando 320 ug de proteina, 765 pmoles de UDP(¹⁴C)glucico (207 uCi/umol) y se procesaron las mismas por el método A. Se midió radioactividad en la fase butanólica.

En la fig.78 se observa una curva de incorporación de radioactividad en función de la cantidad de sustrato utilizada.

Se llegó a un máximo de incorporación que correspondería a

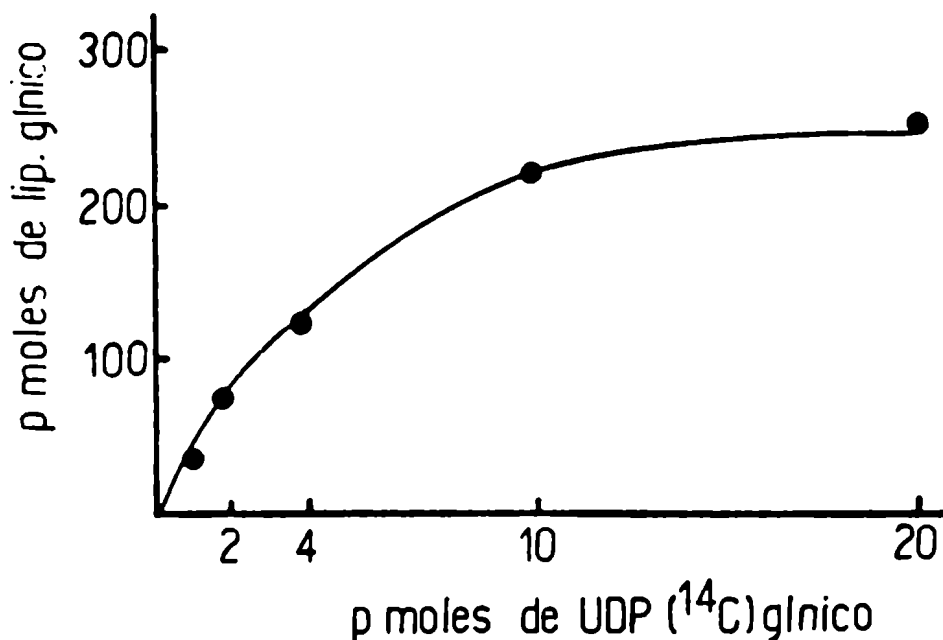


Figura 78: Curva de concentración de sustrato: Se realizaron incubaciones estándar 2 horas a 30°C con 320 ug de proteína, 765 pmoles de UDP(¹⁴C)glnico (207 uCi/umol), y la cantidad de UDPglnico no radioactivo para alcanzar las cantidades que se indican en cada caso. Se procesaron las mismas según método A y se graficó radioactividad incorporada a la fase butanólica en función de los pmoles totales de UDPglnico en la incubación.

unos 200-250 pmoles del compuesto con aproximadamente 10⁴ pmoles de sustrato.

4.6.1.1. Efecto de UDP y UMP en la síntesis de lípido-glucurónico.

Con el objeto de tener idea de si el UDPglnico cedía únicamente su azúcar o el azúcar-P, se investigó la posible inhibición de la formación del compuesto en estudio que producían el UMP y el UDP, (Fig.79).

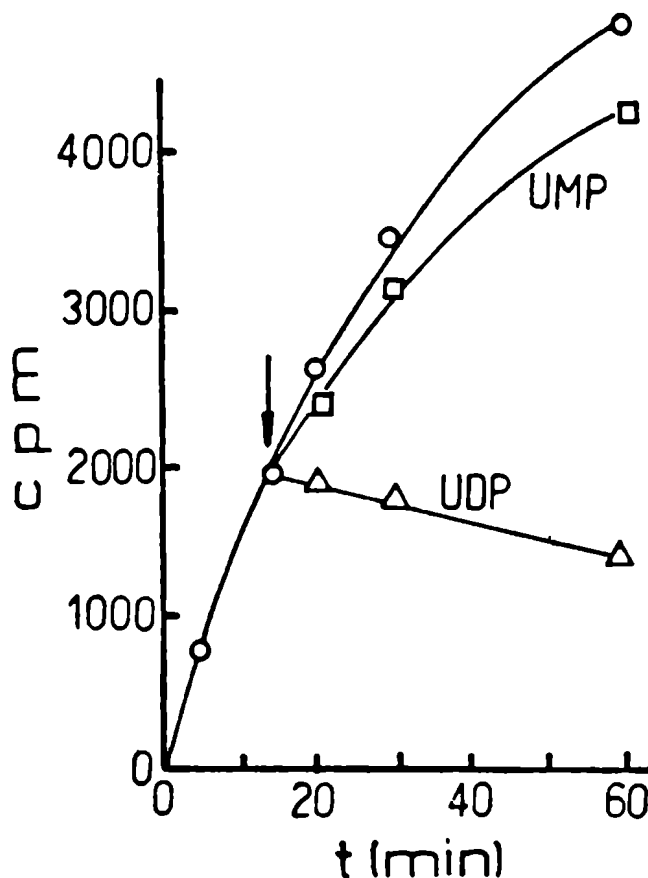


Figura 79: Efecto de UDP y de UMP en la síntesis de lipido-glucurónico: Se incubó 60 minutos a 30°C la mezcla estándar, incrementada 17 veces, con 5.440 ug de proteína, 11.000 pmoles de UDP(¹⁴C) glnico (207 uCi/umol). A los 5 y 15 minutos se sacaron alicuotas de 50 ul para medir el producto formado. A los 15 minutos se dividió la incubación en tres partes iguales agregando a una de ellas UMP (300 pmoles) y a otra UDP (300 pmoles). De cada una de las tres fracciones se sacaron alicuotas de 50 ul en los tiempos indicados.

Se procesaron todas las alicuotas por el método A y se graficó radioactividad incorporada al butanol en función del tiempo de incubación.

El agregado de UMP inhibió ligeramente la formación del com-

puesto mientras que la presencia de UDP no sólo la inhibió totalmente sino que aparentemente la revirtió en parte. Estos resultados indicarían que en la síntesis de lípido-glucurónico el nucleótido dador cedió únicamente su porción de azúcar a algún aceptor endógeno.

Experimentos realizados con UD(^{32}P)glucurónico confirmaron este punto de vista pues en las condiciones en que se transfería (^{14}C)glucurónico no fue posible transferir (^{32}P) al compuesto en estudio.

4.6.2. Propiedades del lípido-glucurónico

4.6.2.1. Cromatografía y electroforesis en papel.- El lípido-glucurónico fue analizado por cromatografía y electroforesis en papel en distintos solventes, Fig.80. La movilidad del mismo en solvente H (Fig.80 a)) confirma su naturaleza lipídica y descarta la posibilidad de artificios arrastrados a la fase orgánica durante la extracción.

La movilidad en solvente C, con $R_f=0.7$ (Fig.80 b)), así como el hecho de permanecer en el lugar de siembra en electroforesis en buffer I (Fig.80 c)) son propiedades que hacen recordar a los lípidos-azúcares hasta aquí descriptos.

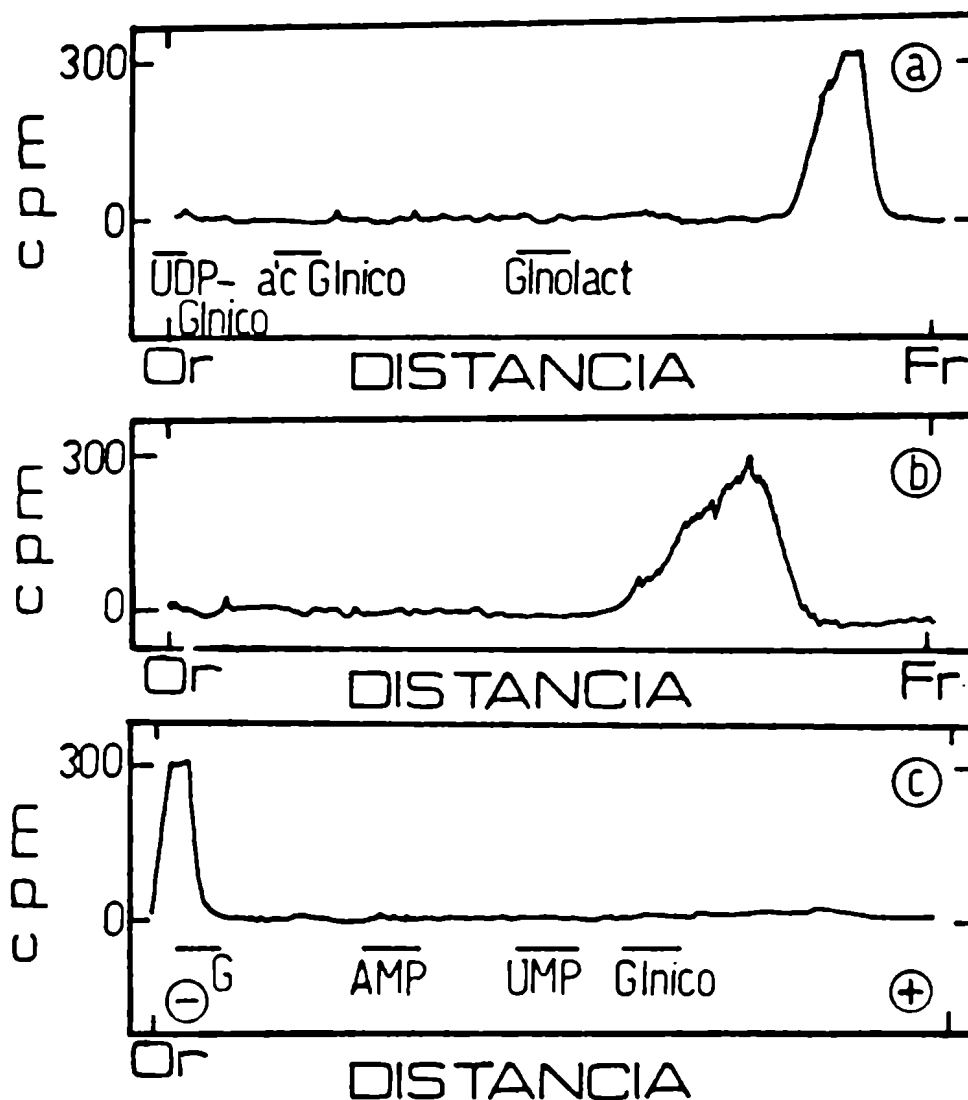


Figura 80: Cromatografía y electroforesis en papel de lípido-glucurónico: El compuesto se obtuvo en las condiciones de la Fig.76, se tomaron tres alícuotas de 3.000 cpm c/u y se sometieron respectivamente a:

- a) Cromatografía en solvente H.
- b) Cromatografía en solvente C.
- c) Electroforesis en buffer I.

Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa (Fig.81) el com-

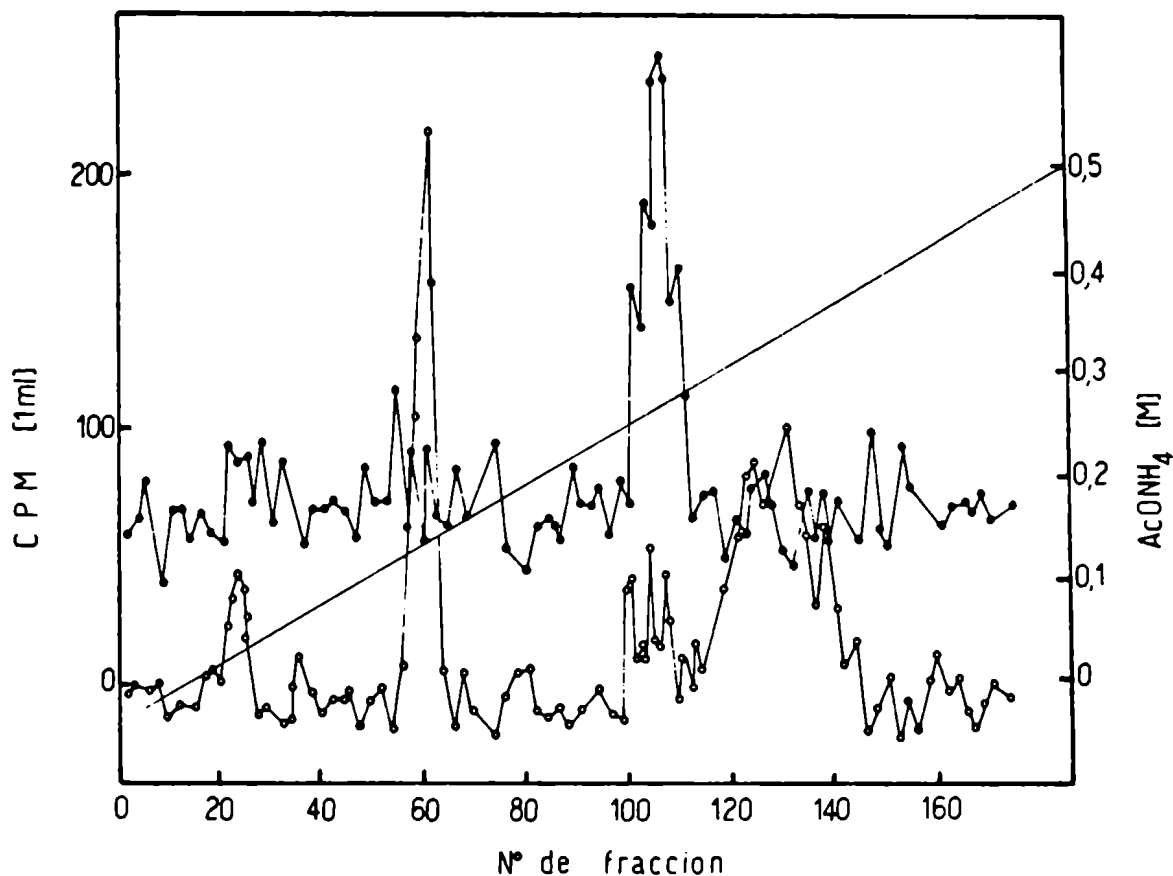


Figura 81: Cromatografía de lípido-(^{14}C)glucónico en DEAE-celulosa: El lípido-(^{14}C)glucónico se obtuvo en las condiciones de la Fig.76, 6.000 cpm del mismo se cromatografiaron en columna de DEAE-celulosa de 1.2 x 60 cm (sección 3.5.1.1.).

puesto eluyó con una concentración de ACONH_4 de 0.25M, que comparado con el perfil de elución de los lípido-fosfo-azúcares de glucosa (97) correspondería aproximadamente a la concentración salina con que eluye el glucosa-P-P-prenol. Haciendo una aproximación grosera, si tenemos en cuenta que este compuesto posee dos fosfatos, parecería que el lípido-glucurónico aparte de la carga que le provee el ácido glucurónico debería poseer en su estructura algún otro elemento aniónico, probablemente un fosfato.

4.6.2.2. Tratamientos degradativos.- Se investigó también el comportamiento del lípido-glucurónico sometido a varios tratamientos degradativos, a saber:

a) Hidrólisis ácida suave: Por hidrólisis ácida (HCl 0.01N, 10 minutos, 100°C) se descompuso (con una vida media de 6 minutos) liberando ácido glucurónico, a juzgar por cromatografía en solvente H y electroforesis en buffer I y J (datos no mostrados). Este último sistema distingue ácido glucurónico de ácido galacturónico.

b) Tratamiento con fenol: Sometido a este tratamiento degradativo, en condiciones de que los lípido-azúcares poseen una vida media de 1 hora, liberándose el azúcar-P correspondiente, el compuesto se mantuvo inalterado durante 2 horas. Sometido a condiciones de hidrólisis más energéticas (fenol 50%, 100°C, 2 horas 30 minutos) hubo una ruptura de un 23% y el producto liberado se caracterizó como ácido glucurónico por electroforesis en buffer I (no mostrado).

c) Hidrólisis alcalina: Ante una hidrólisis alcalina suave (sección 3.3.8.) capaz de saponificar fosfolípidos, el lípido-glucurónico liberó el 100% de ácido glucurónico, que se caracterizó por cromatografía en solvente H y electroforesis en buffer I (no mostrado).

d) Tratamiento con β -glucuronidasa: El lípido glucurónico resuspendido en agua en presencia de detergente se sometió a la acción de β -glucuronidasa. El tratamiento enzimático no alteró la movilidad del compuesto (Fig.82 a) y b)) en condiciones en que ataca al p-nitro-fenil-(^{14}C)glucurónido (Fig.82 c)) liberando (^{14}C)glucurónico (Fig.82 d)).

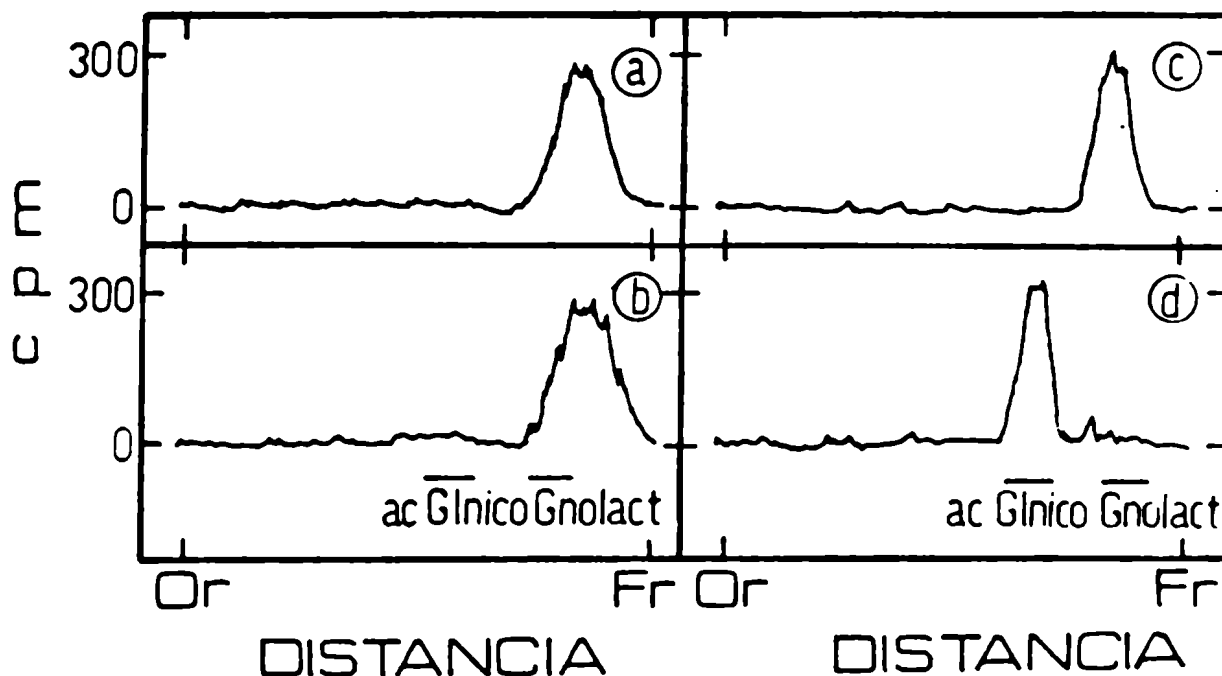


Figura 82: Acción de la β -glucuronidasa sobre el lípido-glucurónico y sobre p-nitro-fenil-glucurónico: El compuesto se obtuvo en las condiciones de la Fig.76, 8.000 cpm fueron resuspendidas en buffer AcONa pH=4.5 (20 umoles) en presencia de 0.42% final de Fritón X-100 en un volumen total de 200 ul.

Se dividió el material en dos partes iguales, una de las mismas se cromatografió tal cual en solvente C, a). La otra se incubó 15 minutos a 37°C en presencia de 17.4 unidades de β -glucuronidasa y se cromatografió en el mismo solvente, b).

5.600 cpm de p-nitro-fenil-(14 C)glucurónico (sección 3.7.1.) se sometieron al mismo tratamiento, la mitad se cromatografió tal cual en solvente C, c), y el resto luego del tratamiento con la enzima se cromatografió en el mismo solvente, d).

Las propiedades que posee el lípido-glucurónico lo muestran como un compuesto distinto a todos los que se describen en la literatura. Son muy comunes, sobre todo en eucariotes los llamados glucurónidos (147 - 148), donde el ácido glucurónico se une a la aglicó

na mediante una unión glicosídica o donde forma una unión éster con la misma. Ambos tipos de compuestos son resistentes a la hidrólisis ácida suave en las condiciones en que el lípido-glucurónico se rompe totalmente. Esta labilidad al ácido nos hizo pensar que podía estar involucrado un fosfato en la unión entre el ácido glucurónico y la aglicona, hipótesis que también se reforzaba por el perfil de elución en la columna de DEAE-celulosa.

Todos los esfuerzos realizados por identificar un fosfato unido al glucurónico en los productos de ruptura del compuesto fueron infructuosos. Por otra parte el hecho de que la molécula se rompiera por un tratamiento alcalino suave liberando ácido glucurónico también resulta desconcertante.

La resistencia ante el tratamiento con fenol 50% es otra propiedad diferencial respecto de los prenil-P-azúcares de bacterias que poseen un prenil α insaturado y que son lábiles en esas condiciones, pero podría tratarse de un alcohol primario, como el dolicol, en cuyo caso son resistentes (149).

Teniendo en cuenta la posibilidad de que la carga del ácido glucurónico distorsionara las propiedades del compuesto se intentó metilar el carboxilo utilizando una técnica de metilación suave a partir de diazometano (150). Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios porque el compuesto se descomponía durante dicho tratamiento liberándose (^{14}C)metilglucurónico.

Se intentó también activar la formación de lípido-glucurónico suplementando las incubaciones con ficaprenol, P-ficaprenol, doli-

col, P-dolicol y p-nitro-fenol, pero en todos los casos los resultados obtenidos fueron negativos.

Todas las propiedades mencionadas hacen el estudio del compuesto interesante y en el futuro se intentará reunir una cantidad suficiente del mismo para analizarlo mediante espectrografía de masas y de esa manera tener más información acerca de la naturaleza de la aglicona.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every receipt and invoice should be properly filed and indexed for easy retrieval. This is particularly crucial for businesses that deal with a large volume of transactions, as it helps in identifying discrepancies and ensuring compliance with tax regulations.

Next, the document addresses the issue of inventory management. It suggests implementing a robust system to track stock levels, which can help in reducing waste and optimizing the supply chain. Regular audits are recommended to ensure that the recorded inventory matches the physical stock on hand.

The third section focuses on financial reporting. It outlines the key components of a financial statement, including the balance sheet, income statement, and cash flow statement. The document provides a detailed explanation of how each statement is prepared and how they interrelate to provide a comprehensive view of the company's financial health.

Finally, the document discusses the importance of staying up-to-date with changes in tax laws and regulations. It advises consulting with a professional accountant or tax advisor to ensure that the company is always in compliance and taking full advantage of available tax incentives and deductions.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En nuestro laboratorio, como ya señalamos, se habían descrito síntesis y propiedades de: galactosa-P-prenol, glucosa-P-P-prenol y celobiosa-P-P-prenol (97).

La síntesis del primero de los nombrados fue estudiada en detalle por Pedro Romero (151), quien confirmó, que la porción lipídica del mismo era un prenol del tipo alílico.

El glucosa-P-P-prenol, pareció relacionado a un glucano hidrosoluble que también es sintetizado en presencia de UDPglucosa, por el preparado enzimático de *Acetobacter xylinum* (97). Pero no se encontró función para el celobiosa-P-P-prenol.

Se describió también un trisacárido-P-P-prenol, que se formaba solamente con algunas preparaciones enzimáticas y en pequeña cantidad. Si bien en un primer momento se creyó estar ante la presencia de celotriosa-P-P-prenol, posible intermediario en la síntesis de la celulosa, los estudios estructurales realizados demostraron que no era así.

En este trabajo se ha estudiado entonces, la interdependencia de estos prenol-fosfo-azúcares entre sí, y con otros nuevos en él descritos, así como su posible función.

Lo primero que se trató de aclarar fue la formación de celobiossa-P-P-prenol, estos estudios se hicieron en colaboración con Luis Ielpi. Se aprovechó para ello el hecho ya conocido de que incubando el preparado enzimático de *Acetobacter xylinum* con UDP(¹⁴C)glucosa,

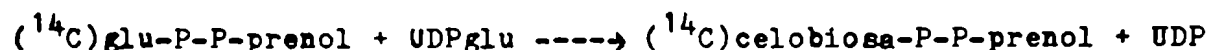
se obtenía una relación de compuestos liposolubles diferente según la temperatura utilizada. A 0°C se obtenía una proporción mucho mayor de (¹⁴C)glu-P-P-prenol, mientras que a 15 ó 30°C se sintetizaba una mezcla más rica en (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol.

Se pudo demostrar así, que incubando a 0°C para acumular (¹⁴C)glu-P-P-prenol y eliminando el exceso de nucleótidos por lavado, al reincubar a 15°C no se observaba formación de (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol a menos que se agregara UDPglu no radioactivo (Fig.15).

Por hidrólisis ácida suave se aisló la (¹⁴C)celobiosa, se redujo a (¹⁴C)celobitol y por hidrólisis total del mismo se obtuvo más del 80% de la radioactividad inicial en (¹⁴C)sorbitol. Esto último descarta la posibilidad de que dos moléculas de glu-P-P-prenol reaccionen entre sí para dar celobiosa-P-P-prenol.

Por último se obtuvo (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol agregando (¹⁴C)glu-P-P-prenol parcialmente purificado a mezclas de incubación que contenían detergente, e incubando a 15°C, en presencia y en ausencia de UDPglu no marcado. Nuevamente sólo se observó formación de (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol, en presencia del nucleótido frío (Fig.16)

La ecuación de síntesis de (¹⁴C)celobiosa-P-P-prenol sería pues la siguiente:



Otros lípido-azúcares en Acetobacter xylinum. Exopolisacáridos

Por trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se sabía que incubando con UDP(¹⁴C)glu, además de los productos ya des-

criptos, *Acetobacter xylinum* sintetizaba un compuesto liposoluble distinto a los hasta aquí mencionados. Por su labilidad a pH=2, labilidad al medio alcalino suave, y por el comportamiento del mismo y de sus productos de ruptura, en distintos solventes cromatográficos y en electroforesis en diversos buffers, se comportaba como un oligosacárido-P-P-prenol; oligosacárido que poseía él también, propiedades aniónicas.

Se podía obtener así mismo, un compuesto de características similares marcado con (^{14}C)glucónico utilizando como sustrato radioactivo UDP(^{14}C)glucónico.

Estos hallazgos incentivaron la búsqueda de polisacáridos que contuvieran ácido glucurónico en su estructura. Pedro Romero (151), utilizando un esquema clásico para la obtención de polisacáridos capsulares, aisló por lo menos dos que poseían dicho azúcar y que llamamos β y γ (Fig. 14, Tabla 3). El análisis de la composición cualitativa de los mismos indicó que ambos poseían además: glucosa, manosa y probablemente otros azúcares aniónicos, y mientras que el γ poseía ramosa no ocurría lo mismo con el β .

Incubaciones con GDPmanosa

El hecho de que ambos polisacáridos β y γ poseyeran manosa en su estructura, fue el motivo por el cual se investigó la formación de compuestos liposolubles que contuvieran dicho azúcar, utilizando GDP(^{14}C)man como precursor. Se observó que:

a) no se incorporaba (^{14}C)man a material hidrosoluble.

b) se incorporaba (^{14}C)man a material liposoluble (Tabla 4). Este material por cromatografía en papel así como en columna de DEAE-celulosa, produjo dos compuestos con propiedades distintas, que se caracterizaron como manosa-P-prenol y manosil-celobiosa-P-P-prenol.

Identificación de manosa-P-prenol

Un compuesto similar ya había sido descrito por otros autores (54), (87).

La identidad de manosa-P-prenol se estableció mediante los siguientes criterios:

- a) Labilidad al medio ácido suave (pH=2, 10 minutos, 100°C), liberando manosa, (cromatografía en solventes E y H, electroforesis en buffer K, sección 4.2.2.).
- b) Labilidad al tratamiento con fenol 50% (vida media: 1 hora) y caracterización del compuesto hidrosoluble como manosa-P (Fig.20 y 21)
- c) Comportamiento en cromatografía en DEAE-celulosa y cromatografía en papel en solventes H y C (secciones 4.2.1.1. y 4.2.1.2.).
- d) Activación de su formación suplementando la mezcla de incubación con P-ficaprenol en presencia de detergente (Tabla 5).

La configuración anómérica de la manosa se estudió sometiendo el manosa-P-prenol a una hidrólisis alcalina; se liberó manosa-2P que es el producto de ruptura característico del derivado B (141). La identidad de la manosa-2P se estableció por cromatografía en solvente M, por su insensibilidad a la hidrólisis ácida suave y su sensibilidad a la acción de la fosfatasa alcalina, liberando manosa

(Fig.22). La síntesis del manosa-P-prenol, se realizaría como en los casos ya descriptos, según la reacción:



La reversibilidad de la reacción no se estudió en detalle, pero sí se observó que en presencia de GDP se inhibe la síntesis de manosa-P-prenol (Tabla 6).

Caracterización de manosil-celobiosa-P-P-prenol

El otro compuesto marcado con (¹⁴C)manosa, por su perfil de elución en cromatografía en DEAE-celulosa (Fig.19), y su movilidad en cromatografía en papel en solventes H y C se comportó como un azúcar-P-P-prenol.

Se observaron además las siguientes propiedades:

- a) Labilidad en medio ácido suave (pH=2, 10 minutos, 100°C) con liberación de un producto hidrosoluble que se caracterizó como un trisacárido (Fig.24).
- b) Confirmación de la unión difosfato entre la porción lipídica y el oligosacárido mediante la caracterización del producto de ruptura alcalina como un éster-fosfato-cíclico (Fig.25).
- c) Labilidad al tratamiento fenólico, con una vida media de 3 minutos 30 segundos, característica de los prenil-pirofosfato-azúcares (cuando el prenil es alílico) y ulterior estudio del producto de ruptura, que se comportó como un oligosacárido-P-P (Fig.26 y 27).

El hecho de que sometiendo el compuesto a una hidrólisis alcalina

lina suave se obtuviera el éster-fosfórico-cíclico era un indicio de que el azúcar unido al fósforo no era una manosa (sección 4.2.3.4.).

Como el sistema sintetizaba glucosa-P-P-prenol y celobiosa-P-P-prenol, en presencia de UDPglu, se pensó en la posibilidad de que estos estuvieran presentes en forma endógena en los preparados enzimáticos y actuaran como aceptores de la o las manosas para dar el trisacárido-P-P-prenol. Esta hipótesis se confirmó al observar:

- a) Activación en presencia de UDPglu no radioactivo de la formación del compuesto marcado con (^{14}C)manosa (Fig.28).
- b) Marcación del compuesto también en (^{14}C)glucosa, proveniente de UDP(^{14}C)glu (Fig.29).
- c) Relación glucosa/manosa en el trisacárido de 2/1 (Fig.30).

Se pudo determinar además que la unión de la manosa a la celobiosa es β (Fig.31), que el trisacárido es lineal y que la manosa está unida al carbono 3 de la glucosa del extremo no reductor de la celobiosa (sección 4.2.3.8.).

La unión 1,3 de la manosa a la celobiosa se confirmó mediante una oxidación con IO_4Na sobre manosil- $\{^{14}\text{C}\}$ celobiosa-P-cíclico: el producto formado se caracterizó como (^{14}C)celobiosa (Fig.33). Este resultado solo es posible si la manosa está unida al carbono 3 de la glucosa del extremo no reductor protegiendo a la misma de la oxidación con el IO_4Na . La glucosa del extremo reductor estaba protegida por la unión glicosídica en su carbono 4 y por el éster fosfato cíclico que ocupaba los carbonos 1 y 2.

La estructura propuesta para el trisacárido es por lo tanto:



La formación del manosa-P-prenol a partir de GDPman planteó la siguiente alternativa, ¿el dador de la manosa era directamente el GDPman o actuaba a través de la formación de manosa-P-prenol?. Para aclarar este punto se realizaron incubaciones en dos etapas (Fig.34), para acumular manosa-P-prenol en la primera y ver si (después de eliminar el GDPman) en una segunda incubación, en presencia de UDPglu no radioactivo, era capaz de incorporar (^{14}C)manosa a celobiosa-P-P-prenol que se estaba formando. No se pudo demostrar esta reacción, como tampoco mediante el agregado de (^{14}C)manosa-P-prenol en forma exógena en presencia de detergente. Estos resultados permitieron concluir que el dador de la manosa es directamente el nucleótido, y no se conoce todavía el rol de manosa-P-prenol.

Como contrapartida, fue posible sintetizar manosil-(^{14}C)celobiosa-P-P-prenol ya fuera en dos etapas, sintetizando (^{14}C)celobiosa-P-P-prenol en la primera a partir de UDP(^{14}C)glu y reincubando con GDPman (Fig.35); o agregando en forma exógena (^{14}C)celobiosa-P-P-prenol a un preparado enzimático en presencia de detergente y GDPman, (Fig. 36).

Con estos resultados se aclaró la formación de trisacárido-P-P-lípido a partir de UDP(^{14}C)glu que sucedía en forma no controlable y solo con algunas preparaciones enzimáticas. Es probable que aquellas que sintetizaban dicho compuesto lo que tenían de especial era un la-

vado que no había eliminado totalmente el GDP_{man} endógeno, o un mayor nivel de manosa-P-prenol endógeno que en presencia de GDP forma ba GDP_{man} durante la incubación.

Incubaciones con UDPglucurónico

Ya se mencionó que en nuestro laboratorio se había descrito un compuesto liposoluble formado a partir de UDPglucurónico con características que hacían pensar en un oligosacárido-P-P-lípido. Se decomponía tanto en medio alcalino como ácido y en este último caso (Fig.38) el producto obtenido, si bien migraba como un anión en electroforesis en buffer I, no tenía la movilidad del ácido glucurónico, sino menor. Este detalle hizo concluir que el azúcar se cargaba sobre un preñol oligosacárido endógeno, es decir presente en la preparación enzimática. Se pensó entonces en la posibilidad de que dicho aceptor fuera el 8manosa(1,3)-celobiosa-P-P-prenol, arriba descrito. Esta hipótesis fue comprobada de la siguiente manera:

- a) Utilizando UDPglucurónico no marcado y GDP(¹⁴C)_{man} o UDP(¹⁴C)_{glu} se obtuvo un compuesto con las mismas propiedades pero con marca tanto en (¹⁴C)_{man} (Tabla 7), como en (¹⁴C)_{glu} (Fig.39). Para obtenerlos, sin embargo, fue necesario efectuar incubaciones en dos etapas (Tabla 7 y Fig.39 respectivamente), la segunda solamente en presencia de UDPglucurónico, pues utilizando UDPglu y UDPglucurónico simultáneamente (cualquiera fuera la marca), se obtenía otro producto, el hexasacárido-P-P-prenol, que se discute en el siguiente título.
- b) Se obtuvo el mismo compuesto (con marca en manosa) agregando

(^{14}C)manosil-celobiosa-P-P-prenol parcialmente purificado a una mezcla de incubación que contenía detergente y UDPglucurónico no radioactivo (Fig.45).

c) En cuanto a la caracterización del oligosacárido glucuronil-manosil-celobiosa no se pudo determinar su tamaño por cromatografía en columnas de Biogel P-2 o Sephadex G-15, en presencia de estándares, pues aparentemente la carga del ácido glucurónico interacciona con la matriz de los geles y distorciona los volúmenes de elución, (Fig. 40), que resultan menores de lo que correspondería. Un fenómeno idéntico se observó con ácido glucurónico libre (Fig.41).

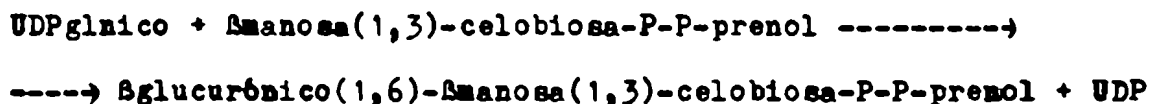
Por otra parte, por hidrólisis ácida parcial de glucuronil-manosil-celobiosa ya fuera con marca en (^{14}C)glucurónico o en (^{14}C)manosa en ningún caso se observó manosa o ácido glucurónico libre sugiriendo por su resistencia en medio ácido, una unión de este último a la manosa. Se formaron en cambio tres compuestos que se separaron por cromatografía en solvente H; uno de ellos se identificó como β glucuronil-manosa por su sensibilidad a la β -glucuronidasa liberando ácido glucurónico y manosa (datos no mostrados), los otros dos no se caracterizaron en detalle pero muy probablemente son glucuronil-manosil-glucosa y compuesto sin degradar (Fig.42 y 43).

Estos resultados permitieron establecer que entra una sola molécula de ácido glucurónico sobre el β manosil(1,3)-celobiosa y que la misma se une a la manosa.

Por oxidación con periodato del oligosacárido glucuronil-(^{14}C)manosil-celobiosa (Fig.44) se obtuvo un 11% de ácido (^{14}C)fórmico

(sobre un teórico de 16%). Este resultado sólo es compatible con una manosa que tiene sus carbonos 2, 3 y 4 libres, por lo tanto la unión es B(1,6).

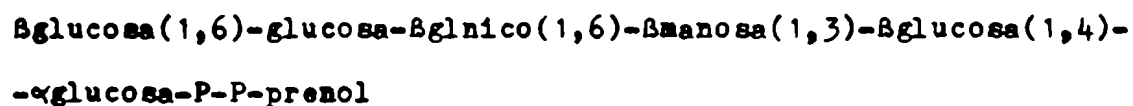
Se concluyó que la reacción ocurre de acuerdo a la siguiente ecuación:



Incorporación de glucosa, 2ª Serie

El compuesto más difícil de caracterizar fue el obtenido a partir de UDP(¹⁴C)glu y cuya formación se estimulaba por la presencia de UDPglucurónico. Utilizando este último nucleótido radioactivo y UDPglu frío fue como primero se lo detectó, pues debido a su gran polaridad es soluble en agua y pasó inadvertido en los primeros estudios de incorporación de glucosa a material liposoluble.

La dificultad para obtener glucuronil-manosil-celobiosa-P-P-prenol mencionada anteriormente, y a lo largo de la sección "Resultados" estribaba precisamente en que al incubar con los tres nucleótidos simultáneamente en vez de obtener el tetrasacárido-P-P-prenol buscado se aislaba este oligosacárido-P-P-prenol cuya porción de azúcares era aparentemente mayor. Efectivamente a este compuesto se le ha podido asignar la siguiente estructura:



Las razones para ello son:

- a) Se puede obtener el compuesto marcado tanto en glucosa como en manosa o ácido glucurónico.
- b) El oligosacárido-P-P-lípido marcado tanto con (^{14}C)glu (Fig.52) como con (^{14}C)glnico (Fig.53) por cromatografía en columna de DEAE-celulosa en CH_3OH 99% eluyó recién a una concentración de 1.25M de AcOH_4 . Esta concentración es alta si se considera que los prenil-fosfo-azúcares neutros (derivados de glucosa, celobiosa y manosil-celobiosa) se eluyen con AcOH_4 0.3M-0.4M, pero justificable no sólo por el tamaño sino por la presencia de una carga negativa provista por el carboxilo del ácido glucurónico.
- c) El producto de hidrólisis ácida suave es de característica anfótero: migra con un $R_{\text{UMP}}=0.5$ en electroforesis en buffer I, y por cromatografía en columna de DEAE-celulosa eluye con 0.1M de AcOH_4 (Fig.54 y 55).
- d) La unión entre la porción lipídica y el oligosacárido es un pirofosfato pues por tratamiento alcalino suave forma el éster fosfórico cíclico respectivo (Fig.56 y 57) e incorpora (^{32}P) si se lo prepara a partir de $\text{UD}(\text{}^{32}\text{P})\text{glu}$, GDPman y UDPglnico (Fig.69).
- e) La porción lipídica es un prenil del tipo alílico pues es sensible a la degradación con fenol, y a la hidrogenación catalítica, liberando el oligosacárido pirofosfato (Fig.58).
- f) Por filtración en Biogel P-2 el oligosacárido libre migra como si fuera de tamaño algo mayor (aproximadamente dos hexosas) que el tetrasacárido glucurónico-manosa-glucosa-glucosa (Fig.59).

- g) Incubando con UDP(³H)glu y UDP(¹⁴C)glnico en presencia de manosil-celobiosa-P-P-prenol previamente formado se obtuvo el compuesto con una relación de dos glucosas incorporadas por cada glucurónico agregado (Fig.60).
- h) Se pudo caracterizar el disacárido genciobiosa entre los productos de hidrólisis ácida parcial del oligosacárido marcado con (¹⁴C) glucosa (Fig.61 y 62).
- i) Se obtuvo el compuesto marcado con (¹⁴C) incubando UDPgln y UDP glnico no radioactivos en presencia de detergente y de (¹⁴C)manosil-celobiosa-P-P-prenol agregado en forma exógena (Fig.70).
- j) Por acetólisis parcial del oligosacárido marcado tanto con (¹⁴C) glucosa como con (¹⁴C)glnico se caracterizó el disacárido glucosil-glucurónico. No se aclaró el tipo de unión.

Incorporación de ramosa

Los dos polisacáridos aniónicos β y γ aislados en nuestro laboratorio contenían: ácido glucurónico, manosa y glucosa, pero uno de ellos, el γ poseía además ramosa. Por este motivo se investigó la incorporación de ese azúcar a material liposoluble. Para ello se utilizó TDP(¹⁴C)ram, el dador más utilizado en sistemas bacterianos, y se logró demostrar que el hexasacárido-P-P-prenol arriba descrito actuaba como aceptor, formándose el siguiente heptasacárido.

ramosa- β glucosa(1,6)-glucosa- β glnico(1,6)- β manosa(1,3)- β glucosa
(1,4)- α glucosa-P-P-prenol

Esta estructura se basa en los siguientes resultados:

- a) La incorporación de (^{14}C)ramnosa es máxima en presencia de UDPglu, UDPglucónico y GDPman (Tabla 9), aunque en ausencia de estos nucleótidos también hay incorporación (debido a la presencia de hexasacárido-P-P-prenol endógeno).
- b) El producto de incorporación es lábil en medio ácido (pH=2, 10 minutos, 100°C) y se forma un compuesto soluble en agua con movi- lidades en electroforesis en buffer I y en cromatografía en solvente C análogos a los del hexasacárido.
- c) Por hidrólisis ácida parcial del oligosacárido marcado con (^{14}C)ram o con (^{14}C)glu (obtenido este último en presencia de TDPram no radioactivo), se caracterizó el trisacárido ramosil-gencibiosa (Fig.73).
- d) Por acetólisis muy suave se aisló el disacárido ramosil-glucosa, con marca tanto en la ramnosa como en la glucosa (Fig.74). Como la unión de la gencibiosa al ácido glucurónico es muy resistente (Fig. 66) y la unión $\beta(1,6)$ de la gencibiosa es muy lábil en estas condi- ciones, la ramnosa debe estar unida a la glucosa del extremo no re- ductor de la gencibiosa. Si estuviera unida a la otra, se debería haber aislado ramosil-glucosil-glucurónico, lo que no ocurrió.
- e) Utilizando TDP(^{14}C)ram, UD(^{32}P)glu, GDPman y UDPglucónico, se obtuvo el compuesto con doble marca (Fig.75), permitiendo así extender al heptasacárido-P-P-prenol todas las propiedades de sus precursores.

Incorporación de ácido glucurónico, 2ª parte

Al incubar los preparados enzimáticos de *Acetobacter xylinum* con UDP(¹⁴C)glucónico, además de (¹⁴C)glucónico-man-glu-glu-P-P-prenol, se obtuvo otro compuesto lipofílico que se denominó "lipido-glucurónico". Dicho compuesto resultó de una labilidad al medio ácido suave comparable a la de los prenil-fosfo-azúcares, liberando (¹⁴C)glucurónico; esta propiedad llamó la atención dado que los glucuronidos descritos en la literatura son muy resistentes a la hidrólisis ácida.

Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa en CH₃OH 99%, (Fig.81), el lipido-glucurónico eluyó de la misma con una concentración de AcONH₄ similar a la que eluye glucosa-P-P-prenol; haciendo una comparación grosera se podría pensar en un compuesto del tipo glucurónico-P-lípido donde la carga del azúcar junto a la del fosfato le darían características aniónicas comparables a las de un difosfato. Por otra parte la síntesis de lipido-glucurónico se inhibió por el agregado de UDP y no de UMP (Fig.79); este hecho encajaría perfectamente con la idea de que el UDPglucónico cedería la porción de azúcar a un aceptor del tipo P-lípido para formar glucurónico-P-lípido.

Los intentos por incrementar la síntesis de lipido-glucurónico suplementando las incubaciones con FMP (en presencia de detergente) fueron infructuosos; tampoco se pudo obtener con marca en (³²P) incubando con UD(³²P)glucónico o con UDPglucónico no radioactivo y (³²P)flucaprenol agregado en forma exógena (datos no mostrados).

Sometido el lípido-glucurónico a un tratamiento con fenol 50% (sección 4.6.2.2.) el mismo permaneció inalterado, en condiciones en que los azúcar-P-prenoles (donde el prenoles es alílico) se rompen liberando el azúcar-P. Por tratamiento alcalino suave (0.06N HCl, 5 minutos, 100 C) la molécula se rompió liberando ácido (^{14}C) glucurónico, siendo este comportamiento diferente al de los lípido-P-azúcares que no se atacan en dichas condiciones.

Las propiedades del compuesto en estudio resultaron por un lado diferentes a la de los glucurónidos comunes y tampoco coincidieron con la de los lípido-azúcares descritos. El hecho de que la molécula sea lábil a la hidrólisis ácida y a la alcalina, abre la posibilidad de estar ante un intermediario distinto a los conocidos hasta el momento y parece interesante en el futuro estudiar en detalle la naturaleza de la aglicona. Los métodos de análisis estructural e identificación de sustancias como: espectrografía de masas, cromatografía gaseosa o su combinación no han sido utilizados en el desarrollo de esta Tesis debido las cantidades de sustancias relativamente grandes y en estado de alta pureza que se necesitan.

Conclusiones

Los estudios realizados en nuestro laboratorio en el campo de los lípidos intermediarios sintetizados por *Acetobacter xylinum*, podrían resumirse en el cuadro de la Fig.83.

Salvo en la reacción 1 en que se transfiere glucosa-1P en todos los otros casos (reacciones 2-7) el nucleótido precursor sólo cede su resto hexosa. Este esquema es el ya descrito en bacterias pero algunos puntos merecen destacarse.

a) En cada una de las etapas, salvo en el caso de la reacción 6 ha sido caracterizado el precursor y el producto de la reacción. En varias de ellos (reacciones 1, 2, 3, 4, 5-6) se ha utilizado como sustrato exógeno al respectivo prenil-fosfo-azúcar, confirmando así inequívocamente su función de precursor.

Esto, se ha logrado en muy pocos sistemas (152), en gran parte debido a la extrema labilidad de este tipo de prenil-fosfo-azúcares o a la inactivación de las enzimas de transferencia por los detergentes que para solubilizarlas, es necesario agregar a los medios de incubación.

b) Las reacciones que se han denominado 5 y 6 no han sido diferenciadas. Posiblemente sean análogas a la reacción 2 y muy rápidas, pero no se descarta la posibilidad de que variando la temperatura, pH, tiempos de reacción, etc., se las pueda individualizar.

c) La síntesis secuencial del mayor oligosacárido-P-P-prenol mencionado en la literatura contiene solamente cuatro azúcares (52). El descrito en este trabajo posee siete unidades y cuatro hexosas dife

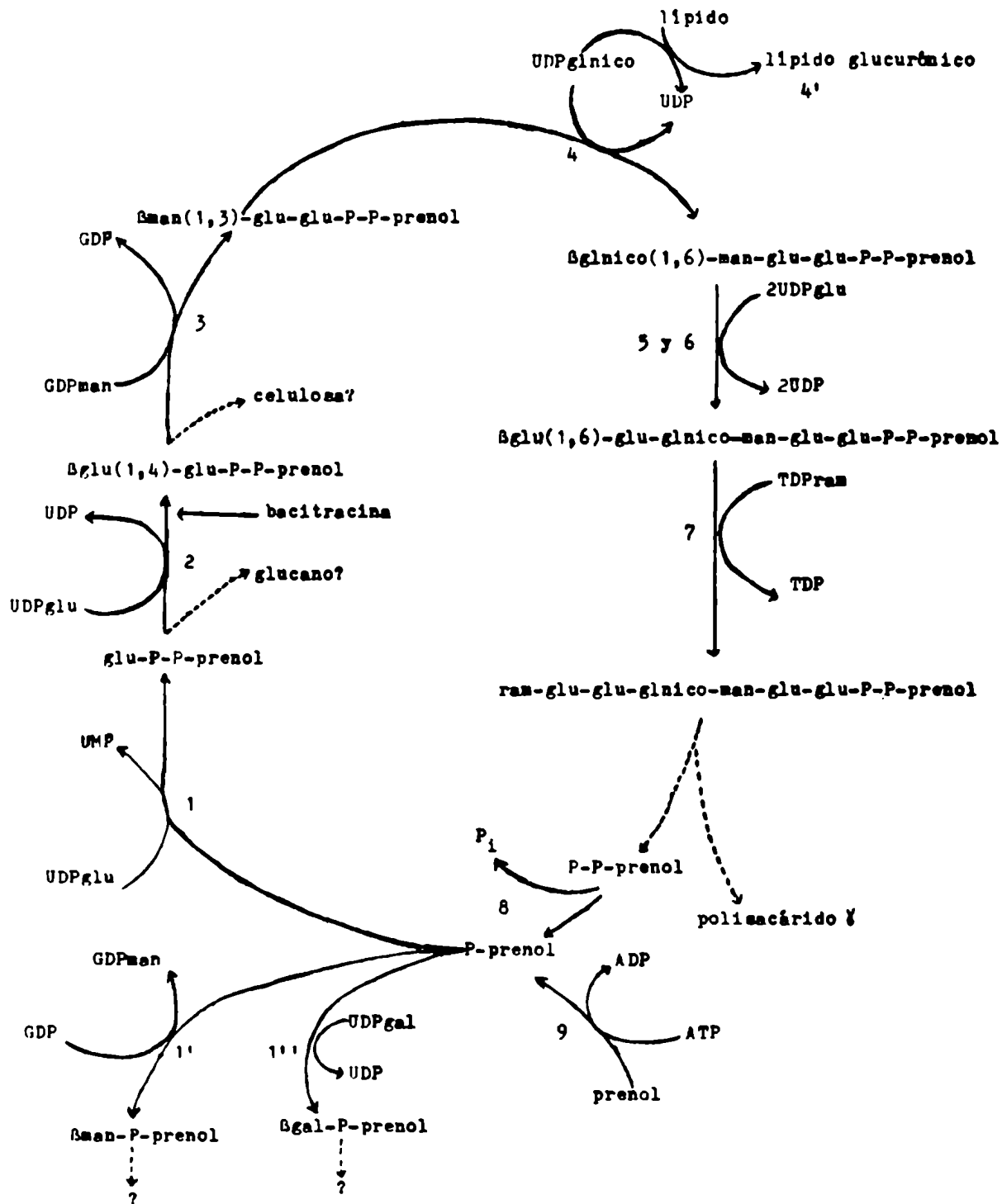


Figura 83: Cuadro de resultados.-

rentes.

d) El destino de estos prenil-fosfo-azúcares no ha sido establecido, pero pueden hacerse ciertas especulaciones:

1) Es bastante probable que el heptasacárido-P-P-prenol sea un intermediario en la síntesis del polisacárido γ . No sólo por la similitud de los azúcares que lo componen, sino porque estudios recientes de Luis Ielpi muestran que sometiendo el polisacárido γ a diversos tratamientos de degradación se pueden aislar los siguientes disacáridos: gencibiosa, β glucuronil(1,6)-manosa y glucosil-glucurónico, todos ellos presentes en la estructura del heptasacárido. Por otra parte la relación glucosa-ramnosa en dicho polisacárido es aproximadamente de 4/1, idéntica a la del oligosacárido.

Como se ha descrito en la sección Introducción, solamente hay dos ejemplos en la literatura (52) (55) de exoheteropolisacáridos complejos cuya unidad repetitiva se sintetiza a través de la intervención de un lípido intermediario, y ambos, realizados sobre exoheteropolisacáridos muy simples.

Se ha sugerido que todos los exopolisacáridos se sintetizarían por esta vía pero la complejidad de este tipo de estudios probablemente, hace que hayan sido poco estudiados.

2) Se podría pensar a priori que la celobiosa-P-P-prenol pudiera ser intermediaria de la celulosa y la glucosa-P-P-prenol del glucano, pero estas funciones no han sido establecidas por el momento.

3) La reacción 1' conduce a la formación de un β manosa-P-prenol. Si bien su participación en la síntesis de manosil-celobiosa-P-P-prenol

ha sido descartada es razonable esperar que actúe en otros casos, por ejemplo, en la formación de ramas laterales una vez que se produjo la polimerización.

4) La función del lípido-glucurónico también es desconocida. Su labilidad, tanto en medio ácido como alcalino, hacen difícil e interesante su estudio pues no se ha descrito hasta el momento ningún compuesto de este tipo.

Nota I: La formación de β gal-P-prenol (reacción 1'') ha sido estudiada en detalle por Pedro Romero (98) (151) y no se conoce aún la función de este compuesto.

La quinasa que fosforila al prenol así como la pirofosfatasa que regenera el P-prenol a partir de P-P-prenol también han sido descritas en *Acetobacter xylinum* por Pedro Romero (153).

Nota II: La bacitracina es un inhibidor de dicha pirofosfatasa (42) (43). En este sistema se inhibe la formación de celobiosa-P-P-prenol pero no la de glucosa-P-P-prenol, ni la de glucano (Rodolfo García, resultados no publicados). Es posible que en este caso el mecanismo sea más complejo o ligeramente diferente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, J.S.; Matsubashi, M.; Haskin, M.A. y Strominger, J.L. (1965) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 53, 881-889.
2. Weiner, I.M.; Higuchi, T.; Rothfield, L.; Saltmarsh-Andrew, M.; Osborn, M.J. y Horecker, B.L. (1965) Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A., 54, 228-235.
3. Wright, A.; Dankert, M. y Robbins, P.W. (1965) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A., 54, 235-241.
4. Hemming, F.W. (1974) M.T.P. International Review of Science, Biochemistry Series One (Ed. Goodwin, T.W.) Vol.4, Butterworths, Londres y University Park Press, Baltimore, Maryland, 39-97.
5. Beherens, N.H. (1974) en Biology and Chemistry of Eucariotic Cell Surface (Ed. Lee, L.Y.C. y Smith, E.E.) Vol.7, Academic Press, Nueva York, San Francisco y Londres, 159-180.
6. Waetcher, C.J. y Lennarz, W.J. (1976) Ann. Rev. Biochemistry 45, 95-112.
7. Weidel, W. y Pelzer, H. (1964) Adv. in Enzymology, 26, 193-228.
8. Rogers, H.J. y Perkins, H.R. (1968) Cell wall and membranes. E. and F. spon Ltd., London.
9. Ghuyssen, J.M.; Strominger, J.L. y Tipper, D.L. (1964) en Bacterial cell walls, in comprehensive Biochemistry (Ed. Florkin, M. y Stotz) 26A, 53-104, Elsevier, Amsterdam.
10. Glauert, A.M. y Thornley, M.J. (1969) en "The topography of the bacterial cell wall", Ann. Rev. Biochemistry, 23, 159-98.
11. Reaveley, D.A. y Burge, R.E. (1972) en "Walls and membranes in bacteria" en Advances in Microbial Physiology (Ed. Rose, A.H. y Tempest, D.M.) 7, 1-81. Academic Press, New York and London (pág. 30-46 y 47-68 son particularmente relevantes).

12. Meadow, M.P. (1971) en "Structure and synthesis of Bacterial cell walls". Department of Biochemistry, University Collage, London.
13. Freer, J.H. y Salton, M.R.J. (1971) en "The Anatomy and Chemistry of gram negative cell envelopes", 67-122, Academic Press, New York and London.
14. Kelemen, M.V. y Rogers, H.J. (1971) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 68, 992-996.
15. Formanek, H.; Formanek, S. y Wawra, H. (1974) Eur.J.Biochem. 46, 279-294.
16. Formanek, H.; Schleifer, K.H. y Seidl, H.P. (1976) FEBS Letters, 70, 150-154.
17. Lüderitz, O.; Galanos, C.; Risse, H.J.; Ruschmann, E.; Schlecht, S.; Schmidt, G.; Schulte-Holthansen, H.; Wheat, R. y Westphal, O. (1966a) Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 349.
18. Lüderitz, O.; Staut, A.M. y Westphal, O. (1966b) Bacterial Rev., 30, 192.
19. Robbins, P.W. y Wright, A. (1971) "Biosynthesis of O-Antigens in Microbial Toxins" (Ed. Weinbaum, G.; Kadis, S. y Ajl, J. S.), 351-366, Academic Press, New York and London.
20. Cynkin, M.A. y Osborn, M.J. (1968) Federation Proc., 27, 293.
21. Mikaido, H. y Hassid, W.Z. (1971) en Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry (Ed. Tipson, R.S. y Horton, D.) Vol.26, Academic Press, New York and London, 351-483.
22. Osborn, M.J. y Rothfield, L.I. (1971) en Microbial Toxins (Ed. Weinbaum, G.; Kadis, S. y Ajl, S.J.) Vol.IV, Academic Press, New York and London, 331-350.
23. Rothfield, L. y Romeo, D. (1971) Bacterial Rev., 35, 14-38.
24. Rothfield, L. y Pearlman, M. (1966) J.Biol.Chem., 241, 1386-1392.
25. Kauffmann, F. (1954) "Enterobacteriace", Munskgaard, Copenhagen.
26. Archibald, A.R.; Baddiley, J. y Blumson, N.L. (1968) Adv.

- Enzymol.Relat. Areas Mol.Biol., 30, 223-253.
27. Baddiley, J. (1968) Proc.Royal.Soc. Ser.B, 170, 331-348.
 28. Baddiley, J. (1970) Accounts.Chem.Res., 3, 98-105.
 29. Baddiley, J. (1972) en Essays in Biochemistry (Ed. Cambell, P.M. y Dickens, F.) Vol.8, 35-77, Academic Press, London and New York.
 30. Dankert, M.; Wright, A.; Kelley, W.S. y Robbins, P.W. (1966) Arch.Biochem. and Biophys., 46, 425.
 31. Wright, A.; Dankert, M.; Fennessey, P. y Robbins, P.W. (1967) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 57, 1798.
 32. Osborn, M.J. y Weiner, I.M. (1967) J.Biol.Chem., 243, 2631.
 33. Bray, D. (1967) Ph.D.Thesis, Massachusetts, Institute of Technology.
 34. Beckmann, I.; Subbaiah, T.V. y Stocker, B.A.D. (1964) Nature, 201, 1299.
 35. Bray, D. y Robbins, P.W. (1967) Biochem.Biophys.Res.Comm., 28, 334.
 36. Goldman, R. y Strominger, J.L. (1972) J.Biol.Chem., 247, 5116-5122.
 37. Willoughky, E.; Higashi, Y. y Strominger, J.L. (1972) J.Biol. Chem., 245, 5113-5115.
 38. Higashi, Y.; Siewert, G. y Strominger, J.L. (1970) J.Biol. Chem., 245, 3683-3690.
 39. Nikaido, H. y Nikaido, K. (1965) Biochem.Biophys.Res.Comm., 19, 322.
 40. Wright, A. (1971) J.Bacteriol., 105, 927.
 41. Uchida, T.; Makino, T.; Kurahashi, K. y Uetake, H. (1965) Biochem.Biophys.Res.Comm., 21, 354.
 42. Siewert, G. y Strominger, J.L. (1967) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 57, 767-773.
 43. Stone, K.J. y Strominger, J.L. (1971) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 68, 3223-3227.
 44. Strominger, J.L.; Izaki, K.; Matsuhashi, M. y Tipper, P. (1967) Federation Proceedings, 26, 9-22.

45. Higashi, Y.; Strominger, J.L. y Sweeley, C.C. (1967) Proc. Natl.Acad.Sci., 57, 1878.
46. Fiedler, F. y Glacer, L. (1974) Carb.Res., 37, 37-46.
47. Hussey, H. y Baddiley, J. (1972) Biochem.J., 127, 39-50.
48. Anderson, R.G.; Hussey, H. y Baddiley, J. (1972) Biochem. J., 127, 11-25.
49. Haugh, A. y Larsen, B. (1971) Carb. Res., 17, 287-308.
50. Gibbson, R.S. y Nygaard, M. (1968) Arch.oral Biol., 13, 1249.
51. Smith, E.E. (1970) FEBS Letters, 12, 33-37.
52. Troy, F.A.; Frerman, F.E. y Heath, E.C. (1971) Journal. Biol.Chem., 246, 118-133.
53. Yurewicz, E.C.; Ghalambor, M.A.; Duckwooth, D.H. y Heath, E. C. (1971) J.Biol.Chem., 246, 5607-5616.
54. Scher, M.; Lennarz, W.J. y Sweeley, C.C. (1968) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A., 39, 1313-1320.
55. Sutherland, I.W. y Norval, M. (1970) Biochem.J., 120, 567-576.
56. Larne, O. y Lindberg, B. (1976) Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 33, 295-322.
57. Jann, K.; Jann, B.; Schneider, K.F. y Orskov, I. (1968) Europ.J.Biochem., 5, 456.
58. Hungerer, D.; Jann, K.; Jann, B.; Orskov, F. y Orskov, I. (1967) Europ.J.Biochem., 2, 115.
59. Orskov, I.; Orskov, F.; Jann, B. y Jann, K. (1963) Nature, London, 200, 144.
60. Jann, K.; Jann, B.; Orskov, F. y Orskov, I. (1966) Biochem. Z., 346, 368.
61. Sutherland, I.W. (1969) Biochem.J., 115, 935.
62. Akira, K.; Noriko, T.; Schuzo, A.; y Koshiro, K. (1979) B.B. R.C., 85, 335-343.
63. Gahan, L.C.; Sandford, P.A. y Conrad, H.E. (1967) Biochem. N.Y., 6, 2755.

64. Sutherland, I.W. (1970) *Biochemistry.N.Y.*, 2, 2180.
65. Conrad, H.E.; Bambury, J.R.; Epley, J.D. y Kindt, T.J. (1966) *Biochemistry.N.Y.*, 5, 2808.
66. Jansson, P.E.; Keene, L. y Lindberg, B. (1975) *Carb.Res.*, 45, 275-282.
67. Melton, L.D.; Mindt, L.; Rees, D.A. y Sanderson, G.R. (1976) , 46, 245-257.
68. Parik, V.M. y Jones, J.K.N. (1963) *Can.J.Chem.*, 41, 2826.
69. Keene, L.; Lindberg, B. y Svensson, S. (1975) *Carbohydr.Res.* , 40, 69-75.
70. Barker, S.A. y Somers, P.S. en "The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry" (Ed. Pigman, W. y Horton, D.), Academic . Press, New York, 2^a edición (1970), Vol.IIB, 582.
71. Rebers, P.A. y Heilderberg, M. (1961) *J.A.Chem.Soc.*, 53, 3056-3059.
72. Tyler, J.M. y Heilderberg, M. (1968) *Biochemistry*, 8, 1384-92.
73. Chandhari, A.S.; Bishop, C.T. y Fielder, R.J. (1968) *Carbohydr.Res.*, 25, 161-172.
74. Higginbotham, J.D.; Das, A. y Heidelberger, M. (1972) *Biochem. J.*, 126, 225-231.
75. Das, A.; Higginbotham, J.D. y Heidelberger, M. (1972) *Biochem.J.*, 126, 233-236.
76. Rao, E.V.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1966) *Biochem.J.*, 100, 801-10.
77. Rao, E.V.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1966) *Biochem.J.*, 100, 811-814.
78. Kennedy, D.A.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1969) *Biochem. J.*, 115, 37-45.
79. Watson, M.J.; Tyler, J.M.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1972) *Biochem.J.*, 130, 45-54.
80. How, M.J.; Brimacombe, J.S. y Stacey, M. (1964) *Adv.Carbohy. Chem.*, 19, 303-358.

81. Rao, E.V.; Watson, M.J.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1969) *Biochem.J.*, 111, 547-556.
82. Watson, M.J. (1974) *Biochem.J.*, 137, 603-606.
83. Dixon, J.R.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1966) *Biochem. J.* 100, 507-511.
84. Chittenden, G.J.F.; Roberts, W.K.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1968) *Biochem.*, 109, 597-602.
85. Dixon, J.R.; Roberts, W.K.; Mills, G.T.; Buchanan, J.G. y Baddiley, J. (1968) *Carb.Res.*, 8, 262-265.
86. Roy, N. y Glandemans, C.P.J. (1968) *Carb.Res.*, 8, 214-218.
87. Takayama, K. y Goldman, B.S. (1970) *J.Biol.Chem.*, 245, 6251-6257.
88. Takayama, K.; Schnoes, H.K. y Semmler, E.J. (1973) *Biochem. Biophys.Acta.*, 316, 212-221.
89. Takayama, K. y Armstrong, E.L. (1971) *FEBS Lett.*, 18, 67-69.
90. Schultz, J. y Elbein, A.D. (1974) *Arch.Biochem.Biophys.*, 160, 311-322.
91. Mescher, F.M.; Hansen, U. y Strominger, J.L. (1976) *J.Biol. Chem.*, 251, 7289-7294.
92. Nikaïdo, H.; Nikaïdo, K.; Nakae, T. y Makela, P.M. (1971) *J. Biol.Chem.*, 246, 3902-3911.
93. Nikaïdo, K. y Nikaïdo, H. (1971) *J.Biol.Chem.*, 246, 3912-19.
94. Jankowski, W.; Mankowski, T. y Chojnacki, T. (1974) *Biochim. Biophys.Acta.*, 337, 153-162.
95. Hancock, I.C. y Baddiley, J. (1972) *Biochem.J.*, 127, 27-37.
96. Johnson, J.G. y Wilson, D.B. (1975) *Biochem.Soc.Trans.*, 3, 1095-1096.
97. García, R.C.; Recondo, E. y Dankert, M. (1974) *Eur.J.Biochem.*, 43, 93-105.
98. Romero, P.; García, C.R. y Dankert, M. (1977) *Molecular and Celular Biochemistry*, 16, 205-211.
99. Chin, T.H. y Saralkar, C. (1978) *J. of Bacteriol.*, 133, 185.
100. Yamamori, S.; Murazami, N.; Araki, Y. y Ito., E. (1978) *J. Biol.Chem.*, 253, 6516-6522.

101. Troy, F.A.; Vijay, I.K. y Tesche, M. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250, 156-163.
102. Osborn, M.J. (1969) *Ann.Rev.Biochem.*, 38, 501-538.
103. Lomax, J.A.; Poxton, I.R. y Sutherland, I.W. (1973) *FEBS Letters*, 34, 232-234.
104. Douglas, L.J. y Baddiley, J. (1968) *FEBS Letters.*, 1, 114-16.
105. Bettinger, G.E.; Chatterjee, A.N. y Young, F.E. (1978) *J. Biol.Chem.*, 252, 4118-4124.
106. Sandermann Jr, H. (1977) *FEBS Letters.*, 81, 294-98.
107. Anderson, J.S.; Matsubashi, M.; Haskin, M.A. y Strominger, J.L. (1967) *J.Biol.Chem.*, 242, 3180-3190.
108. Katz, W.; Matsubashi, M.; Dietrich, C.P. y Strominger, J.L. (1967) *J.Biol.Chem.*, 242, 3207-3217.
109. Matsubashi, M.; Dietrich, C.P. y Strominger, J.L. (1967) *J. Biol.Chem.*, 242, 3191-3206.
110. Mescher, M.F. y Strominger, J.L. (1976) *J.Biol.Chem.*, 251, 2005-2014.
111. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, sixth edition pág 181.
112. Conrad, H.E. (1972) en *Methods in Carbohydrate Chemistry*, (Eds. Whistler, R.L. y Bemillu, J.N.) Vol.IV. Academic Press, New York and London, 154-157.
113. Smith, F. y Montgomery, R. (1956) en *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. Glick, D.) Vol.III. Interscience Publishers, New York and London, 153-212.
114. Algranati, I.D.; Beherens, N.H.; Carminatti, H. y Cabib, E. (1966) en *Methods in Enzymology* (Ed. Neufeld, E.F. y Ginsburg J.) Vol.III. Academic Press, New York and London, 411-416.
115. Hestrin, S. y Schram, M. (1954) *Biochem, J.*, 58, 345-352.
116. Davinson, E.A. (1966) en *Methods in Enzymology* (Ed. Neufeld E.F. y Ginsburg, J.) Vol.VII. Academic Press, New York and London, 52-60.
117. Tarlov, A.R. y Kennedy, E.P. (1965) *J.Biol.Chem.*, 240, 49-53.

118. Kocourek, J. y Ballou, C.E. (1969) *J.Bacteriol.*, 100, 1175-1181.
119. Fales, F.W. (1959) *Anal.Chem.*, 31, 1898.
120. Herscovics, J.; Warren, C.D.; Jeanloz, R.; Wedgwood, J.F.; Lin, I.Y. y Strominger, J.L. (1974) *FEBS .Letters*, 45, 312-317.
121. Chi Rosso, G.; Masushige, S.; Warren, C.D.; Kiorpes, T.C. y Wolf, G. (1976) *J.Biol.Chem*, 251, 6465.
122. Li, Y.T. y Li, S.C. (1972) en *Methods in Enzymology* (Ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) Vol.28, 702-713, Academic Press, New York.
123. Talalay, P.; Fishman, W.H. y Huggins, C. (1946) *J.Biol.Chem.* 166, 757-772.
124. Rouser, G.; Kritchevsky, G.; Heller, D. y Lieber, E. (1965) *J.Am.Oil.Chem.Soc.*, 40, 425-454.
125. Paladini, A.C. y Leloir, L.F. (1952) *Biochem.J.*, 51, 426-430.
126. Jeanes, A.; Wise, C.S. y Dimler, R.J. (1951) *Anal.Chem.*, 23, 415-420.
127. Leloir, L.F.; Parodi, A.J. y Beherens, N.H. (1971) *Rev.Soc. Arg.Biol.*, 47, 108-116.
128. Tung, K.K. y Nordin, J.H. (1968) *Biochim. Biophys.Acta.*, 158, 154-156.
129. Bourne, J.; Hutson, D.H. y Weigel, H. (1961) *J.Chem.Soc.*, 35,
130. Schwimmer, S.; Beneven, A. y Weston, W.J. (1956) *Arch.Biochem. Biophys.*, 60, 279.
131. Forter, A.B. (1957) *Advan. Carb. Chem* (1957), 12, 81.
132. Recondo, E.; Goncalves, I.R.J. y Dankert, M. (1964), 16, 415.
133. Paladini, A.C. y Leloir, L.F. (1952) *Biochem.J.*, 51, 426.
134. Trevelyan, W.E.; Procter, D.I.P. y Harrinson, J.S. (1950) *Nature*, 166, 444-445.
135. Bray, G.A. (1960) *Anal.Biochem.*, 1, 279-285.
136. Albrecht, G.L.; Bass, S.T.; Seifert, L.L. y Hansen, R.G. (1966) *J.Biol.Chem*, 241, 2968-2975.

137. Thomas, J.A.; Schlender, K.K. y Larner, J. (1968) Anal. Biochem., 25, 486-499.
138. Bernstein, R.L. y Robbins, P.W. (1965) L.Biol.Chem., 240, 391.
139. Okazaki, R.; Okazaki, T.; Strominger, J.L. y Michelson, A. M. (1962) J.Biol.Chem., 237, 3014.
140. Zalitis, J. y Feinbold, D.S. (1969) Archives of Biochem. and Biophys., 132, 457-465.
141. Warren, C.D.; Hercovics, A. y Jeanloz, R.W. (1975) J.Biol. Chem., 250, 8069-8077.
142. Hercovics, A.; Bugge, B. y Jeanloz, W. (1977) J.Biol. Chem., 252, 2271-2277.
143. Bourne, E.J.; Hutson, D.H. y Weigel, H. (1960) J.Chem.Soc., 4252-4256.
144. Bourne, E.J.; Hutson, D.H. y Weigel, H. (1961) J.Chem.Soc., 35-43.
145. Bourne, E.J.; Hutson, D.H. y Weigel, H. (1959) Chem. and Ind., 1047.
146. Elderfield, R.C. (1945) Advances in Carbohydrate, 1, 149.
147. Axelrod, J.; Inscoc, J.K. y Tomkins, G.M. (1958) J.Biol. Chem. 232, 835-841.
148. Keglevič, D. (1979) en Advances in Carbohidrate Chemistry and Biochemistry. (Eds. Tipson, R.S. y Horton, D.) Vol.36 Academic Press, New York, San Francisco and London, 57-134.
149. Pont Lezica, R.; Brett, C.T.; Romero Martínez, P. y Dankert, M., (1975) B.B.R.C., 66, 980-987.
150. Weidel, W. y Pelzer, H. (1964) en Adv in Enzimology, 26, 1964.
151. Romero Martínez, P. (1977) Tesis doctoral.
152. Kanegasaky, S. y Wright, A. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci, 67, 951.
153. Romero Martínez, P; Garcia, R.C. y Dankert, M. (1976) Acta Physiologica Latinoamericana, 26, 434-437.

Richard Young *M. Dankert*