

Tesis de Posgrado

Prenil-fosfo-azúcares derivados de galactosa : Su metabolización en eucariotes

Iñon, Nora

1983

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:

Iñon, Nora. (1983). Prenil-fosfo-azúcares derivados de galactosa : Su metabolización en eucariotes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1777_Inon.pdf

Cita tipo Chicago:

Iñon, Nora. "Prenil-fosfo-azúcares derivados de galactosa : Su metabolización en eucariotes". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1777_Inon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"PRENIL-FOSFO-AZÚCARES" DERIVADOS DE GALACTOSA.

SU METABOLIZACION EN EUCARIOTES.

Autor: NORA IÑON

Director: MARCELO ALBERTO DANKERT

Lugar de trabajo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
"FUNDACION CAMPOMAR"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1983

J777
Ej.2.

Héctor,

querido

a mis padres,

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo A. Dankert, director de esta tesis, por sus enseñanzas, estímulo y valiosos consejos, que fueron fundamentales para la concreción del trabajo.

Al Dr. Carlos E. Cardini, consejero de estudios, por el apoyo brindado.

A los miembros del Consejo Directivo del instituto: Israel D. Algranati, Carlos E. Cardini, Héctor Carminatti, Marcelo A. Dankert, Luis F. Leloir, José M. Olavarría, y Héctor N. Torres, por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

A Roberto O. Couso, Marta Eirin, Marcela Ferrer, Luis Ielpi y Susana Raffo por los gratos momentos compartidos durante todos estos años.

A los profesores, colegas y compañeros del I.I.B. por su cooperación y valiosas sugerencias durante la realización de este trabajo.

A la Sra. Soledad Giménez, al Sr. Francisco Irusta y a la Srta. Margarita Mazzardi por la esmerada asistencia técnica proporcionada.

A Norberto Malarini, por su esmero y dedicación en la realización de los dibujos de esta tesis.

1960

una forma a cura non elaborata
in effect .

ABREVIATURAS

Ara	arabinosa
Asn	asparagina
ATP	adenosina trifosfato
CHO	células de ovario de hamster
cpm	cuentas por minuto
CMP-SA	citidina monofosfato ácido siálico
Co-A	coenzima A
CTP	citidina trifosfato
DOC	deoxicolato
Dol	dolicol
Dol-P	dolicol monofosfato
Dol-PP	dolicol difosfato
Dol-P-dGlc	dolicol monofosfato 2 deoxi-D-glucosa
Dol-P-Gal	dolicol monofosfato galactosa
Dol-P-Glc	dolicol monofosfato glucosa
Dol-P-Man	dolicol monofosfato manosa
Dol-PP-GlcNAc	dolicol difosfato-N-acetilglucosamina
Dol-PP-(GlcNAc) ₂	dolicol difosfato-N,N'diacetilquitobiosa
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FGlc	2-deoxi-2-fluoro-D-glucosa
Fic-P	ficaprenol monofosfato
Fic-P-Gal	ficaprenol monofosfato galactosa
Fig	figura
FMan	2-deoxi-2-fluoro-D-manosa
Fuc	fucoza

Gal	galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GDP	guanosina difosfato
GDP-dGlc	guanosina difosfato 2-deoxi-D-glucosa
GDP-Man	guanosina difosfato manosa
Glc	glucosa
dGlc	2-deoxi-D-glucosa
GlcN	2 amino-2-deoxi-D-glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
(GlcNAc) ₂	N,N'diacetilquitobiosa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
Hyl	hidroxilisina
Hyp	hidroxiprolina
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
Man	manosa
min	minuto
oligosac	oligosacárido
oligosac-Gal	oligosacáridos con galactosa
oligosac-Gal ₁	Gal-Mang-(GlcNAc) ₂
oligosac-Gal ₂	Gal-Glc-Mang-(GlcNAc) ₂
oligosac-Glc	oligosacáridos con glucosa
oligosac-Glc ₁	Glc-Mang-(GlcNAc) ₂
oligosac-Glc ₂	Glc ₂ -Mang-(GlcNAc) ₂
oligosac-Glc ₃	Glc ₃ -Mang-(GlcNAc) ₂
P	fosfato
Ser	serina

SA	ácido siálico
TCA	ácido tricloroacético
TEA	trietanol amina
Thr	treonina
Tris	2-amino-2(hidroxisilil)1-3 propanodiol
UDP	uridina difosfato
UDP-Gal	uridina difosfato galactosa
UDP-Glc	uridina difosfato glucosa
UDP-GlcNAc	uridina difosfato N-acetilglucosamina
UDP-xilosa	uridina difosfato xilosa
UMP	uridina monofosfato
VSV	virus de la estomatitis vesicular
Xyl	xilosa

INDICE

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	6
1. Glicoproteínas	6
1.1. Definición y generalidades	6
1.2. Clasificación y tipos de enlace	10
1.3. Estructuras de oligosacáridos unidos a glicoproteínas	14
1.3.1. Oligosacáridos de tipo complejo	15
1.3.2. Oligosacáridos de tipo alta manosa	17
1.3.3. Oligosacáridos de tipo híbrido	17
1.4. Biosíntesis de glicoproteínas	20
1.4.1. Generalidades	20
1.4.2. Glicosiltransferasas	20
1.4.3. Lípidos intermediarios	21
1.4.3.1. Dolicol monofosfato azúcares	25
1.4.3.1.a) Dolicol monofosfato glu- cosa	25
1.4.3.1.b) Dolicol monofosfato manosa	26
1.4.3.1.c) Dolicol monofosfato xilosa	26
1.4.3.1.d) Dolicol monofosfato galactosa	27

1.4.3.2.	Dolicol difosfato azúcares	28
1.4.3.2.a)	Dolicol difosfato mono- sacárido y oligosacári- dos sin glucosa	28
1.4.3.2.b)	Dolicol difosfato oligo- sacáridos con glucosa	31
1.4.4.	Estructura del oligosacárido-Glc	32
1.4.5.	Síntesis de Dol-PP-oligosac-Glc (ciclo del dolicol)	34
1.4.6.	Glicosilación de proteína	37
1.4.6.1.	Transferencia de los oli- gosacáridos a proteína	37
	a) Requerimientos para que el oligosacárido sea transferido	37
	b) Requerimientos de los aceptores proteicos	38
1.4.7.	Procesamiento del oligosacárido unido a proteína	39
1.4.7.1.	Introducción	39
1.4.7.2.	Endoglicosidasas	41
1.4.7.3.	Etapas iniciales del pro- cesamiento	44
	a) Remoción de glucosas	44
	b) Remoción de manosas	47
1.4.7.4.	Etapas finales del proce- samiento	48

a) oligosacáridos comple- jos	48
b) oligosacáridos de alta manosa	53
1.4.7.5. Elongación	57
1.5. Inhibidores de la glicosilación de pro- teínas	58
1.5.1. Inhibidores de la formación de dolicol fosfato	59
1.5.2. Inhibidores de la formación de oli- gosacáridos ligados a lípido	60
1.5.2.1. Inhibición por azúcares análogos	60
a) 2-deoxi-D-glucosa (dGlc)	61
b) 2-deoxi-2-fluoro-D-glucosa (FGlc)	65
c) 2-deoxi-2-fluoro-D-manosa (FMan)	65
d) 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (GlcN)	66
1.5.2.2. Inhibición por sustancias antibióticas	66
1.5.2.3. Ayuno de azúcares	70
1.6. Función de los hidratos de carbono en las glicoproteínas del tipo N-glicosídicas	72

2. ANTECEDENTES RECIENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	80
3. MATERIALES Y METODOS	82
3.1. Preparados enzimáticos	82
3.1.1. Preparado enzimático de <i>Acetobacter xylinum</i>	82
3.1.2. Preparado enzimático de hígado de rata	82
3.1.3. Preparado enzimático de cerebro de rata	83
3.1.4. Preparado enzimático de timo de ternero	83
3.1.5. Preparado enzimático de páncreas de rata	84
3.2. Preparación de sustratos	84
3.2.1. Dolicol de hígado de cerdo	84
3.2.2. Dolicol fosfato	85
3.2.3. UDP-(¹⁴ C)Glc y UDP-(³ H)Glc	86
3.2.4. UDP-(¹⁴ C)Gal	86
3.2.5. Dol-P-(¹⁴ C)Gal	86
3.2.6. Dol-P-(¹⁴ C)Glc	88
3.2.7. Dol-PP-oligosac-Glc marcado en Glc; preparación de EDTA-Mg	88
3.2.7.1. Método I: a partir de UDP-(¹⁴ C)Glc o UDP-(³ H)Glc sin detergente	88
3.2.7.2. Método II: a partir de UDP-(¹⁴ C)Glc con detergente	89

3.2.7.3. Método III: a partir de Dol-P-(¹⁴ C)Glc	90
3.2.8. Preparación de Dol-PP-oligosacáridos marcados en glucosa y en manosa por marcación "in vivo"	90
3.3. Sistemas de incubación	90
3.3.1. Incubación en pequeña escala	90
3.3.1.1. Método A	91
3.3.1.2. Método B	92
3.3.1.3. Método C	93
3.3.2. Incubación en gran escala	93
3.4. Preparación de estandares	94
3.4.1. Preparación de oligosac-Glc a partir de Dol-PP-oligosac.	94
3.4.2. Separación de oligosac-Glc ₁ , oligosac- Glc ₂ y oligosac-Glc ₃ por cromatografía en papel	94
3.4.3. Preparación de maltooligosacáridos	95
3.5. Tratamientos enzimáticos	95
3.5.1. manosidasa	95
3.5.2. β galactosidasa	95
3.5.3. galactosidasa	96
3.5.4. Endo-N-acetilglucosaminidasa H	96
3.5.5. proteasa	96
3.5.6. medición de la actividad de manosida- sas en microsomas de hígado	97
3.6. Tratamientos químicos	97

3.6.1. Hidrólisis ácida suave	97
3.6.2. Hidrólisis ácida total	98
3.6.3. Tratamiento alcalino reductor	98
3.6.4. Acetólisis parcial	99
3.6.5. Oxidación con periodato	100
3.6.6. Permetilación	100
3.6.7. Reducción con borohidruro de sodio	102
3.7. Cromatografías	102
3.7.1. Cromatografía en columna de DEAE- celulosa	102
3.7.1.1. Columna preparativa	102
3.7.1.2. Columna analítica	103
3.7.2. Cromatografía en columna de Sephadex LH 20	103
3.7.3. Cromatografía en columna de Bio Gel P 2	103
3.7.4. Cromatografía en columna de Bio Gel P 6	104
3.7.5. Cromatografía y electroforesis en papel	104
3.8. Medida de la radioactividad	105
3.8.1. Medida de la radioactividad en papel	105
3.8.2. Contaje diferencial de radioactividad de (^{14}C) y de (^3H)	106
3.8.3. Medida de la radioactividad en solven- tes orgánicos	106

4. RESULTADOS	107
4.1. Incorporación de (^{14}C)galactosa a partir de Dol-P-(^{14}C)Gal a material insoluble en TCA	107
4.2. Análisis de la radioactividad incorporada a material insoluble en TCA	112
4.3. Fraccionamiento del material insoluble en TCA	114
4.4. Transferencia de galactosa con preparados de diferentes tejidos y utilizando diferentes enzimas	116
4.5. Condiciones óptimas de obtención de material marcado con (^{14}C)galactosa soluble en 1103	119
4.5.1. Incorporación simultánea de galactosa y glucosa	124
4.6. Propiedades y caracterización parcial del material marcado con (^{14}C)galactosa extraíble con 1103	128
4.6.1. Análisis de los compuestos sin degra- dar	128
4.6.1.1. Cromatografía en papel	128
4.6.1.2. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	128
4.6.2. Análisis del azúcar incorporado	132
4.6.3. Productos de la hidrólisis ácida suave	132
4.6.3.1. Preparación de Dol-PP- oligosac-Glc en presencia y ausencia de detergente	135

4.6.4.	Análisis de la porción oligosacarídica	137
4.6.4.1.	Tratamiento con manosidasa	137
4.6.4.2.	Tratamiento alcalino reductor	139
4.6.4.3.	Tratamiento con endo-N-acetilglucosaminidasa H	141
4.6.4.4.	Tratamiento con α o β galactosidasa	141
4.6.4.5.	Fraccionamiento del oligosac-(^{14}C)galactosa	142
4.6.4.6.	Efecto del tiempo de incubación en la proporción de los oligosacáridos marcados con (^{14}C)glucosa o (^{14}C)galactosa	143
4.6.4.7.	Tamaño de los oligosacáridos marcados con (^{14}C)glucosa obtenidos en presencia o en ausencia de detergente	150
4.6.4.8.	Incorporación de (^{14}C)galactosa en presencia de dadores de glucosa	152
	a) UDP-Glc como dador de glucosa	152
	b) Dol-P-Glc como dador de glucosa	152
	c) Dol-P-Glc como dador de glucosa, utilizando DOC como detergente	153

4.7. Estudios estructurales de los oligosac-Gal ₁ y oligosac-Gal ₂	158
4.7.1. Oxidación con periodato	158
4.7.2. Permetilación	162
4.7.3. Tratamiento con manosidasa	162
4.7.4. Acetolisis	167
4.7.5. Caracterización de los disacáridos marcados con (¹⁴ C)galactosa	169
4.8. Transferencia de (¹⁴ C)galactosa a material insoluble en TCA caliente a partir de Dol-P-(¹⁴ C)Gal	173
4.8.1. Efecto del UDP-Gal	173
4.8.2. Requerimiento de Mn ⁺⁺	175
4.8.3. Efecto de la concentración de Mn ⁺⁺	178
4.8.4. Efecto del tiempo de incubación	178
4.8.5. Efecto de diferentes detergentes	178
4.8.6. Efecto de la concentración de Tritón X-100	178
4.8.7. Efecto de la temperatura de incubación	179
4.9. Transferencia de (¹⁴ C)galactosa de Dol-P-(¹⁴ C)Gal a distintas fracciones en fun- ción del tiempo de incubación	185
4.10. Transferencia a proteína de oligosacáridos marcados con (¹⁴ C)glucosa o con (¹⁴ C)galactosa a partir de sus respectivos Dol-PP-oligosacáridos	187

4.10.1. Transferencia a proteína del oligosac(¹⁴ C)Glc a partir de Dol-PP-oligosac(¹⁴ C)Glc	187
4.10.1.1. Efecto de la concentración de Tritón X-100	187
4.10.1.2. Efecto del tiempo de incubación	188
4.10.2. Transferencia a proteína de oligosac-(¹⁴ C)Gal a partir de Dol-PP-oligosac-(¹⁴ C)Gal	191
4.10.2.1. Purificación de Dol-PP-oligosac-(¹⁴ C)Gal y transferencia de la marca a proteína	191
4.10.2.2. Efecto del tiempo de incubación	192
4.10.2.3. Efecto de la concentración de Tritón X-100	192
4.10.2.4. Preparación en gran escala de proteína marcada con (¹⁴ C)galactosa a partir de Dol-PP-oligosac-(¹⁴ C)Gal	197
4.11. Verificación de que el oligosac-(¹⁴ C)Gal es transferido a una proteína	197
4.11.1. Verificación que el "digerido de proteasa" marcado con (¹⁴ C)galactosa contiene glicopéptidos	200

1940

-

-

1941

RESUMEN

La biosíntesis de las glicoproteínas tipo asparagina se inicia a través del llamado "Ciclo del Dolicol". Este ciclo comienza con la transferencia de N-acetilglucosamina-1-fosfato de UDP-GlcNAc al dolicol monofosfato para dar Dol-PP-GlcNAc y continúa con la adición sucesiva de una GlcNAc, nueve manosas y tres glucosas para formar Dol-PP-(GlcNAc)₂Man₉Glc₃. Esta segunda GlcNAc y las cinco primeras manosas son cedidas por sus respectivos nucleótido-azúcares, las cuatro manosas restantes y los tres residuos glucosa son transferidos a partir de dolicol monofosfato manosa y de dolicol monofosfato glucosa, respectivamente. El Dol-PP-(GlcNAc)₂Man₉Glc₃ a su vez transfiere el oligosacárido completo a un péptido naciente y una vez ligado a proteína, el oligosacárido, a través de una serie de reacciones denominadas "procesamiento", es sometido a una degradación parcial por medio de glicosidasas específicas perdiendo todos los residuos glucosa y algunos residuos manosa. En etapas posteriores, por adición de nuevos azúcares, se decide si la glicoproteína formada será del tipo "alta manosa" o "complejo".

En todo este "Ciclo del Dolicol" participan únicamente dos dolicol monofosfato azúcares, derivados de manosa y de glucosa, respectivamente.

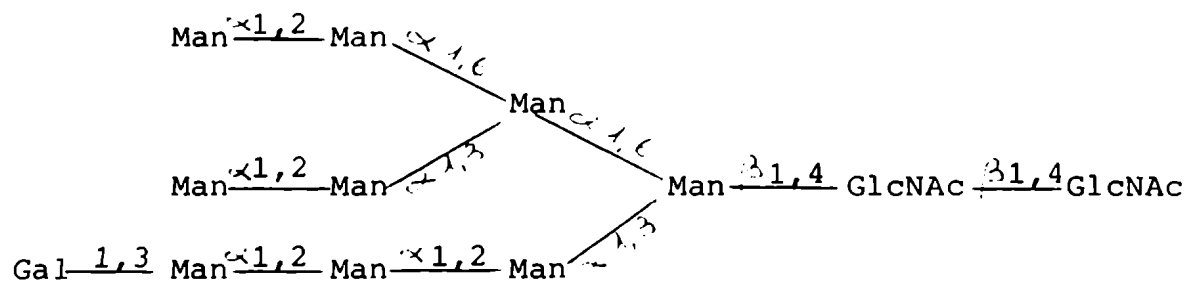
En este trabajo se investigó si otro doliquil derivado, el dolicol monofosfato galactosa, participaba en este ciclo. Para ello se preparó Dol-P-(¹⁴C)Gal utilizando enzimas de bacterias (*Acetobacter xylinum*) y se estudió la incorporación de (¹⁴C)galactosa a los distintos componentes del ciclo del dolicol y a glicoproteínas.

Se encontró que:

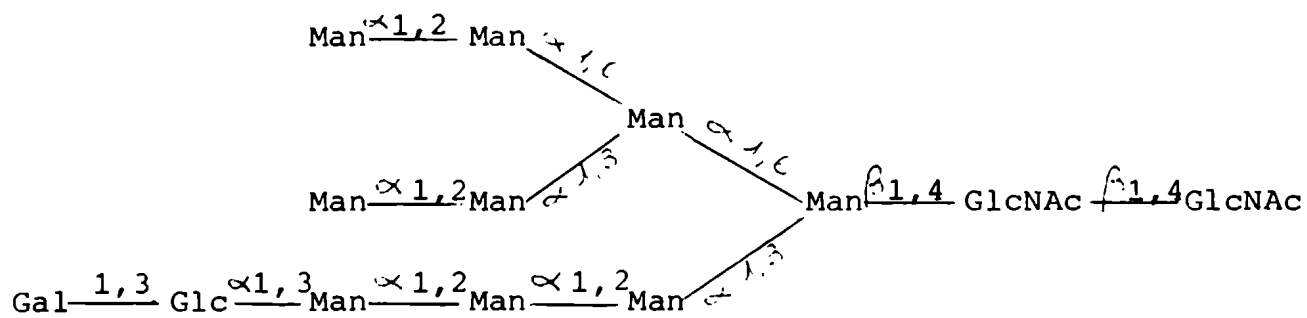
1°) El Dol-P-(¹⁴C)Gal era capaz de transferir (¹⁴C)galactosa a un lípido difosfato oligosacárido que se denominó Dol-PP-oligosac-Gal, con propiedades prácticamente idénticas a las del lípido difosfato oligosacárido glucosilado arriba mencionado. Esta transferencia se encontró incubando diferentes tejidos (cerebro, hígado, timo, páncreas) con Dol-P-(¹⁴C)Gal en presencia de Triton X-100 y analizando la radioactividad soluble en un extracto cloroformo: metanol: agua (1:1:0,3) por los métodos clásicos (cromatografía en papel y en columnas de DEAE-celulosa, hidrólisis ácida total, hidrólisis ácida suave, etc.)

2°) El análisis de la porción sacarídica reveló que en realidad se trataba de dos oligosacáridos (denominados oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂), a los cuales se les asignó, en base a estudios de permetilación, oxidación con periodato, tratamiento con α -manosidasa, endo N-acetilglucosaminidasa H, reducción alcalina, acetólisis parcial, etc, las siguientes estructuras:

Oligosac-Gal₁



Oligosac-Gal₂



3°) Tanto el oligosac-Gal₁ como el oligosac-Gal₂ eran transferidos a proteína. Esto se demostró incubando Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal con un preparado microsomal de hígado de rata en presencia de Triton X-100 y Mn⁺⁺, y analizando la radioactividad incorporada a material insoluble en TCA por tratamiento con proteasa, aislamiento de los glicopéptidos en columna de Bio Gel P 6, electroforesis de los mismos en buffer de pH ácido y alcalino, y tratamiento con endo N-acetilglucosaminidasa H.

4°) En las condiciones de transferencia a proteína, a diferencia de lo que ocurre con los oligosacáridos glucosilados, el oligosac-Gal₁ y el oligosac-Gal₂ no eran procesados. Esto se demostró comparando el tamaño de los oligosacáridos galactosilados liberados con endo N-acetilglucosaminidasa H con el de estándares de oligosacáridos glucosilados.

5°) El preparado microsomal utilizado no tenía actividad de glicosidasas lisosomales (a pH=4,5) pero a pH=6,5, condición óptima para la actividad de glicosidasas de Golgi, se detectaron manosidasas y glucosidasas pero no galactosidasas.

6°) A pH=6,5, las glicosidasas en el preparado microsomal degradaron a los oligosacáridos glucosilados (oligosac-Glc₁ y oligosac-Glc₂) hasta llegar a Man₅-(GlcNAc)₂.

7°) A pH=6,5, debido a la ausencia de actividad galactosidásica, las manosidasas sólo pudieron actuar sobre la rama 1-6 de los oligosacáridos galactosilados. Se encontró que el oligosac-Gal₁ pudo llegar a perder hasta cuatro residuos manosa, mientras que el oligosac-Gal₂ fue casi insensible, pudiendo perder con mucha dificultad una manosa o a lo sumo dos.

Finalmente, se discute el papel del Dol-P-Gal en el "Ciclo del Dolicol" así como el por qué de las diferencias de comportamien-

to de los oligosacáridos galactosilados formados.

Debe destacarse que la síntesis de Dol-P-Gal en eucariotes no ha sido aún demostrada en forma inequívoca. Con los sistemas enzimáticos utilizados en este trabajo no se pudo detectar su formación.

1. Introducción

1. Glicoproteínas.

1.1. Definición y generalidades.

La denominación de glicoproteínas se aplica a los compuestos naturales formados por hidratos de carbono y proteínas.

Hace muchos años se pensaba que los carbohidratos eran una impureza de las proteínas y se hicieron muchos esfuerzos para eliminarlos. En 1938 Albert Neuberger (1) comunicó la preparación de un polisacárido de ovalbúmina de gallina y mostró que este polisacárido tenía manosa, glucosa y un material conteniendo nitrógeno al cual no pudo identificar. En realidad, la finalidad de este estudio fue identificar la naturaleza de la unión entre la proteína y el carbohidrato; pero los métodos disponibles hasta ese momento no permitieron concretar ese objetivo.

Fue nuevamente Neuberger quien veinte años más tarde aisló por tratamiento exhaustivo con distintas enzimas proteolíticas un glicopéptido de ovalbúmina de gallina y demostró que este glicopéptido consistía en ácido aspártico unido a una cadena heterosacáridica única formada por manosa y glucosamina (2-3). Fue más tarde, con el advenimiento de nuevas técnicas (cromatografía y electroforesis sobre papel (4), cromatografía de intercambio iónico (5), cromatografía gaseosa (6) y espectografía de masa (7)) que se pudo identificar la naturaleza del enlace entre la porción sacáridica y la proteína, por comparación entre N-acetilglucosaminil-asparagina sintetizado químicamente y el compuesto aislado de distintas fuentes naturales. En este caso, el enlace resultó ser N-glicosídico entre el carbono anomérico de la N-acetil-glucosamina y el nitrógeno del grupo amido de la asparagina. Pero puede haber como ya veremos otros tipos de unión.

Mientras la composición de aminoácidos de las glicoproteínas es muy variada, la porción hidrocarbonada está constituida por un número limitado de azúcares. De los 200 diferentes monosacáridos que están presentes en la naturaleza solo 11 se encuentran en glicoproteínas. La mayoría de ellos son hexosas o sus derivados simples, tales como N-acetilhexosaminas y ácidos urónicos. Una deoxihexosa (L-fucosa) y dos pentosas (L-arabinosa y xilosa) son también constituyentes de glicoproteínas. Además muchas glicoproteínas de origen animal contienen otros azúcares complejos, los ácidos siálicos, derivados de un aminoazúcar formado por nueve carbonos llamado ácido neuramínico. El más común de ellos es el ácido N-acetilneuramínico. Los azúcares en las glicoproteínas pueden estar también substituidos por otros grupos tales como sulfato, en los proteoglicanos de tejidos conectivos, en mucinas intestinales y en glicoproteínas virales, o fosfatos en hidrolasas lisosomales y mananos de levaduras.

El tamaño de la región hidrocarbonada puede variar desde un mono o disacárido hasta cadenas que contienen más de 100 residuos. La estructura y ramificación de éstas últimas puede ser muy diversa, siendo función de las distintas formas anoméricas y de las posiciones de substitución. La gran variabilidad observada es una consecuencia de ésto último.

Oligosacáridos de distinto tipo pueden coexistir sobre una misma cadena polipeptídica. Además, el grado de glicosilación puede variar desde 0,5% en los colágenos hasta 85% en las glicoproteínas determinantes de los grupos antigénicos. Los pesos moleculares de las glicoproteínas también pueden ser muy diversos; se conocen ejemplos que varían entre 15.000 y más de un millón.

Las glicoproteínas en la naturaleza están ampliamente distribuidas y se encuentran en todos los organismos vivientes, con la posible excepción de las bacterias, aunque se ha descrito un caso en *Halobacterium salinarium* en el cual el componente más importante de la superficie celular es una glicoproteína que tiene características estructurales y biosintéticas similares a las glicoproteínas de eucariotes (8).

Las glicoproteínas se encuentran en células en distintas formas, ya sea solubles o unidas a membranas como así también en fluidos extracelulares o en matrices intracelulares (9). Estas incluyen enzimas, inmunoglobulinas, proteínas transportadoras, hormonas, toxinas, lectinas y proteínas estructurales. En la tabla 1 se presenta una serie de glicoproteínas con sus funciones características y sus fuentes naturales.

Tabla 1

Distribución y función de algunas proteínas. (9)

Glicoproteína	Fuente	Peso molecular	Contenido en carbohidrat %
<u>Enzimas</u>			
Fosfatasa alcalina	hígado de ratón	130.000	18
Bromelina	ananá	33.000	36
Carboxipeptidasa Y	levadura	51.000	17
<u>Hormonas</u>			
Gonadotrofina coriónica	orina humana	38.000	31
Eritropoietina	orina humana	34.000	29
<u>Lectinas</u>			
Papa	papa	50.000	50
Semilla de soya	semilla de soya	120.000	6
<u>Constituyentes de membrana</u>			
Glicoforina	eritrocitos humanos	31.000	60
Hemaglutinina	virus de influenza	210.000	25
Rodopsina	retina bovina	40.000	7
<u>Glicoproteínas del suero</u>			
Inmunoglobulina IgG	suero humano	150.000	10
Tiroglobulina	tiroides de ternero	670.000	8
Protrombina	suero humano	72.000	8
<u>Glucoproteínas Estructurales</u>			
Colágeno	piel de rata	300.000	0,4
<u>Otras</u>			
Interferón	leucocitos humanos	26.000	20

1.2. Clasificación y tipos de enlace

Numerosos han sido los intentos de clasificación a medida que se avanzó en el conocimiento de la química y la bioquímica de este tipo de compuestos.

Al principio estuvieron basadas sobre las características físicas de las mucinas, luego sobre la química de los azúcares componentes y finalmente sobre detalles estructurales del grupo carbohidrato de muchos miembros de esta clase de productos naturales.

Como una de las características estructurales más importantes de las glicoproteínas es el enlace covalente entre la porción glicosídica y la cadena polipéptidica, J. Montreuil (28) basa su clasificación de glicósidos en el tipo de unión entre el azúcar y la aglicona. En base a esto y siguiendo la clasificación clásica de los glicéridos, los glicoconjugados se pueden dividir en cuatro grandes grupos: O-glicosídicos, N-glicosídicos, S-glicosídicos y C-glicosídicos (fig. 1). Cuando la aglicona es un lípido el glicoconjugado se denomina glicolípido y si es una proteína, glicoproteína. Si bien aún no se han descrito glicoproteínas con uniones S-glicosídicas y C-glicosídicas, no se descarta su existencia.

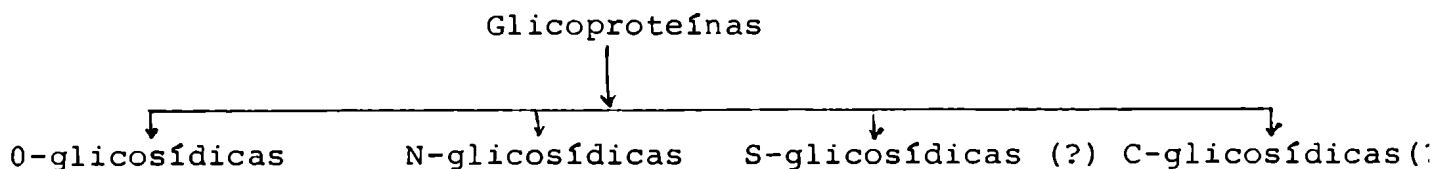


Fig. 1: Clasificación de glicoproteínas según el tipo de enlace entre el azúcar y la proteína.

Ya se han descrito varios tipos de uniones glicopeptídicas y en los últimos años se ha desarrollado la metodología para su identificación. En todos los casos las uniones involucran el C1 del residuo más interno de la unidad del carbohidrato y un grupo funcional de un amino ácido en la cadena peptídica.

Los diferentes tipos de enlace varían en su estabilidad al tratamiento ácido y alcalino. Las uniones O-glicosídicas difieren marcadamente en su sensibilidad al alcali; y se pueden dividir en dos grandes grupos: unión alcali lábil, que es la que se rompe por tratamiento con NaOH (0,05-0,5 N) de 0 a 45° C durante 15 a 216 horas (10) y unión alcali estable, que es la que resiste este tratamiento. Esta es una división netamente empírica y operacional.

Dentro de las uniones alcali lábiles se encuentran aquellas en las cuales los amino ácidos involucrados son la serina o la treonina y los azúcares pueden ser N-acetilgalactosamina, xilosa, galactosa, manosa o abecuesa. La ruptura involucra una reacción conocida como β eliminación y se hace en presencia de BH_4Na para evitar la degradación oxidativa o "peeling off" (11).

Dentro de las uniones alcali estables se han descrito dos grupos: la unión O-glicosídica de galactosa a hidroxilisina y la de arabinosa a hidroxiprolina. La unión galactosa a hidroxilisina resiste un tratamiento con NaOH 2N, a 105° C, durante 24 horas, la parte proteica, en cambio, se degrada (11).

La unión N-glicosídica es relativamente estable a ácidos suaves (ClH 2N a 100° C durante 12 a 20 minutos), pero se hidroliza bajo condiciones drásticas; es estable al tratamiento alcalino suave, pero no bajo condiciones alcalinas fuertes (en presencia

de BH_4Na para proteger el extremo reductor del oligosacárido). Una mezcla de NaOH 2N, BH_4Na 2M, a 80°C durante 16 horas por ejemplo hidroliza el 75% (11). Esta unión glicosilamina involucra la N-acetilglucosamina y el grupo amido de la asparagina (fig. 2) y es la única comunicación de este tipo descrita hasta el momento.

UNION	ESTRUCTURA	FUENTE
<p>N-Glicosídica β-N-Acetilglucosamini- asparagina (GlcNAc-Asn)</p>		<p>ampliamente distribuido en animales, plantas, microorganismos</p>
<p>O-Glicosídica α-N-Acetilgalactosamini- serina/treonina (GalNAc-Ser/Thr)</p>		<p>Glicoproteínas de distintos fuentes animales marinos</p>
<p>Xilosi-serina (Xyl-Ser)</p>		<p>Proteoglicanos eritrocitos humanos</p>
<p>Galactosi-hidroxilisina (Gal-Hyl)</p>		<p>Colágenos</p>
<p>L-Arabinosi-hidroxiprolina (Ara-Hyp)</p>		<p>Glicoproteínas en plantas y algas</p>

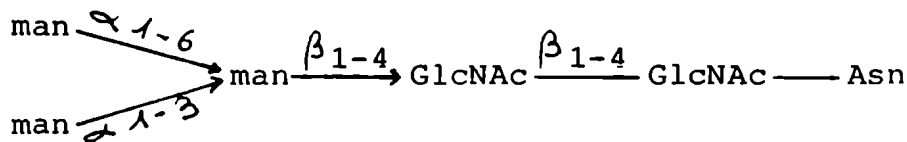
Fig. 2: Distintos tipos de uniones glicopeptídicas (9).

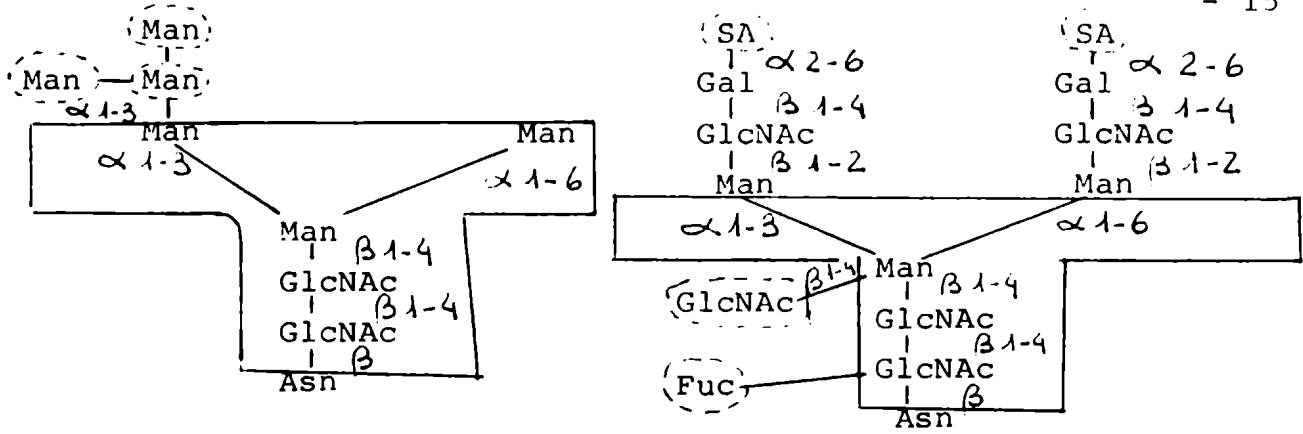
1.3. Estructuras de oligosacáridos unidos a glicoproteínas.

Los únicos que vamos a tratar son los que aparecen en la unión de tipo N-glicosídico. Los oligosacáridos N-glicosídicos se pueden dividir en tres grupos: los del tipo oligomanosídico o de "alta manosa", los de tipo N-acetilactosamínico o "complejo" y los de tipo mixto o "híbrido". Los oligosacáridos correspondientes al primer tipo están formados exclusivamente por residuos N-acetilglucosamina y manosa; los pertenecientes a los otros dos poseen además residuos adicionales: ácidos siálicos, galactosa y fucosa. Una misma glicoproteína puede tener simultáneamente oligosacáridos pertenecientes a más de uno de los tres grupos mencionados.

En la figura 3 se pueden ver esquematizadas las principales características estructurales de los oligosacáridos de tipo "alta manosa" y "complejo". Estas representaciones son solo esquemas idealizados, en la realidad se presentan con frecuencia casos mucho más complicados.

Un rasgo característico de estos N-glicosiloligosacáridos es la presencia de una estructura común a los tres grupos llamada "core" o núcleo, formada por cinco azúcares con la siguiente estructura:





Tipo A

Tipo B

Fig. 3: Tipos de oligosacáridos presentes en glicoproteínas.

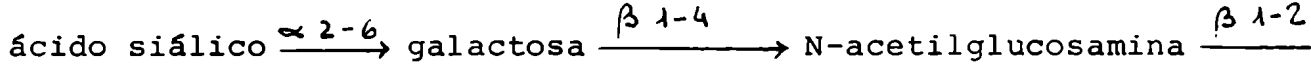
A: oligosacáridos tipo "alta manosa".

B: oligosacáridos tipo "complejo".

Los residuos rodeados por círculos punteados están presentes solo en algunos casos; el "core" está limitado por líneas de trazo lleno (12).

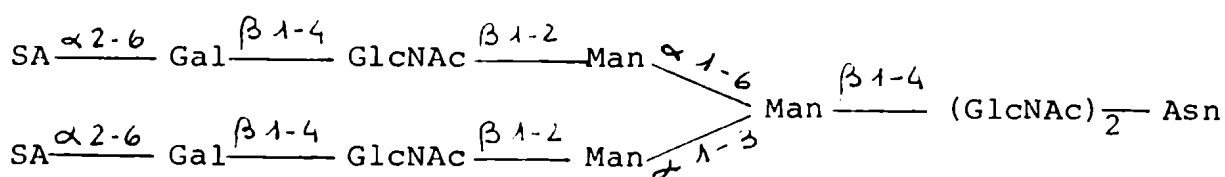
1.3.1. Oligosacáridos de tipo "complejo".

En los oligosacáridos de tipo complejo, o también llamados tipo N-acetilactosamina, puede haber ramificaciones llamadas "antenas" unidas al "core". La composición y estructura de estas "antenas" puede variar, por unidad de "core", lo mismo que su número, que puede ser 2, 3, o 4 . La estructura más común de las antenas es la siguiente:

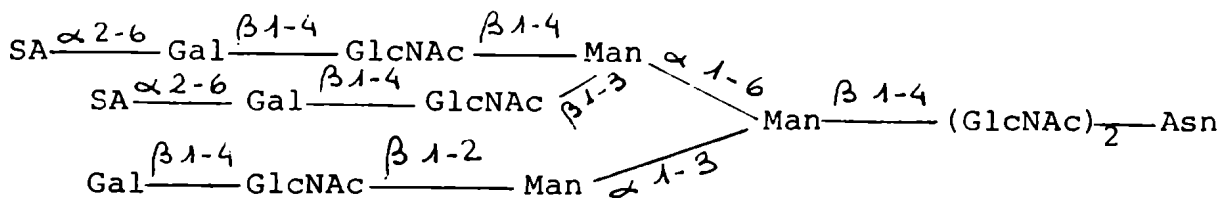


Pero puede carecer de residuos de ácido siálico o galactosa. La fucosa está generalmente unida al residuo N-acetilglucosamina más interno. La figura 4 muestra algunos ejemplos de este tipo.

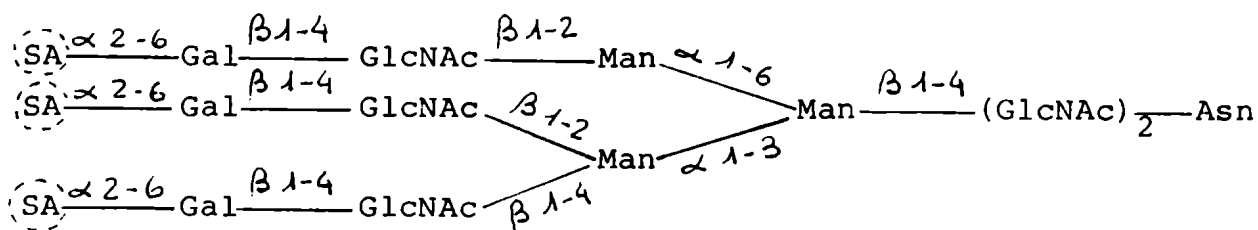
I)



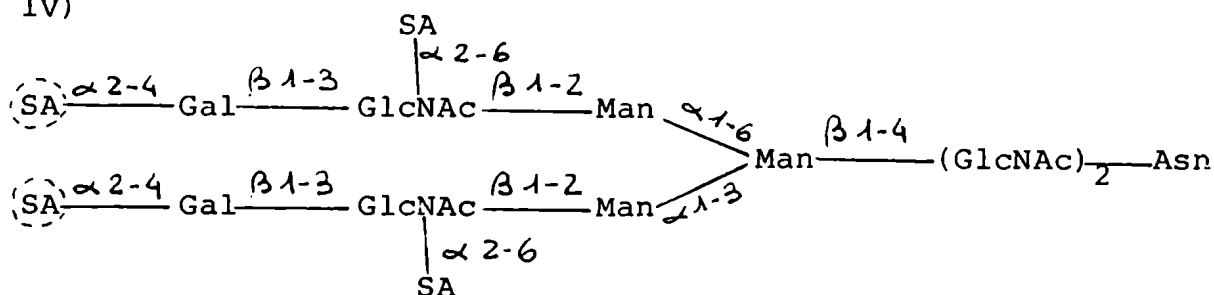
II)



III)



IV)



V)

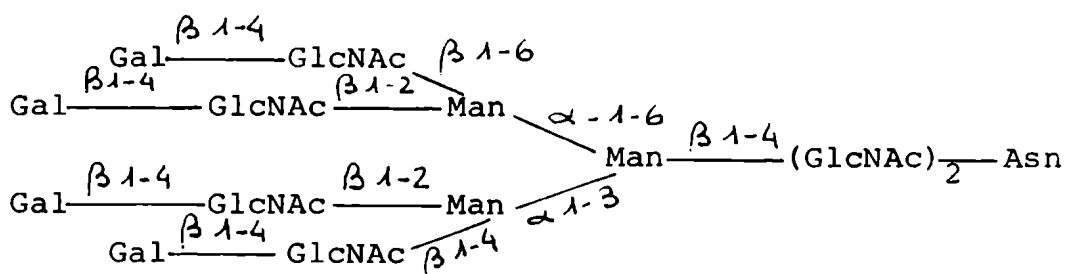


Figura 4: Ejemplos de oligosacáridos de tipo complejo.

Estructuras propuestas para los oligosacáridos de las siguientes glicoproteínas: I) transferrina humana (13), II) subunidad de la tiroglobulina (14, 15), III) glicoproteína α_1 de plasma humano (15), IV) fibronectina (17) y V) asialoglicanos de la glicoproteína ácida α_1 (18).

1.3.2. Oligosacáridos de tipo "alta manosa"

Con respecto a los oligosacáridos de tipo "alta manosa", están formados por numerosos grupos manosilos unidos en configuración \propto al "core" común.

Como ejemplo en la figura 5 se muestra la porción carbohidrato del manano de la levadura. Se puede ver una región interna formada por 12 manosas llamadas "inner core" (I) y una región perisférica o "outer core" (II) que puede elevar este número hasta 100 ó 150 residuos. Pero se han descrito también estructuras más sencillas, como la de la lectina de soja (III).

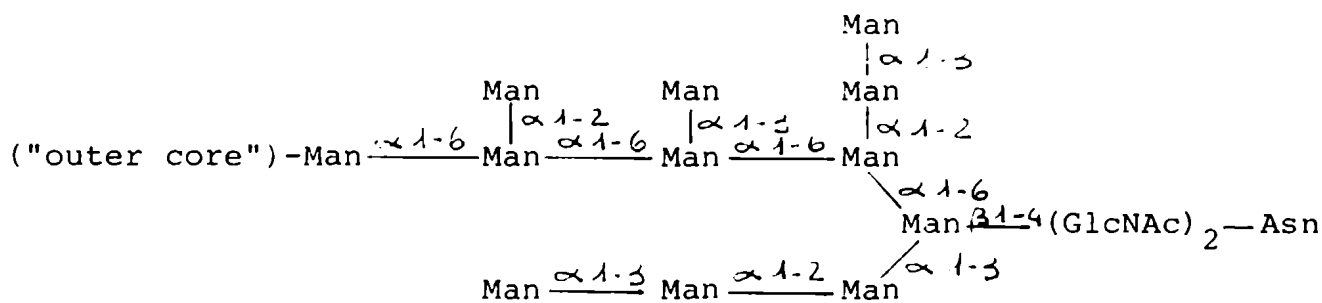
1.3.3. Oligosacáridos de tipo "híbrido".

Se han descrito recientemente varias estructuras que se han llamado híbridas pues contienen ramificaciones características del tipo alta manosa y del complejo. A este tipo, llamado también N-oligosacáridos mixtos, pertenecen los glicopéptidos obtenidos de la rodopsina bovina (22), ovoalbúmina (23-24-25), IgM humana (26) y en la glicoproteína "banda 3" que es una proteína de transporte aniónico intrínseca de membrana de glóbulos rojos humanos (27).

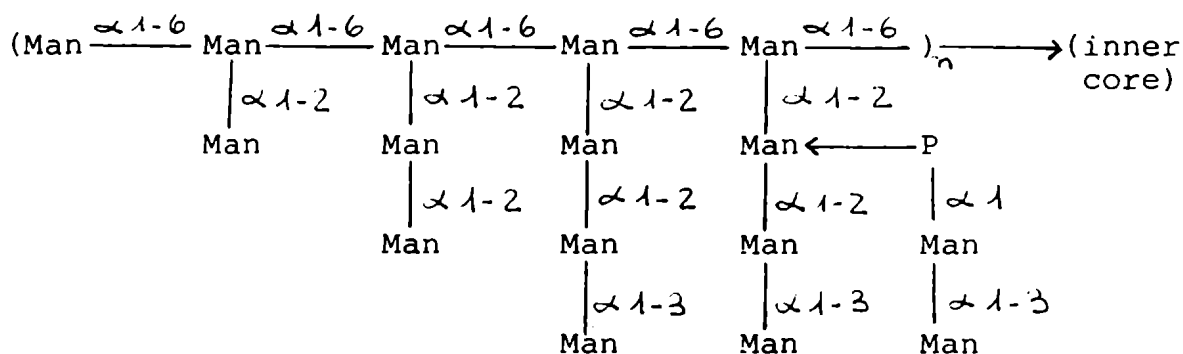
La existencia de este tipo de oligosacáridos ha llevado a postular nuevas generalizaciones sobre las rutas de biosíntesis de los N-oligosacáridos que han permitido explicar, en parte, la enorme diversidad estructural que presentan estos compuestos.

Algunos ejemplos de este tipo de oligosacáridos se pueden ver en la figura 6.

I)



II)



III)

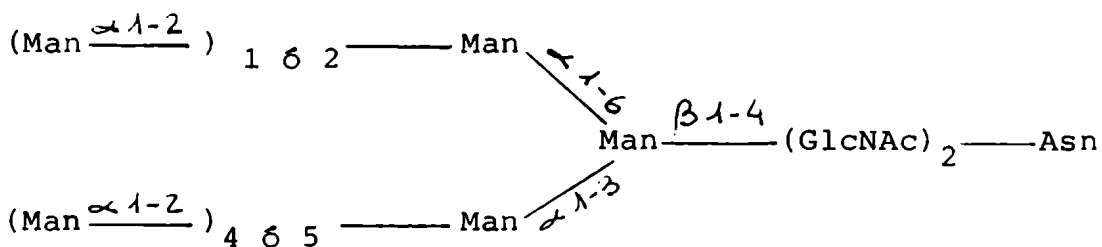


Fig. 5: Ejemplos de oligosacáridos de tipo alta manosa.

Estructuras propuestas para los oligosacáridos de las siguientes glicoproteínas: I. inner core de la manoproteína de *Saccharomyces cerevisiae* (19, 20), II. "outer core" de la manoproteína de *Saccharomyces cerevisiae* (18, 19) y III. lectina de soya (21)

1.4. Biosíntesis de glicoproteínas.

1.4.1. Generalidades.

Las cadenas polipeptídicas de las glicoproteínas son sintetizadas por el mismo camino que las proteínas no glicosiladas, es decir su estructura está bajo el control directo del código genético. Como resultado todas las moléculas de una dada proteína son idénticas. En contraste, oligo y polisacáridos ya sea libres o unidos a proteínas, no son productos primarios de genes, sino que son sintetizados por enzimas conocidas como glicosiltransferasas.

De aquí la microheterogeneidad observada en la parte carbohidrato de las glicoproteínas. Por ejemplo la cadena de carbohidrato de preparaciones de ovoalbúmina purificada mostró ser una mezcla de nueve diferentes estructuras unidas a la misma posición del esqueleto del polipéptido (28). Esta microheterogeneidad trae como consecuencia problemas en la purificación y caracterización de glicoproteínas. Debido a ello es que en general el material que se utiliza para estudios estructurales consiste en glicopéptidos obtenidos por degradación exhaustiva de las glicoproteínas con enzimas proteolíticas. Estos glicopéptidos son luego purificados por cromatografía, electroforesis, o cromatografías de afinidad con lectinas inmovilizadas y su análisis conduce a las estructuras mostradas en la sección 1.3.

1.4.2. Glicosiltransferasas.

Las glicosiltransferasas están clasificadas de acuerdo al azúcar transferido, por ejemplo, sialiltransferasas o galactosiltransferasas. Ellas actúan en secuencia, es decir, el producto de una sirve como sustrato para la siguiente.

Esta adición "paso a paso" de los distintos azúcares está determinada por la especificidad de las diferentes transferasas involucradas.

Hasta 1970 se creía que todas las unidades carbohidrato de las glicoproteínas eran sintetizadas por la transferencia directa de monosacáridos de los nucleótidos azúcares respectivos a las cadenas oligosacarídicas crecientes unidas a polipéptidos, como es el caso de los oligosacáridos unidos a serina, treonina e hidroxilisina (29).

1.4.3. Lípidos intermediarios.

Un avance importante en este estudio se hizo cuando se comprobó que en estos sistemas también pueden intervenir "lípidos intermediarios".

Estos compuestos habían sido ya descriptos en procariotes, donde participaban en la biosíntesis del lipopolisacárido y de la mureína, ambos componentes de la pared bacteriana (30-31-32)

En ese momento se demostró que consistían en un poliprenol unido por intermedio de un enlace di o monofosfato a un resto glicosílico (33) Figura 7.

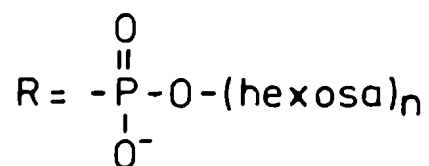
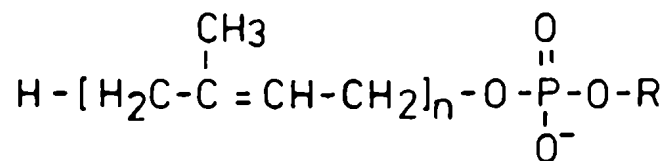
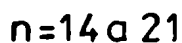
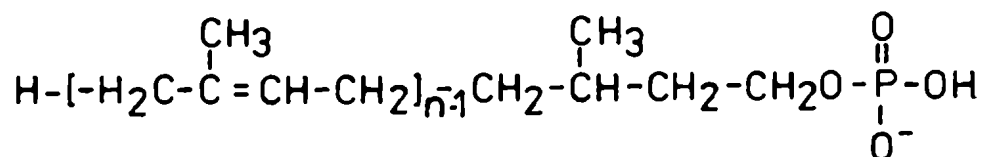


Figura 7: Estructura general de los pren-il-fosfo-azúcares descritos en bacterias.

De estos resultados surgió la posibilidad de que también en células superiores existieran vías de glicosilación análogas.

Las primeras comunicaciones que dan cuenta de la existencia de este tipo de compuestos en eucariotes datan de 1969 (34-35-36-37-38). Se describió que con preparaciones enzimáticas particu-ladas de diferentes tejidos era posible transferir parte de la mar-ca de GDP-(¹⁴C)manosa a una fracción soluble en solventes orgá-nicos. Estos compuestos formados fueron extremadamente sensibles al ácido pero resistentes a tratamiento alcalino suficiente para clivar acilglicéridos.

Anteriormente, Morton y Hemming habían caracterizado en te-jidos animales un poliprenol de cadena larga que denominaron dolicol (39) cuya estructura es la siguiente:



En 1970 Behrens y Leloir encontraron que fracciones microsomas de hígado catalizaban la transferencia de glucosa (^{14}C) de UDP- (^{14}C)glucosa a un aceptor lipídico y conociendo la presencia en tejidos animales de dolicol decidieron aislar este poliprenol de hígado de cerdo por el método de Burgos (39) y fosforilarlo químicamente usando tricloroacetointrilo como agente condensante (40-41). El aceptor lipídico de glucosa resultó ser idéntico al compuesto obtenido por fosforilación química del dolicol (42).

Mientras los poliprenoles hallados en bacterias están compuestos por 10-12 residuos isoprenos, los correspondientes a eucariotes varían entre 17 y 21 en tejidos animales y entre 14 y 24 en hongos y plantas. Sin embargo la diferencia más importante entre los poliprenoles de procariotes y eucariotes no es la longitud de cadena sino el hecho de que el residuo isopreno α está saturado, lo que le confiere al oxhidrilo alcohólico y por lo tanto a sus ésteres fosfóricos propiedades diferentes y típicas del dolicol de hígado (43). Debido a ello, el nombre trivial de dolicol se ha extendido actualmente a todos aquellos poliprenoles que comparten esta característica.

Análogamente a lo que ocurre con los prenifosfoazúcares de bacterias, los dolico-fosfo-azúcares conocidos son lábiles a la hidrólisis ácida suave (ClH 0,01N durante 10 minutos a 100°C) liberando el resto azúcar.

Hoy en día se conocen derivados de dolicolfosfato con glucosa (42), manosa(44), xilosa (45) y galactosa (46) y de dolicol difosfato con N-acetilglucosamina (47-48) y con N-acetilmanosamina (49).

Se ha propuesto que otro poliprenol ciclizado, el retinol fosfato o vitamina A-fosfato (fig. 8) puede estar involucrado en

la glicosilación de proteínas de mamíferos. Se conocen derivados con galactosa (50) y con manosa (51-52). No nos vamos a ocupar de ellos.

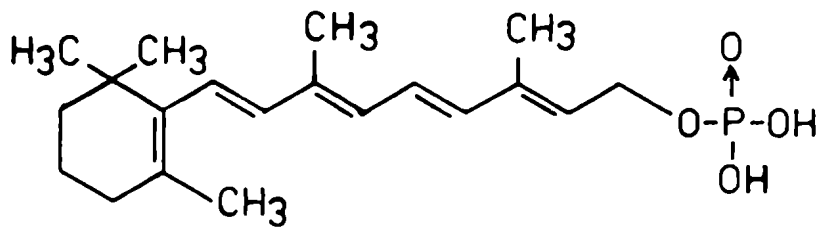


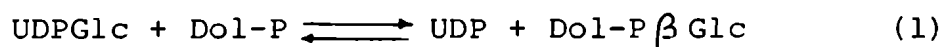
Figura 8: Estructura del retinol fosfato.

1.4.3.1. Dolicol monofosfato azúcares.

a) Dolicol monofosfato glucosa:

Como se señaló en la sección 1.4.3., Behrens y Leloir encontraron que incubando uridina difosfato (^{14}C)glucosa con preparaciones de microsomas de hígado en presencia de Mg^{++} , se formaba un compuesto marcado con (^{14}C)glucosa soluble en solventes orgánicos. El UDP o el EDTA inhibían la reacción. Usando como sustrato (β ^{32}P)UDPGlc se comprobó que lo que se transfería era la glucosa y no glucosa 1-fosfato. El aceptor lipídico de glucosa era el dolicol fosfato (42). A este nuevo compuesto formado se lo llamó dolicol fosfato glucosa; era lábil al ácido y dio 1,6 anhidroglucosa por tratamiento alcalino. Esta última propiedad se tomó como indicio de que la unión glicosídica entre el dolicol fosfato y la glucosa era β . Esto último fue confirmado por Hercovics, quien sintetizó Dol-P α Glc y Dol-P β Glc y encontró que sólo este último producía 1,6 anhidroglucosa cuando se calentaba 30 minutos a (60-90)°C en presencia de NaOH 0,1 N (53).

En base a estos resultados, se postuló que los microsomas de hígado contenían una enzima que catalizaba la siguiente reacción:



La formación de Dol-P-Glc ha sido detectada en muchos organismos: cerebro de rata y pollo (44-54), páncreas de ternero (53), fibroblastos de ratón (55), reticulocitos de conejo (56), protozoarios (57), insectos (58), levaduras (59-60) y plantas (61-62-63).

La enzima que catalizaba la formación de Dol-P-Glc está unida a membrana y la fracción más activa en hígado es la membrana microsomal lisa (63).

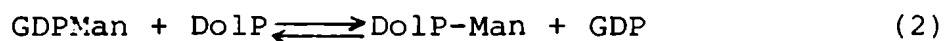
La cantidad de Dol-P-Glc formado es proporcional dentro de ciertos límites a la de Dol-P añadido. Es por ello que la reacción

(1) se usa como un método para medir DolP. Se encontró más tarde que este método no es del todo específico ya que se pueden usar otros poliprenol fosfatos como sustratos en lugar del DolP: por ejemplo el ficaprenol fosforilado químicamentees también activo aunque mucho menos que el DolP. Otros poliprenol fosfatos son también activos y llevaron a la síntesis de sus respectivos glucolípidos (65).

Mankowski y colaboradores realizaron estudios utilizando otros poliprenol fosfatos como aceptores de azúcar y encontraron que el requerimiento estructural más importante fue la saturación del residuo isopreno. La longitud de la cadena del poliprenol y la configuración cis-trans de la doble unión fueron menos importantes. Esto fue una regla para la formación de lípido azúcares conteniendo manosa, glucosa, N-acetilglucosamina a partir de sus correspondientes nucleótido azúcares (64-65)

b) Dolicol-mono fosfato manosa:

La enzima que cataliza la siguiente reacción fue encontrada en una gran variedad de tejidos de mamíferos y en algunos microorganismos.



La reacción requiere Mg^{++} como catión divalente. Fue descrita por primera vez en el cerebro e hígado de rata (44).

El producto de la reacción 2 ha sido estudiado por diferentes autores y caracterizado por Jeanloz y colaboradores (66-67-68). Fue confirmada la configuración β anomérica de la manosa en el Dol-P-manosa por tratamientos químicos y enzimáticos (69-70-71).

c) Dolicol monofosfato xilosa.

La síntesis de este compuesto fue llevada a cabo por Waechter (72) por incubación de UDP xilosa con microsomas de oviducto

de gallina. La reacción fue estimulada por DolP exógeno e inhibida por UDP. No ha sido todavía determinado si está involucrada una enzima específica o el compuesto es formado por la enzima que hace normalmente Dol-P-Glc. Esto último parece probable ya que la D-xilosa difiere de la D-glucosa en que posee un H en vez de CH₂OH en la posición 5. Por otra parte la xilosil transferasa involucrada en la unión de xilosa a serina en el condroitín sulfato parece usar UDP-xilosa como sustrato, y no un lípido intermediario (267).

d) Dolicol monofosfato galactosa:

Fueron muchos los intentos realizados para sintetizar este compuesto a partir de UDP-galactosa y DolP usando preparaciones enzimáticas de distintas fuentes (microsomas de hígado y de cerebro de rata (44-54), cerebro de pollo (73), linfocitos humanos (74), membranas de fibroblastos de ratón (75), oviducto (72) y membranas de páncreas de rata (76). Todos ellos dieron resultados negativos. En otros trabajos (77-78) no se identificó el azúcar del producto de reacción. Zatta y colaboradores (79) supone que la falla en la obtención de dolicol-P-galactosa se debe a la presencia de pirofosfatasas que degradan rápidamente el UDP(¹⁴C) galactosa usado como sustrato. Ellos reportaron la transferencia de galactosa de UDP-galactosa a aceptores lípidicos endógenos en microsomas de hígado; usaron ATP en la mezcla de incubación como inhibidor de pirofosfatasas. El lípido galactosa obtenido tuvo las propiedades esperadas para el dolicol fosfato galactosa. No todos los resultados negativos fueron debidos a la presencia de las pirofosfatasas en la mezcla de incubación ya que en algunos casos el 80% del nucleótido azúcar original estaba presente todavía al final de la incubación (75).

Cuando se incubaron cortes de tiroides de carnero con (¹⁴C)

glucosa o (^{14}C) manosa (80) se encontró marca de (^{14}C) galactosa en glicolípidos pero éstos no eran lábiles al ácido.

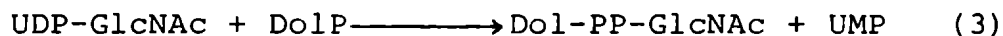
Romero y colaboradores sintetizaron Dol-P(^{14}C)Gal a partir de UDP(^{14}C)gal y DolP utilizando como fuente enzimática células bacterianas de *Acetobacter xylinum*. Estas bacterias utilizan in vivo undecaprenol fosfato como aceptor (46).

1.4.3.2. Dolicol difosfato azúcares.

a) Dolicol difosfato monosacárido y oligosacáridos sin glucosa.

Se conocen una serie de compuestos del dolicol difosfato; ellos involucran desde aquellos que contienen un solo azúcar hasta 14 residuos oligosacárido Glc_3 .

Cuando se usa UDP-GlcNac como dador y Dol-P como aceptor, el azúcar fosfato se transfiere para dar Dol-PP-GlcNac (81). Un catión divalente (Mg^{++} ó Mn^{++}) es necesario para que la reacción ocurra:

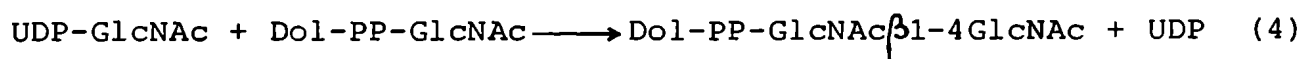


La identificación definitiva del producto de reacción la efectuó Warren y Jeanloz por comparación con standards preparados por métodos químicos (82).

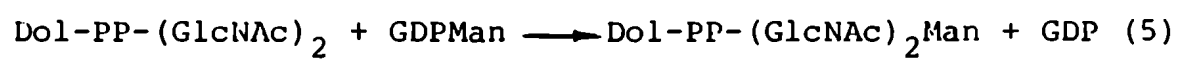
Esta reacción es inhibida en forma específica por el antibiótico tunicamicina como veremos más adelante.

En una etapa posterior se puede adicionar una segunda molécula de GlcNac para dar Dol-PP-(GlcNac) $_2$. El disacárido formado fue identificado como N-acetilglucosaminil β 1-4 N-acetilglucosamina o NN'-diacetilquitobiosa (12). El dador de esta segunda molécula de GlcNac fue el UDP-GlcNac y no el Dol-PP-GlcNac (81).

La reacción se puede esquematizar de la siguiente forma:



La siguiente reacción es la transferencia de manosa a partir de GDPMan para dar un dolicol difosfato trisacárido como se muestra en la reacción 5 (83).



Esta manosa tiene configuración β .

Desde los primeros experimentos del grupo de Leloir se había observado que si se incuban microsomas de hígado con GDP(^{14}C)man o Dol-P-(^{14}C)man se observa la incorporación de radioactividad en dolicol difosfato oligosacáridos (84). Como se ve en la fig. 9 son 9 las manosas que entran. Hay 3 tipos de evidencias que indicarían que las cinco primeras manosas (números 1 al 5 en la fig. 9) son añadidas directamente a partir de GDP-manosa y el resto probablemente a partir de DolP-manosa. La primera de ellas es que en presencia de EDTA en la mezcla de incubación, el cual compleja el Mg^{++} requerido para la formación de DolPMan, y usando GDPMan como dador se obtiene un dolicol difosfato oligosacárido conteniendo cinco manosas (85-86). Como ya señalamos antes salvo la primera manosa transferida que tiene configuración β las otras son todas α (12). La otra línea de evidencias la provee una línea celular de mutantes de linfoma de ratón, Thy 1-E, la cual se sabe que es defectiva en la formación de dolicol fosfato manosa, en este caso también se observó la acumulación de un lípido oligosacárido conteniendo las mismas cinco manosas. La tercera evidencia es la solubilización y purificación parcial de una manosil transferasa que cataliza la transferencia de manosa de GDPMan a un aceptor lipídico exógeno para dar un compuesto conteniendo cinco manosas en el cual la manosa agregada está unida en una posición α 1-2. Esta manosa está indicada con el número 5 en la fig. 9 (87).

Chapman y colaboradores estudiaron la biosíntesis de oligosacáridos ligados a lípido. Para ello incubaron células de ovario de hamster con (^3H)manosa. Extrajeron los oligosacáridos ligados a lípido y liberaron los oligosacáridos por hidrólisis ácida suave. Obtuvieron una familia de oligosacáridos que contenía de 1 a 8

residuos manosa unidos a NN'-diacetilquitobiosa. Cada oligosacárido fue aislado y su estructura fue analizada revelando que para cada tamaño había un isómero predominante. Debido a esto concluyeron que la adición de residuos manosa al dolicol-PP-(NAcGlc)₂ era altamente ordenada y que primero se añadían las manosas en la rama 1--3 y luego en la rama 1--6. En la fig. 9 se muestra el orden de adición de manosas propuesto por Chapman y colaboradores (88).

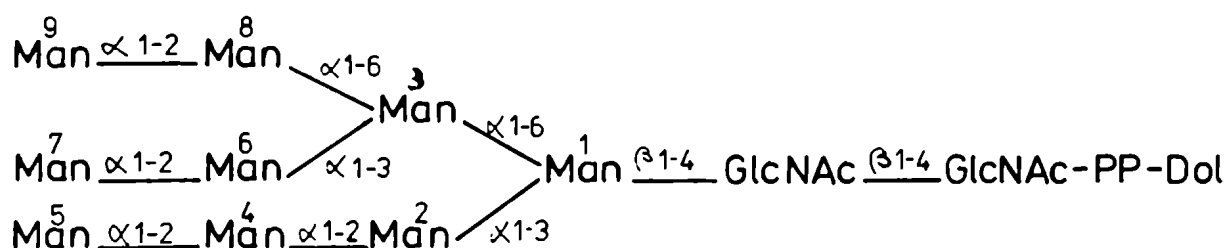


Figura 9: Estructura y orden de adición de los residuos manosa en el Dol-PP-oligosacárido.

El número colocado arriba de las manosas indica el orden de adición.

b) Dolicol difosfato oligosacáridos con glucosa:

Como ya se señaló, hace aproximadamente doce años se encontró que el UDP-Glc transfería la glucosa al dolicol fosfato para dar dolicolfosfato glucosa (42).

Se encontró más tarde que el dolicolfosfatoglucosa reaccionaba con aceptores endógenos presentes en la preparación de microsomas de hígado para dar otro compuesto llamado aceptor endógeno glucosilado o GEA (89). Esta reacción no requirió cationes divalentes. En un primer momento se creyó que este compuesto era una proteína por sus propiedades de ser insoluble en solventes lipídicos y ser precipitado por ácido tricloroacético (42).

Posteriormente se comprobó que el GEA podía ser extraído del material precipitable con TCA con una mezcla de cloroformo: metanol: agua (1:1:0,3 solvente 1103) (89). Este solvente resultó ser muy útil debido a que por sus propiedades permitía solubilizar compuestos de naturaleza anfipática. Este hallazgo sirvió para determinar la naturaleza lipídica del aceptor endógeno descubierto en microsomas de hígado y allanó el camino para su estudio posterior.

El GEA, por tratamiento ácido suave (ClH 0,01N, 10 minutos a 100°C), liberaba una sustancia con las propiedades de un oligosacárido, que llamaremos oligosacárido -Glc, o abreviadamente oligosac-Glc, y que contenía por lo menos dos glucosas por mol. (91)

Si el tratamiento ácido suave se lleva a cabo en presencia de metanol, se formaba el metilglicósido del oligosacárido, el cual tratado posteriormente con alcali (NaOH 2N a 100°C) dio lugar a la aparición de dos cargas positivas que se atribuyeron a la deacetilación de dos residuos hexosamina (91).

La existencia del puente pirofosfato en el GEA se dedujo de su comportamiento en columnas de DEAE celulosa y de la susceptibilidad de sus productos de degradación alcalina a la hidrólisis con fosfatasas (89). Debido a estas propiedades al GEA lo vamos a llamar Dol-PP-oligosac-Glc.

Spiro y colaboradores realizaron estudios posteriores incubando cortes de tiroides de ternero con monosacáridos radioactivos y aislaron el Dol-PP-oligosacárido. Llegaron a la conclusión de que N-acetilglucosamina, manosa y glucosa formaban parte del mismo compuesto. Marcando con (^3H)ac mevalónico, (^{32}P)fosfato y (^{14}C) glucosa, obtuvieron un glicolípido con las tres marcas (92). Estimaron la siguiente composición para la parte oligosacáridica: manosas 11, N-acetilglucosaminas 2, y glucosas 1,5. Mostraron también que uno de los residuos glucosamina estaba en el extremo reductor (92).

1.4.4. Estructura del oligosacárido-Glc.

En 1978 Kornfeld y colaboradores proponen la estructura que se muestra en la fig. 10. Estos estudios se efectuaron en células de ovario de hamster chino (CHO), infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), incubadas con monosacáridos marcados.

El Dol-PP-oligosacárido fue extraído con solvente 1103 y la estructura de la fracción sacarídica fue determinada mediante análisis por metilación, acetólisis, degradación de Smith, oxidación con periodato y tratamientos con α y β manosidasas (94). La estructura propuesta para dicho oligosacárido fue idéntica a la presentada por Kobata (95) para el oligosacárido aislado del glicopéptido de la tiroglobulina de ternero excepto que en vez de dos glucosas unidas a la rama α 1-3 de las manosas posee tres.

La estructura actualmente aceptada para el oligosacárido

es (NacGlc)₂ Man₉ Glc₃ (fig. 10). De aquí en adelante llamaremos oligosac-Glc₁, oligosac-Glc₂, y oligosac-Glc₃ al oligosacárido con 1, 2, ó 3 glucosas respectivamente.

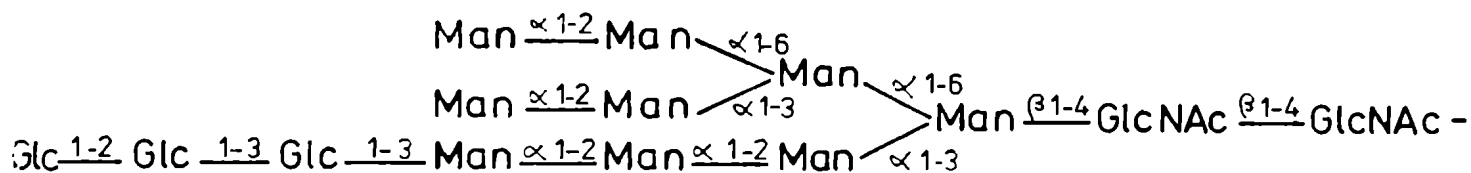


Figura 10: Estructura del oligosac-Glc₃.

La configuración anomérica de las glucosas no ha sido bien establecida pero la mayoría de las evidencias indicarían que es α en los tres casos. Las α y β glucosidasas comerciales no actúan sobre el oligosac-Glc, pero en microsomas de hígado se encontró una glucosidasa que liberaba rápidamente glucosa del oligosac-Glc (96). Estudios de inhibición por disacáridos indicaron que la kojibiosa (glucosil α 1-2 glucosa), inhibía la actividad de esta glucosidasa microsomal sobre el oligosac-Glc₃ y que la nigerosa (glucosil α 1-3 glucosa) y maltosa (glucosil α 1-4 glucosa) inhibían su actividad sobre el oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₁ (96). Ninguno de los β disacáridos probados (soforosa, celobiosa, etc.) fueron inhibitorios.

Usando como inhibidores los p-nitrofenilglucosidos, los resultados no fueron tan claros. Más adelante en la sección de procesamiento del oligosac-Glc se verán más en detalle las propiedades de estas glucosidasas microsomales.

Por otra parte Spiro y colaboradores (97), usando trióxido de cromo para distinguir los anómeros α y β tuvo resultados a favor de la configuración α . Lueg. parecería que por todas las evi-

dencias disponibles las tres glucosas del oligosac-Glc₃ son α . El dador de estas tres glucosas es el dolicol-fosfato-glucosa. (98-99)

Estudios recientes han permitido identificar al Dol-PP-oligosac-Glc en animales (89), plantas (100) y levaduras (60).

1.4.5. Síntesis de Dol-PP-oligosac-Glc.

En resumen, la secuencia de reacciones por las cuales se forma el Dol-PP-oligosac-Glc se conoce como "ciclo del dolicol" (101) y puede agruparse en siete diferentes etapas.

Tal como se muestra en dicho ciclo (fig. 11) la etapa A consiste en la transferencia de N-acetilglucosamina-1-fosfato desde UDP-NAcGlc, al dolicol monofosfato para dar lugar a la formación de dolicol-difosfato-N-acetilglucosamina (reacción 3). La etapa B es la transferencia de N-acetilglucosamina desde UDP-NAcGlc al dolicol difosfato-N-acetilglucosamina para dar dolicol-difosfato-NN-diacetilquitobiosa (reacción 4). A continuación en la etapa C se añaden cinco residuos monosa a partir de GDP-Man para dar dolicol-difosfato NN-diacetilquitobiosa-(manosa)₅. (sección 1.4.3.) La etapa D consiste en el agregado de las cuatro manosas restantes por la acción de transferasas que utilizan como dador al dolicol monofosfato-manosa (ver sección 1.4.3.). En la etapa E se incorporan los tres residuos glucosa, por la acción de transferasas que utilizan como dador al dolicol monofosfato glucosa, para dar dolicol difosfato NN-diacetilquitobiosa-(manosa)₉-(glucosa)₃. La etapa F, que veremos en detalle en la sección 1.4.6., es la transferencia en bloque del oligosacárido completo a la proteína para dar lugar a la formación de la glicoproteína y a la liberación de dolicol difosfato (reacción 6). En la etapa G este dolicol difosfato es hidrolizado mediante una fosfatasa (reacción 7), produciendo

do dolicol fosfato que es usado nuevamente en la etapa A cerrándose de esta forma el ciclo. En este grupo hay que incluir a las enzimas que intervienen en la síntesis del dolicol fosfato a partir de dolicol y CTP (reacción 8) y en su degradación a dolicol y Pi (reacción 9).

Todos estos compuestos son sintetizados por enzimas presentes en la fracción microsomal de extractos de tejidos (101).

Ultimamente se están realizando estudios destinados a solubilizar, purificar, y estudiar las propiedades de todas estas enzimas.

Si bien no se ha podido purificar ninguna de ellas a homogeneidad, se han logrado solubilizar y caracterizar las siguientes:

- a) UDP-D-glucosa-dolicol monofosfato-glucosiltransferasa de *Acanthamoeba castellanii* (102) (reacción 1). Requiere Mg^{++} como catión divalente.
- b) GDP-D-manosa-dolicolmonofosfato-manosiltransferasa de aorta porcina (103) y de *Acanthamoeba castellanii* (104) (reacción 2).
- c) UDP-NACGlucosamina-dolicolmonofosfato-N-acetilglucosamina-1-fosfatotransferasa de *Acanthamoeba castellanii* (105) y de aorta porcina (106) (reacción 3).
- d) Dolicol difosforil oligosacárido-proteína-oligosacariltransferasa de oviducto de gallina (107) (reacción 6). Es la enzima que se logró purificar más (2000 veces). Tiene un requerimiento absoluto por catión divalente (Mn^{++} ó Mg^{++}).
- e) Dolicol-fosfato fosfatasa (reacción 9) y dolicol difosfato fosfatasa (reacción 7) de hígado de rata (108). Ambas son inhibidas por cationes divalentes y junto con la dolicolfosfoquinasa (reacción 8) parecen regular los niveles de dolicol fosfato en células.

1.4.6. Glicosilación de proteínas.

1.4.6.1. Transferencia de los oligosacáridos a proteína:

- a) Requerimientos para que el oligosacárido sea transferido.

Los primeros experimentos de transferencia de dolicol difosfato oligosacárido a proteína fueron llevados a cabo por Leloir y colaboradores usando Dol-PP-oligosac-Glc como dador y proteína endógena de microsomas de hígado como aceptor (109). Más tarde otros Dol-PP-sacáridos fueron probados como dadores. Si bien se encontraron transferencias a proteína usando Dol-PP-oligosacáridos marcados con manosa, conteniendo 5 ó más residuos y probablemente sin residuos glucosa (110, 111, 112) la presencia de glucosa sobre el oligosacárido parece ser necesaria para la transferencia efectiva del oligosacárido (113, 114, 115); la ausencia de residuos glucosa decrece la velocidad de transferencia a la proteína endógena alrededor de 8 veces. La presencia de las manosas donadas por el dolicol monofosfato, es decir de la rama α 1-6 unida a la manosa β 1-4 (ver fig. 9, manosas 6 a 9) no parecen ser necesarias para la transferencia del dolicol derivado a la proteína ya que la remoción de estas manosas por el tratamiento del dolicol difosfato oligosacárido glucosa con α manosidasa no disminuyó la actividad del dador, comparado con un compuesto no tratado. En contraste, el tratamiento del dador con α glucosidasa disminuyó la actividad drásticamente (115).

Además se transfirió a proteína endógena el intermediario lipídico detectado en la mutante de células de linfoma de ratón Thy 1-E. Esta mutante, como ya se señaló en la sección 1.4.3., es defectiva en la formación de dolicol-fosfato manosa y por lo tanto se acumula un lípido intermediario que no posee las cuatro manosas de la rama α 1-6 unida a la manosa β 1-4 (ver fig. 9) (116).

b) Requerimientos de los aceptores proteicos:

La mayoría de los intentos realizados usando como aceptores proteicos a proteínas exógenas nativas dieron resultados negativos. La primera evidencia sobre la participación de lípidos oligosacáridos en la glicosilación de proteínas secretorias fue comunicada por Eagon y colaboradores (117). Ellos sintetizaron la cadena liviana tipo K de la inmunoglobulina libre de carbohidrato utilizando células de mieloma de ratón MOPC-46 desarrolladas en presencia de 2-deoxi-D-glucosa. Pudieron glicosilarla a partir de Dol-PP-oligosacárido y un sistema enzimático del mismo tejido.

Pless y Lennarz probaron como aceptores exógenos varias proteínas desnaturalizadas por sulfitólisis, mostrando que membranas de oviducto de gallina catalizan la transferencia de oligosacárido de lípido oligosacárido a estas proteínas sólo cuando en ellas existía la secuencia Asn-X-Ser (Thr) llamada "sequon" (X puede ser un amino ácido variable) (118).

Estos hallazgos confirmaron y generalizaron los de Marshall (119) quien examinando la secuencia de amino ácidos de muchas glicoproteínas propuso que la presencia de la secuencia de amino ácidos anterior era condición necesaria pero no suficiente para la glicosilación de proteínas N-glicosídicas. Otros factores deben estar involucrados ya que en algunas proteínas como por ejemplo la elastasa y la carboxypeptidasa A contienen más de un sitio de glicosilación potencial, pero no son encontrados en forma glicosilada (118 bis). Lo mismo ocurre con la ovoalbúmina (120) y deoxirribonucleasa (120 bis) que se hallan glicosilados en un sitio único, pero contienen al menos un triplete adicional no glicosilado. Hoy se piensa que muchos factores pueden entrar en juego regulando la glicosilación de proteínas in vivo por ejemplo la presen-

cia y especificidad de transferasas apropiadas, la compartamentación subcelular y las restricciones impuestas por la conformación del polipéptido (118).

1.4.7. Procesamiento del oligosacárido unido a proteína.

1.4.7.1. Introducción.

En los primeros momentos no estaba clara qué función desempeñaban las glucosas en el oligosac-Glc₃, ya que no se conocían glicoproteínas del tipo asparagina con glucosa. Hoy se sabe que una vez transferido a la cadena peptídica el oligosac-Glc₃ sufre una serie de modificaciones que se conocen con el nombre de "procesamiento". Las mismas consisten en la remoción secuencial, por parte de glicosidasas específicas, de todos los residuos glucosa y de algunos de manosa.

La liberación de glucosa durante la transferencia del oligosac-Glc₃ a proteína ya había sido observada en los primeros experimentos in vitro pero su rol fisiológico no fue apreciado (109). Varios grupos de investigadores estudiaron los cambios que sufría el oligosac-Glc₃ luego de ser transferido a proteína (101). Gracias a que elementos nuevos se conjugaron para facilitar esta tarea; entre ellos podemos citar el estudio de ciertas proteínas virales de tipo asparagina, el uso de lectinas para seleccionar mutantes celulares con bloqueos específicos y el descubrimiento de una familia de endoglicosidasas capaces de actuar específicamente sobre la unión NAcGlc-NAcGlc de los oligosacáridos que poseen un "core" de man₃(GlcNAc)₂ unido a lípido o proteína. Esto último permitió simplificar los esquemas experimentales para la detección de los fenómenos de procesamiento. Nos vamos a referir en detalle a estas endoglicosidasas en la sección (1.4.7.2.)

Los primeros indicios sobre una hidrólisis selectiva de

azúcares del oligosacárido transferido a la proteína se obtuvieron en el laboratorio de Robbins (121). Utilizando cultivos de fibroblastos infectados con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) este grupo detectó cambios definidos en los oligosacáridos de la glicoproteína G. Al someter a los cultivos marcados con metionina ^{35}S y manosa ^3H a crecientes períodos de "chase" la porción glicosídica de esta glicoproteína (que inicialmente presentaba características análogas a las del oligosacárido proveniente del precursor lipídico), se transformaba en un compuesto de menor PM. Además, la misma se hacía progresivamente resistente a la acción de la endoglicosidasa H, lo cual indicaba un cambio en su estructura. Experimentos similares en células infectadas con el virus Sindbis condujeron a los mismos resultados (122).

Poco después, los laboratorios de Summer y de Kornfeld obtuvieron nuevas evidencias sobre este proceso. En el primero, infectando células BHK (de riñón de hamster recién nacido) y Hela con el VSV se descubrió la existencia de oligosacáridos N-glicosídicos "precursores" y "maduros". Las formas "maduras" conservaban sólo tres residuos de manosa de los siete o nueve que se asignaban a las formas "precursoras". Además, las formas maduras poseían la típica ramificación en "antenas" de las glicoproteínas de tipo "complejo". Ello fue interpretado como evidencia de que, además de producirse la remoción de una serie de azúcares en las formas "precursoras", había ocurrido un proceso de elongación que detectaba la aparición de las formas "maduras" (123).

En cuanto al grupo de Kornfeld, infectando con el mismo virus células de ovario de hamster chino (CHO), obtuvieron datos experimentales que sustentaban las conclusiones anteriores (124).

Leloir y colaboradores obtuvieron evidencias sobre la

existencia del procesamiento incubando tiroides con glucosa (^{14}C) Ellos observaron que los oligosacáridos obtenidos de las proteínas maduras diferían de los oligosacáridos de los precursores lipídicos no solo en su tamaño, sino también en la proporción de sus azúcares (125).

Antes de seguir con las distintas etapas del procesamiento haremos una breve mención de las endoglicosidasas.

1.4.7.2. Endoglicosidasas.

Existen dos clases de endoglicosidasas capaces de actuar sobre el enlace N-glicosídico unido a asparagina. Las primeras, denominadas de clase I, hidrolizan la unión azúcar-aminoácido o azúcar-peptido, liberando el glicano correspondiente. Su actividad no parece depender de la estructura o tamaño de la porción glicosídica y su utilidad radica en que permiten obtener el oligosacárido completo para la realización de estudios estructurales (126-127-128-129). El segundo tipo, denominado Clase II comprende una serie de enzimas de distintas fuentes llamadas endo-N-acetil β -D glucosaminidasas que actúan sobre la NN'-diacetilquitobiosa que constituye la región proximal de los enlaces N-glicosídicos. Se han descrito cinco enzimas de esta clase (D, H, C_I, C_{II} y L), que presentan distintas especificaciones por determinadas estructuras de la región glicosídica. Por esta razón, estas enzimas han resultado útiles para discriminar entre los diversos tipos de oligosacáridos N-glicosídicos.

La primera de estas enzimas fue encontrada por Tarentino y Maley (130) en extractos de *Streptomyces griseus* y fue llamada endo β -N-acetilglucosaminidasa H porque ésta actúa sobre oligosacáridos del tipo "high mannose" (alta manosa). Un residuo α 1-6 fucosa sobre la N-acetilglucosamina interna suprime su actividad (131)

Esta enzima puede actuar sobre oligosacáridos unidos a proteína o a un residuo asparagina como así también sobre oligosacáridos libres o con la primera N-acetilglucosamina reducida (132).

En la tabla N°2 se presentan las especificidades de las endo- β -N-acetilglucosaminidasas. No obstante vamos a destacar las propiedades más sobresalientes de cada una de ellas. Las endo- β -N-acetilglucosaminidasas D y C_I tienen la misma especificidad. Estas requieren que la manosa α 1-3 de la bifurcación no tenga ningún sustituyente, es decir que esté libre. La manosa α 1-6 en cambio puede estar sustituida o no, la N-acetilglucosamina interna puede estar unida a varios residuos o llevar una fucosa α 1-6.

Las diferencias entre las especificidades de las endo- β -N-acetilglucosaminidasas H y C_{II} son que esta última actúa solo sobre oligosacáridos del tipo alta manosa mientras que la endo- β -N-acetilglucosaminidasa H puede hidrolizar también oligosacáridos sustituidos con N-acetilglucosamina o lactosamina en posición 4 de la manosa α 1-3.

Respecto a la endo- β -N-acetilglucosaminidasa L ésta actúa sobre oligosacáridos de bajo peso molecular tales como (GlcNAc)₂-Asn (133).

Tabla 2: Especificidad de las endo- β -N-acetilglucosaminidasas.

Substitución sobre las manosas del core		Endo- β -N-acetilglucosaminidasas			
Man α 6	Man α 3	Man β 4	Streptomyces grieyuseus Endo H	Diplococcus pneumoniae Endo D	Clostridium perfringens EndoC ₁₁ EndoC ₁
1 { Man α 1-6 Man α 1-3	{ Gal β 1-4 GlcNac β 1-4 GlcNac β 1-2	GlcNac β 1-4	+	-	-
2 { Man α 1-6 Man α 1-3	{ GlcNac β 1-4 GlcNac β 1-2	GlcNac β 1-4	+	-	-
3 { Man α 1-6 Man α 1-3	GlcNac β 1-2	GlcNac β 1-4	+	+	+
4 { Man α 1-6 Man α 1-3	Man α 1-2	ninguno	+	-	+
5 { Man α 1-6 Man α 1-3	ninguno	ninguno	+	+	+
6 Man α 1-6	ninguno	ninguno	+	-	-
7 Man α 1-3	ninguno	ninguno	+	-	-
8 Man α 1-3	Man α 3 ausente	ninguno	+	-	-
9 ninguno	ninguno	ninguno	-	+	-
10 ninguno	Man α 3 ausente	ninguno	-	-	-
11 Man α 6 ausente	Man α 3 ausente	ninguno	-	-	-

1.4.7.3. Etapas iniciales del procesamiento.

Fueron muchos los aportes realizados por los laboratorios de Kornfeld, Schachter y Leloir. Debe destacarse, como ya lo señalamos, que muchos de los intermediarios caracterizados, lo fueron gracias a la utilización de mutantes que poseían bloqueos específicos.

a) Remoción de glucosas.

El primer paso consiste en la remoción de la glucosa terminal del compuesto I (fig. 12) por medio de una glucosidasa específica llamada glucosidasa 3 para dar el compuesto II (fig. 12) (134). El compuesto II luego es degradado por la glucosidasa 2 que hidroliza específicamente las glucosas de los oligosacáridos conteniendo dos y un residuo glucosa para dar los compuestos III y IV respectivamente (134).

Ugalde y colaboradores solubilizaron estas dos glucosidasas de una fracción microsomal de hígado por extracción diferencial utilizando Nonidet P-40 en buffer de baja fuerza iónica para la glucosidasa 2 y el mismo detergente en buffer de alta fuerza iónica para la glucosidasa 3 (135). Ambas glucosidasas fueron obtenidas libres de manosidasas.

También Grinna y colaboradores (136) y Michael y colaboradores (137) trabajando con membranas de hígado de rata y vaca, respectivamente, encontraron dos glucosidasas con la misma especificidad hallada por Ugalde y colaboradores.

Spiro (97) y Michael (137) encontraron que los oligosacáridos a los cuales se les eliminaban las manosas perisféricas con α manosidasa eran pobres sustratos para las glucosidasas.

Al investigar la acción de varios disacáridos sobre las

glucosidasas 2 y 3. Ugalde y col. (96) encontraron que 1 mM de kojibiosa (glucosil 1-2-glucosa) inhibía un 91% la hidrólisis de la glucosa más externa del oligosac-Glc₃, la cual está unida por un enlace α 1-2 (reacción 1, fig. 12). La nigerosa (glucosil α 1-3-glucosa) y la maltosa (glucosil α 1-4-glucosa) inhibían la acción de la glucosidasa 2 sobre el oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₁ (reacción 2 y 3, respectivamente, fig. 12). Otros disacáridos como la soforosa (glucosil β 1-2-glucosa) y celobiosa (glucosil β 1-4-glucosa) no tuvieron ningún efecto inhibitorio sobre las glucosidasas. Se encontró también que la kojibiosa inhibía la actividad de la glucosidasa sobre el oligosac-Glc₃ unido a la proteína indicando que la misma enzima actúa sobre el oligosacárido libre o unido a proteína (96).

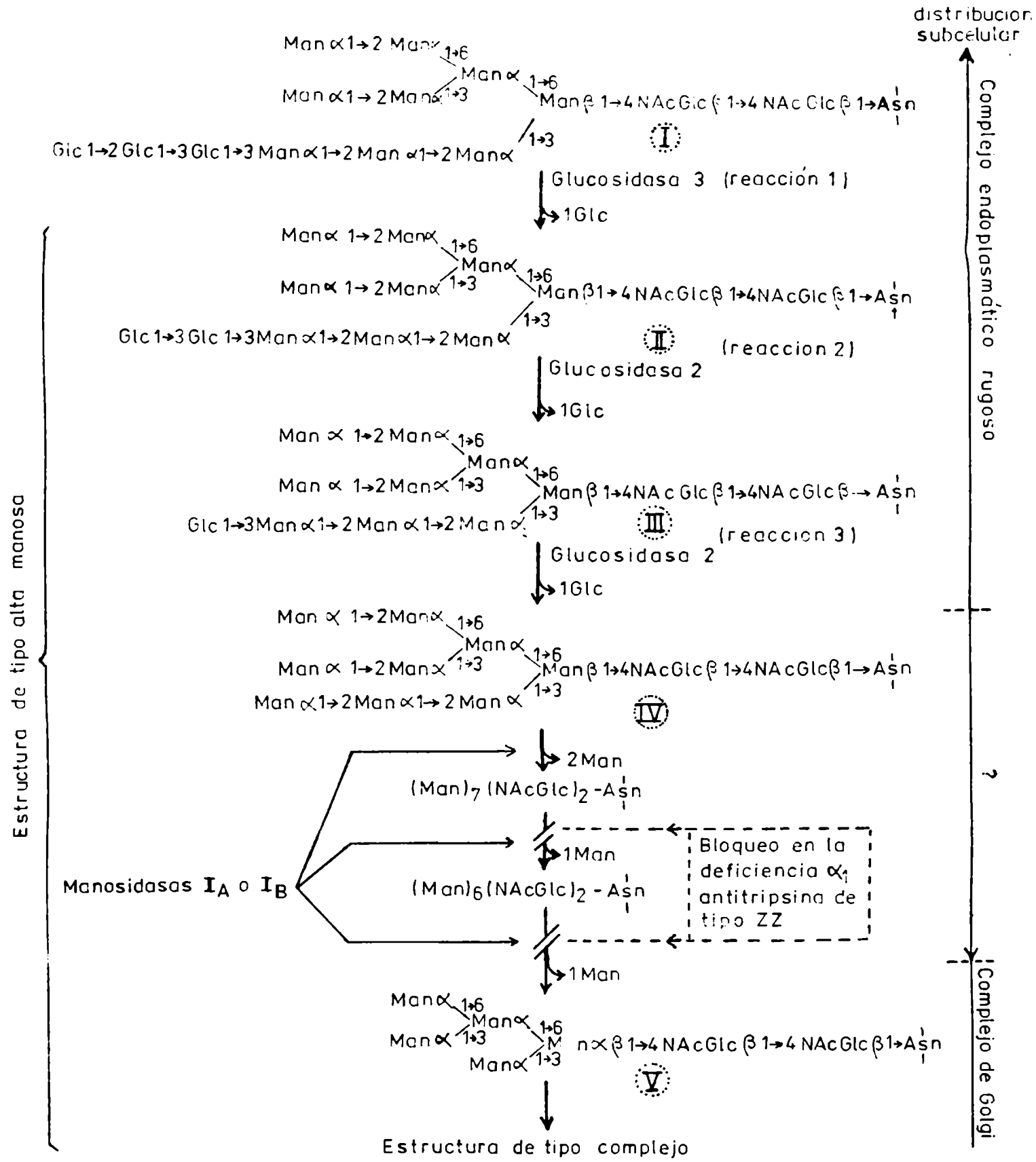


Figura 12: Etapas iniciales del procesamiento.

b) Remoción de manosas.

El siguiente paso del procesamiento es la remoción de los cuatro residuos manosa unidos al oligosacárido en posiciones α 1-2. El producto resultante es el compuesto V (fig. 12).

Se han aislado y purificado dos α manosidasas de membranas de Golgi de hígado. Una de ellas fue aislada por Tabas y Kornfeld (138) y la otra por Touster y colaboradores (139); ambas son efectivas para convertir $(\text{Man})_9\text{NAcGlc}$ en $(\text{Man})_5\text{NAcGlc}$. Estas dos α 1-2 manosidasas son muy similares en sus propiedades catalíticas pero se diferencian usando otros criterios, por ejemplo, comportamiento cromatográfico en columnas de fosfato de celulosa, termolabilidad, actividad hacia $(\text{Man})_5\text{NAcGlc}$ y p-nitrofenil- α -D-manósido. En la actualidad se ha propuesto llamar manosidasa IA a la purificada por Kornfeld y manosidasa IB, a la purificada por Touster (139). No está claro si ambas enzimas actúan indistintamente sobre las cuatro manosas unidas en α 1-2 o si, in vivo, tienen una especificidad más restringida. Del análisis de los productos intermedios obtenidos por acción de estas α 1-2 manosidasas sobre $(\text{Man})_9\text{NAcGlc}$ se dedujo el orden de remoción de manosas mostrado en la Fig. 13 (138).

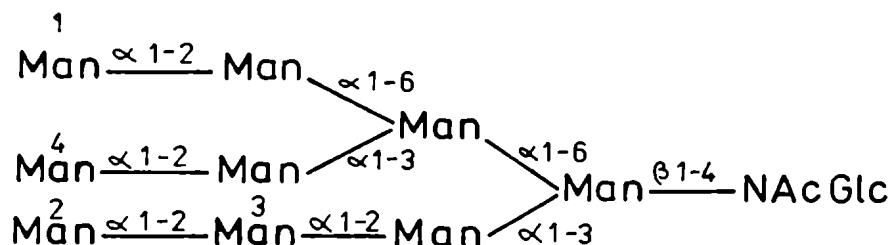


Figura 13: Orden de eliminación de residuos manosa por α 1-2 manosidasa sobre $(\text{Man})_9\text{-NAcGlc}$.

Si bien este procesamiento in vitro ocurre mediante una secuencia de remoción de manosas muy específica, es importante destacar que en células de ovario de hamster chino (CHO) infectadas con VSV (140) se ha descrito, además de esta secuencia, otro camino minoritario. En estas células por experimentos de "pulso" y de "chase" marcando con manosa, glucosamina o galactosa y aislando y caracterizando los intermediarios encontraron que este camino minoritario que involucraba la conversión de $\text{Glc}_1(\text{Man})_9(\text{NAcGlc})$ a $\text{Glc}_1(\text{Man})_8(\text{NAcGlc})_2$ y $\text{Glc}_1(\text{Man})_7(\text{NAcGlc})_2$.

No se puede descartar la posibilidad de que el esqueleto proteico de la glicoproteína pueda afectar el procesamiento del oligosacárido.

Numerosos indicios indicarían que estas manosidasas actuarían fundamentalmente en el aparato de Golgi (141-142).

Sin embargo, hay evidencias que sugerirían que algunos de estos residuos podrían ser eliminados ya en el retículo rugoso. La evidencia en tal sentido proviene de un proceso patológico, la deficiencia de α_1 -antitripsina de tipo ZZ en humanos, en el que los intermediarios conteniendo siete, seis y cinco manosas se acumulan en dicho compartimiento celular (143). Los pasos del procesamiento que pueden ser bloqueados en esta patología se encuentran señalados en la fig. 12.

De algunos de los estadios intermedios entre los compuestos IV y V descritos en la fig. 12 se obtienen las estructuras de tipo alta manosa (144), como se hará en el capítulo 1.4.7.4.b)

1.4.7.4. Etapas finales del procesamiento.

a) Oligosacáridos complejos (transferencia de N-acetilglucosamina).

La siguiente serie de reacciones ocurre en el complejo de Golgi y se refiere solamente a la formación de los oligosacáridos

dos de tipo "complejo".

Si bien la actividad de manosidasas se encuentra también en el Golgi, el proceso más importante que ocurre en este compartimiento subcelular es la adición de N-acetilglucosaminas, que como se verá más adelante, decide la estructura final del oligosacárido.

Los estadios finales del procesamiento y algunas etapas tempranas del proceso de elongación se esquematizan en la fig. 14. Aunque algunas de sus postulaciones son de tipo especulativo, se las ha incluido en el mismo con el fin de facilitar la discusión.

Estas reacciones han sido estudiadas con particular atención en los laboratorios de Kornfeld (145) y de Schachter (146), y ambos autores coinciden en considerar al compuesto V como a un intermediario casi obligado en la biosíntesis de oligosacáridos de tipo "complejo" (147-140). Pero debe mencionarse que se han descrito otras rutas en ciertas células mutantes, como en el caso de la línea celular mutante de linfoma Thy 1-e en la cual se acumula otro intermediario (ver sección 1.4.3.2. a)

La conversión de $(\text{Man})_5(\text{NAcGlc})_2\text{-Asn}$ (compuesto V) a $(\text{Man})_3(\text{NAcGlc})_2\text{-Asn}$ no ocurre hasta que un residuo NAcGlc haya sido incorporado por una enzima específica llamada N-acetilglucosaminil transferasa I Para dar el compuesto VI (148) (fig. 14).

Esta enzima cataliza la unión de la NAcGlc en posición β 1-2 a la manosa α 1-3 marcada con un asterisco en el compuesto V. La glucosaminil transferasa I también puede actuar sobre $(\text{Man})_4(\text{NAcGlc})_2\text{-Asn}$ y $(\text{Man})_3(\text{NAcGlc})_2\text{-Asn}$; pero se cree que estas son reacciones de menor importancia, solo presentes como caminos biosintéticos menores o en ciertas líneas de mutantes.

Se han encontrado por lo menos dos mutantes de células

de ovario de hamster chino deficientes en la actividad de la N-acetilglucosaminil transferasa I. Una de ellas fue seleccionada por su resistencia a la acción tóxica de la fitohemoaglutinina y de la ricina por Schachter y colaboradores, se la llamó pHa^{R1} (148); la otra mutante proveniente del clon llamado 15 B fue seleccionada por su resistencia a la acción tóxica de la ricina por Gottlieb y colaboradores (268). Utilizando esta última mutante Li y Kornfeld observaron que se acumulaba exclusivamente el intermediario V (149). De esta forma la adición de este residuo NAcGlc condiciona la continuación normal del procesamiento y, por ende, el proceso posterior de elongación. Por esta razón, la etapa de eliminación de estos residuos de manosa se ha denominado "procesamiento dependiente de N-acetilglucosamina". La intervención de esta transferasa condiciona también la incorporación subsiguiente de residuos fucosa (150).

La hidrólisis de los dos últimos residuos de manosa ocurre aparentemente en el Golgi para dar lugar al intermediario VII. Touster y colaboradores (139) aislaron y purificaron una α -manosidasa de Golgi a la cual llamaron manosidasa II (para distinguirla de las manosidasas I_A y I_B) que cliva los residuos α 1-3 y α 1-6 manosilos del compuesto VI para dar el compuesto VII. Tabas y Kornfeld habían identificado previamente una actividad α -manosidasa que catalizaba este mismo paso (145). Esta α -manosidasa II degrada el p-nitro- α -D-metil manósido, propiedad que la diferencia además de las α -manosidasas I_A y I_B, las cuales no presentan actividad frente al mismo sustrato (139).

Sobre el intermediario VII actúa otra N-acetilglucosaminil transferasa II que le agrega una NAcGlc para dar el compues-

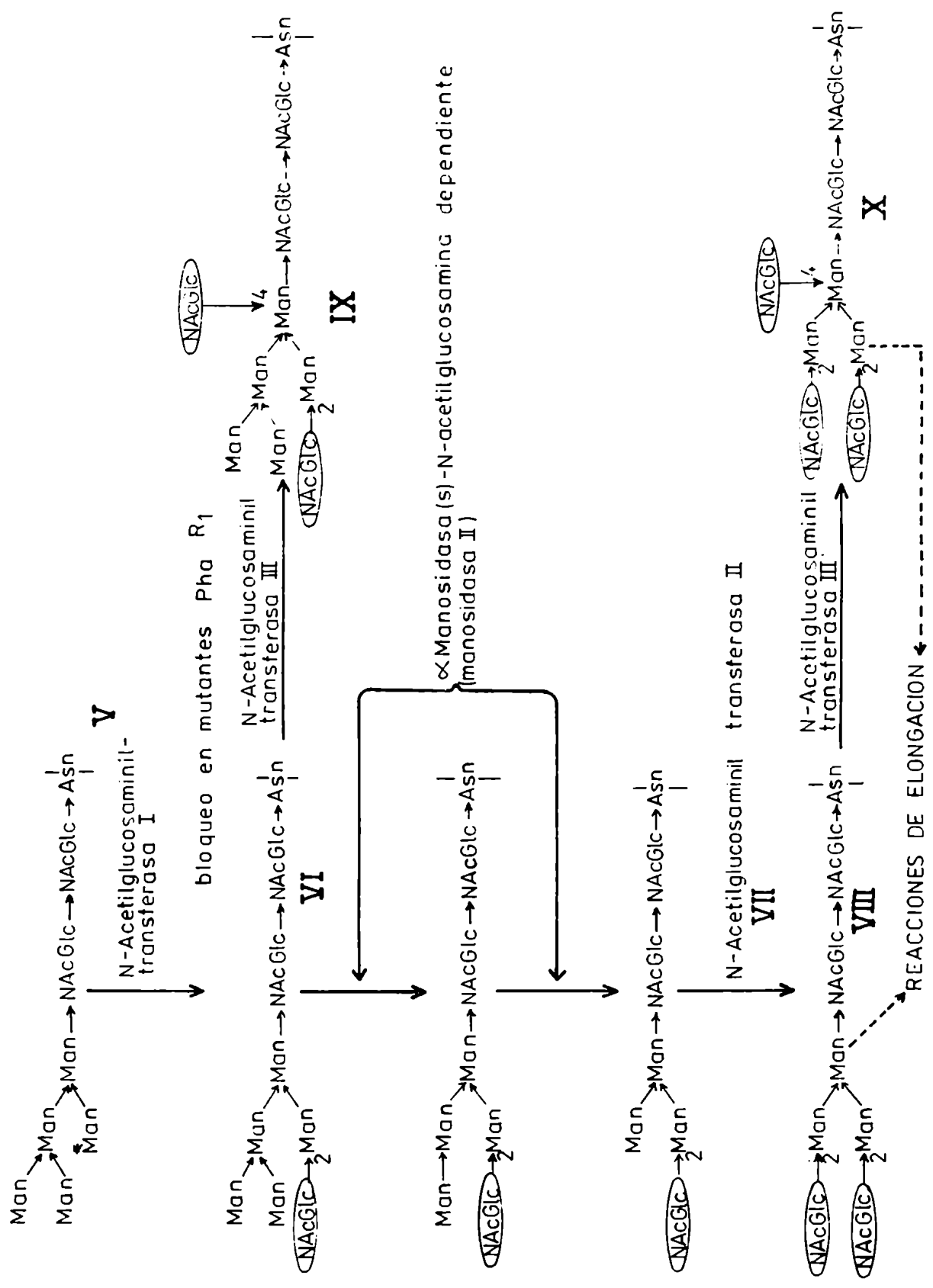


Fig. 4: Etapas finales del procesamiento e iniciales de la elongación.

to VIII. Las N-acetilglucosaminidasas I y II fueron purificadas por Harpaz y Schachter (151).

La mutante pha^R₁ a la cual nos referimos antes tiene niveles normales de N-acetilglucosaminil transferasa II (144).

Aparentemente, hay una segunda restricción que impide el procesamiento de los residuos de manosa en el intermediario VI. La misma estaría representada por la existencia de una tercera N-acetilglucosaminil transferasa (N-acetilglucosaminil transferasa III) que tranfiere un residuo de N-acetilglucosamina en posición β 1-4 a la manosa del core para dar el compuesto IX.

Cuando esta transferencia tiene lugar, el procesamiento ulterior del oligosacárido es inhibido, pero no ocurre lo mismo con el proceso de elongación. Ello explicaría la existencia de los oligosacáridos "híbridos" que poseen una estructura de "alta manosa" en una de sus ramas y de "antena" o de tipo complejo en la otra.

La posibilidad de que la N-acetilglucosaminil transferasa III pueda actuar antes que la I no ha sido descartada, como tampoco que una acetilglucosaminil transferasa III pueda actuar sobre el compuesto VIII para formar el compuesto X que a su vez daría origen a los oligosacáridos complejos biantenarios.

Hasta el momento no ha sido demostrada la existencia de las N-acetilglucosaminil transferasas III y III' in vitro ni tampoco se sabe si son entidades enzimáticas independientes. Ambas actividades se postulan en base a evidencias estructurales (144) (fig. 14).

b) Oligosacáridos de alta manosa.

Como ya se señaló anteriormente, no se sabe bien el camino del procesamiento seguido por los oligosacáridos que poseen estructuras del tipo alta manosa. Por la heterogeneidad que presentan se piensa que hay más de un camino para el procesamiento.

Algunos avances se han realizado en el caso de las enzimas lisosomales. Se sabe por numerosos trabajos que estas enzimas contienen oligosacáridos de tipo alta manosa con residuos manosa fosforilados y que estos residuos son un componente esencial para el reconocimiento y "uptake" celular de estas enzimas lisosomales (152-153). Posteriormente se encontró que el fosfato estaba siempre unido al C₆ de la manosa (154-155). Kornfeld en 1980 estudiando los intermediarios biosintéticos de la β glucuronidasa encontró

oligosacáridos tipo alta manosa con residuos fosfato bloqueados por grupos N-acetilglucosamina (156). La enzima madura perdía ambos residuos y postuló un posible mecanismo para la fosforilación de estos oligosacáridos (fig. 15).

Propuso que un grupo N-acetilglucosamina-1-fosfato es transferido de UDP-N-acetilglucosamina a un residuo manosa del oligosacárido de alta manosa de la enzima lisosomal para dar un fosfodiéster y que en una segunda etapa este residuo N-acetilglucosamina es quitado para dejar expuesto el grupo fosfato. En una última etapa este grupo fosfato sería también eliminado. Von Figura llegó a idénticas conclusiones utilizando una preparación microsomal de hígado. Logró fosforilar otra enzima lisosomal, la β hexosaminidasa desfosforilada usando [β 32 P] UDP-N-acetilglucosaminidasa como dador de grupo fosfato (157). Esta actividad transferasa era mucho menor en fibroblastos de pacientes afectados con la enfermedad de células I. Esto explicaría por que en esta enfermedad, llamada también mucopolisidosis II, hay una acumulación extracelular de enzimas lisosomales y estas enzimas no están fosforiladas (158-159).

Kornfeld también identificó, en preparaciones de membranas lisas de hígado de rata, una actividad de α acetilglucosaminilfosfo-diesterasa capaz de quitar los residuos N-acetil-glucosamina bloqueantes de los fosfatos de los oligosacáridos de alta manosa de enzimas lisosomales (160). Más recientemente von Figura y colaboradores por un lado, y Kornfeld por otro, caracterizaron y purificaron parcialmente esta fosfodiesterasa de una fracción microsomal de placenta humana (161) y de hígado de rata respectivamente (162).

Estudios estructurales realizados sobre oligosacáridos

de tipo alta manosa aislados de glicopéptidos totales de células de linfoma de ratón marcados con $[2^3\text{H}]$ manosa, demuestran que los grupos fosfato pueden estar en cinco posiciones distintas (163) (fig. 16). Estos oligosacáridos fosforilados constituyen una familia de moléculas relacionadas y todas ellas contienen el "core" mostrado en la fig. 3: el número de manosas puede variar de 6 a 9 y los grupos fosfato pueden estar como fosfomonoéster o como fosfodiéster, bloqueados por N-acetilglucosamina. El número de fosfatos puede ser también de uno o dos.

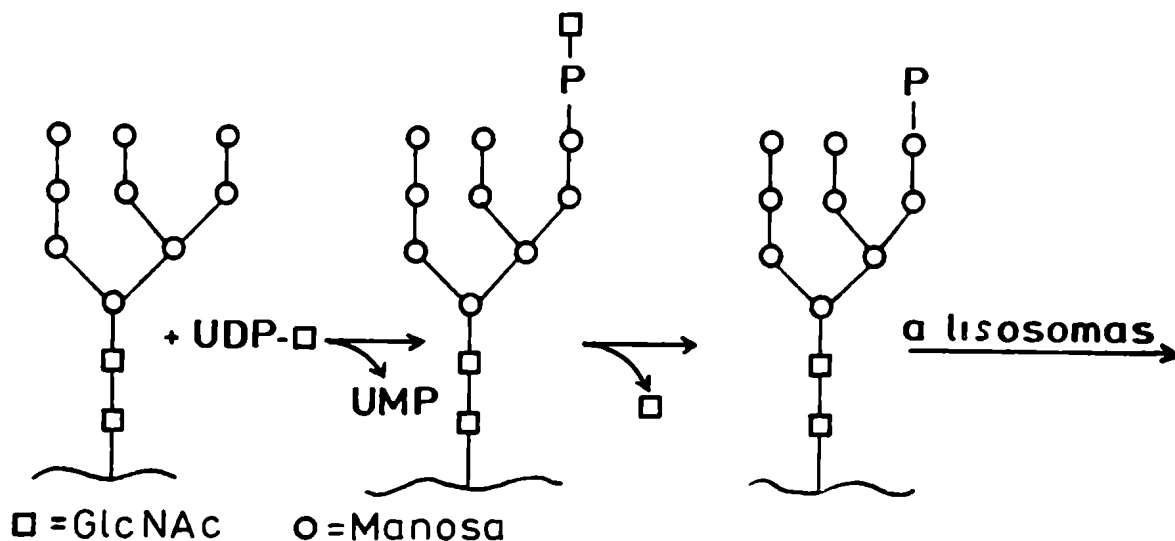


Figura 15: Esquema propuesto para la fosforilación de residuos manosa de los oligosacáridos de las enzimas lisosomales.

Aunque en el se muestra un solo residuo manosa fosforilado, se han descrito oligosacáridos con dos manosas esterificadas con fosfato.

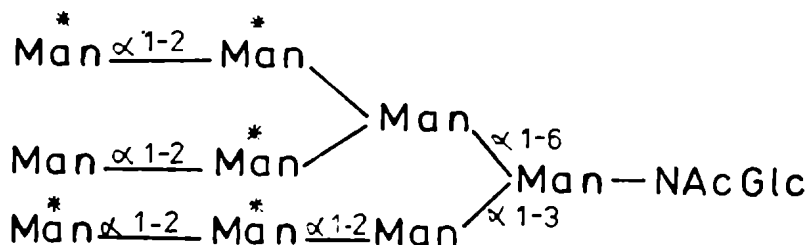


Figura 16: Localización de los residuos fosfato sobre el oligosacárido de tipo alta manosa.

Las manosas con asterisco (*) son las que se pueden hallar fosforiladas.

Recientemente, estudiando la cinética de fosforilación de los oligosacáridos de la β glucuronidasa en células de ratón (164) Kornfeld encontró que las primeras especies fosforiladas que pudo detectar no tenían glucosa, y concluyó que la fosforilación es un acontecimiento postraducciona. Además la posición de los grupos fosfato en los oligosacáridos de la β glucuronidasa resultó similar a la obtenida con el conjunto de enzimas lisosomales extraídas de células totales; la eliminación de la NAcGlc de los grupos fosfodiester comenzaba inmediatamente después de que los oligosacáridos fueran fosforilados y ocurría al mismo tiempo que se eliminaban algunos residuos manosa externos. Pero en realidad muchos son los interrogantes que quedan aun sin resolver en este campo.

1.4.7.5. Elongación.

Se denomina elongación al proceso que conduce a la formación de las "antenas" en los oligosacáridos de tipo "complejo" y a la ramificación por sucesivas adiciones de residuos manosilo en los de "alta manosa".

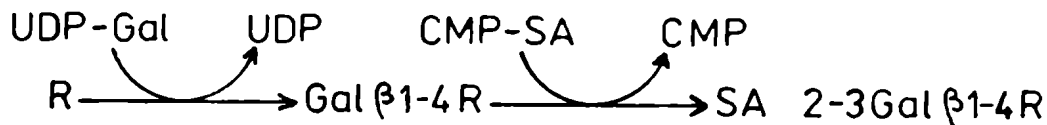
También están incluidas en este grupo de reacciones la adición de fucosa en configuración α tanto al C₆ ó C₄ de la N-acetil quitobiosa de la estructura del core como al C₃ de una N-acetilglucosamina de las antenas y posiblemente también al C₂ de una galactosa de las antenas (144).

Todas las enzimas que producen la elongación han sido localizadas en el aparato de Golgi y algunas de ellas han sido considerablemente purificadas.

Como ya señalamos antes, la incorporación de fucosa en unión α 1-6 al residuo NAcGlc ligado a Asn no ocurre a menos que actúe primero la N-acetilglucosaminil transferasa I y los dos residuos manosa α 1-2 hayan sido eliminados para dar el compuesto VII (fig. 14); la fucosa puede también ser incorporada al compuesto VIII (144) (fig. 14).

Si bien son numerosas las reacciones consideradas en este proceso de elongación, una etapa característica consiste en la adición sucesiva de tres residuos diferentes: N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. Una vez incorporada la N-acetilglucosamina (fig. 14), se añade la galactosa y el ácido siálico.

El siguiente esquema muestra el orden de adición convencional de estos últimos dos azúcares.



R es el intermediario VIII en la figura 14.

La incorporación de galactosa en posición β 1-4 a NAcGlc es llevada a cabo por una galactosiltransferasa que ha sido descrita en muchos tejidos y que ha sido purificada de leche (165).

En cuanto al ácido siálico, su unión a la galactosa por un enlace β 2-6 es efectuada por una sialiltransferasa que ha sido purificada de calostro bovino (166-167).

En un trabajo reciente se logró transferir ácido siálico a la galactosa terminal por un enlace α 2-3 (168).

La formación de más de dos antenas, es decir la adición de N-acetilglucosamina a residuos manosa' terminales por enlaces β 1-4 ó β 1-6 no ha sido aún encontrada in vitro, pero indudablemente tales enzimas deben existir para explicar la existencia de oligosacáridos complejos de tres y cuatro antenas.

1.5. Inhibidores de la glicosilación de proteínas.

El estudio con inhibidores que bloquean la glicosilación en algún punto conocido fue una importante herramienta que permitió determinar que las cadenas de carbohidrato unidas a proteínas con diferentes funciones son sintetizadas por caminos similares. Es interesante señalar que algunos de los inhibidores de la glicosilación de proteínas fueron descubiertos en virtud de su actividad antiviral.

Así, tunicamicina, glucosamina, 2 deoxi-D-glucosa, 2 deoxi-2 fluoro-D-glucosa y 2 deoxi-2 fluoro-D-manosa inhibían la multi-

plicación de una variedad de virus con cubierta (169-170). También varios antibióticos, que ya se sabía que interferían con el crecimiento bacterino, inhibieron la glicosilación de proteínas eucarióticas. Los análogos de azúcares o de nucleótido azúcares constituyen otro grupo de inhibidores.

Los inhibidores de la glicosilación de proteínas mejor conocidos interfieren en los pasos dependientes de dolicol. En cambio se conoce muy poco acerca de sustancias que inhiben específicamente reacciones que tienen lugar después de la transferencia de oligosacárido a la proteína.

1.5.1. Inhibidores de la formación de dolicol fosfato.

Las sustancias que interfieren con la formación de poliprenil fosfato son de tres tipos:

a) aquellas que interfieren con la biosíntesis de poliprenil difosfato; por ejemplo, inhibidores de la 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa).

b) compuestos que impiden el reciclado de poliprenil difosfato (bacitracina).

c) compuestos que impiden la fosforilación de poliprenoles.

a) Los inhibidores de la actividad de HMG-CoA reductasa (por ejemplo compactina) (172) o compuestos que bajan los niveles de la enzima (por ejemplo 25-hidroxicolesterol) (173) no solo decrece la formación de poliprenil difosfato, sino que también se afecta la formación de colesterol y de las cadenas poliprenólicas de la coenzima Q. Como consecuencia, los tratamientos prolongados con estos compuestos pueden causar efectos laterales y luego indirectamente impedir la glicosilación de proteínas.

b) La bacitracina es un antibiótico polipeptídico cíclico aislado de *Bacillus licheniformis* y forma un complejo con los poliprenil

difosfatos y un catión divalente, inhibiendo así la desfosforilación de, por ejemplo, undecaprenil difosfato (174-179) y previniendo su reciclado.

En bacterias la bacitracina inhibe la síntesis del péptido glicano porque limita el nivel de undecaprenol fosfato regenerado (176).

En eucariotes la bacitracina inhibe la desfosforilación del dolicol difosfato (177) (reacción 7, fig. 11). El antibiótico forma un complejo con el dolicol difosfato y en la formación del complejo también sería necesario un catión divalente (177).

Elbein y colaboradores encontraron que la bacitracina inhibía la transferencia de N-acetilglucosamina y de manosa de UDPNAc-Glc y GDPMan respectivamente, al dolicol fosfato (178).

Estos efectos se estudiaron en sistemas libres de células, ya que las células parecerían ser impermeables a la bacitracina.

c) Si bien aún no se conoce ninguna sustancia que bloquee específicamente la fosforilación del dolicol CTP dependiente, hay agentes que inhiben la formación de CTP a partir del UTP (por ejemplo la 3-deazauridina) (171).

1.5.2. Inhibidores de la formación de oligosacáridos ligados a lípidos.

1.5.2.1. Inhibición por azúcares análogos.

Como ya se mencionó anteriormente los carbohidratos 2 amino-2 deoxi-D-glucosa (GlcN), 2 deoxiglucosa (dGlc), 2 deoxi-2 fluoro-D-glucosa (FGlc) y 2 deoxi-2 fluoro-D-manosa (FMan) inhibían la multiplicación de virus con cubierta. Fue crucial al estudiar el mecanismo de dicha inhibición, el encontrar que estos carbohidratos inhibían la glicosilación de las glicoproteínas virales (179).

Se buscaron condiciones experimentales en las cuales los análogos del azúcar inhibían específicamente la glicosilación de proteínas sin afectar significativamente otras reacciones celulares. En general el sistema más utilizado para este tipo de estudios ha sido el de células infectadas con virus que tienen como constituyentes de su superficie glicoproteínas del tipo N-glicosídicas. Estos sistemas son muy interesantes ya que la célula una vez infectada detiene la síntesis de sus propias proteínas y glicoproteínas para sintetizar solo las del virus infectante, lo que permite disponer de un sistema en el cual toda la maquinaria biosintética se encuentra especializada en la síntesis de una, dos ó tres glicoproteínas virales, lo que facilita su análisis. Los virus más utilizados han sido el Semliki Forest, el de la Influenza y el virus de la estomatitis vesicular, los que pierden su capacidad infectante si sus proteínas de superficie no están glicosiladas, permitiendo tener un ensayo muy sensible para determinar defectos en la glicosilación.

A continuación se detallan los principales análogos de azúcares utilizados para inhibir la glicosilación de proteínas.

a) 2 deoxi-D-glucosa (dGlc) o 2 deoxi-D-manosa: El nombre correcto es 2 deoxi-D-arabino hexosa y es un análogo de la D-glucosa y de la D-manosa.

Se observó que los dolicol difosfato azúcares que se forman en presencia de dGlc tienen los oligosacáridos de tamaños aberrantes, con un número de azúcares menor que los controles, y que los mismos no se transfieren a proteína (180). Este efecto puede ser antagonizado por el agregado de manosa, o en menor extensión por glucosa, reestableciéndose la síntesis de dolicol difosfato oligosacáridos normales (181).

Se demostró por estudios realizados con 2 deoxi-D-glucosa ¹⁴C que el azúcar da lugar a la formación de los nucleótidos guanosina-difosfato-2-deoxiglucosa y uridina-difosfato-2-deoxiglucosa (182) y también de dolicol monofosfato-2-deoxi-D-glucosa (185). De los dos nucleótido deoxiazúcares formados el GDP-dGlc es el principal responsable de la inhibición de la glicosilación (183).

La posibilidad de poder sintetizar en cantidad suficiente el UDP-dGlc y GDP-dGlc permitió estudiar in vitro el efecto que ambos tenían en el ciclo del dolicol (184).

Se demostró que interferían de cuatro maneras diferentes:

- 1°) El GDP-dGlc da lugar a la formación de DolP-dGlc (185) por lo que disminuye la formación de Dol-P-Man (185), Dol-P-Glc (186) y Dol-PP-NAcGlc ya que los nucleótidos-azúcares fisiológicos compiten con el GDP-dGlc por las cantidades limitantes de DolP. El agregado de DolP exógeno revierte esta inhibición (186).
- 2°) Si el GDP-dGlc está presente en un exceso de 20 a 50 veces sobre el GDPMan (187), se inhibe la elongación con manosas del Dol-PP-(NAcGlc)₂ y se acumula el DolPP(NAcGlc)₂dGlc ó el Dol-PP-(NAcGlc)₂MandGlc, los cuales no pueden ser elongados posteriormente con residuos manosa o dGlc. El dGlc transferido actúa como terminador de cadena o punto final pues una vez incorporado a un oligosacárido se bloquea su metabolismo. Si la relación de concentraciones de GDP-dGlc a GDPMan es menor de 20 (187) algo de manosa se incorpora y se forman oligosacáridos más largos ligados a lípido, todos terminados en dGlc. Estos oligosacáridos no son transferidos a proteína.
- 3°) El GDP-dGlc interfiere con la D-glucosilación de Dol-PP-(NAcGlc)₂Man₉ para formar Dol-PP-(NAcGlc)₂Man₉Glc₃, en primer lugar porque como ya señalamos antes inhibe la formación de Dol-P-Glc

que es el dador fisiológico de los tres residuos glucosa (fig. 10) y en segundo lugar porque residuos dGlc del Dol-P-dGlc son posiblemente incorporados en lugar de glucosa (186). No se sabe todavía si estos oligosacáridos pueden ser transferidos a proteína.

4°) El UDP-dGlc inhibe la síntesis del Dol-P-Glc y con ello probablemente la glucosilación de Dol-PP-(NAcGlc)₂Man₉ (186). El UDPdGlc no inhibe la formación de Dol-P-Man, de Dol-PP-NAcGlc ni de Dol-PP-(NAcGlc)₂ y tampoco da lugar a la formación de Dol-P-dGlc. La inhibición causada por UDP-dGlc no se revierte por el agregado de Dol-P. Los efectos inhibitorios de UDP-dGlc en células intactas pueden ser limitados si los niveles de Dol-P-Glc son altos.

Los efectos de la dGlc sobre la formación de oligosacáridos ligados a lípidos están resumidos en la fig. 16.

El hecho de que en muchos sistemas (levaduras, algas, células de pollo o de hamster) no se haya podido sintetizar Dol-P-dGlc a partir de UDP-dGlc, pero si a partir de GDP-dGlc, sugiere que el grupo hidroxilo en posición 2 de la D-glucosa en el UDP-Glc es crucial para la actividad de la UDP Glc-poliprenilfosfato-D-glucosiltransferasa en eucariotes; mientras que el grupo hidroxilo en posición 2 de la D-manosa no es esencial para la manosiltransferasa.

Figura 16: Inhibidores de glicosilación de proteínas.

Categoría:

inhibidor Reacción inhibida

Inhibidores de la formación de DolP

Bacitrina Dol-PP DolP + Pi

25-hidroxicoles-terol compactina HMG-CoA + 2 NADPH + 2 H⁺ mevolonato + 2 NADP⁺ + Co-A.

Inhibidores del ensamble de oligosacáridos ligados a lípidos

I. Antibióticos

Tunicamicina UDP-NAcGlc + DolP → DolPP-NAcGlc + UMP

Anfomicina UDP-NAcGlc + DolP → DolPP-NAcGlc + UMP

 GDP-Man + DolP ⇌ DolP Man + GDP

 UDP-Glc + DolP DolP Glc + UDP

Showdomycin UDP-Glc + DolP → DolP Glc + UDP

Diomicina GDP-Man + DolP → DolP Man + GDP

 UDP-NAcGlc + DolP → DolPP-NAc Glc + UMP

 Dol-PP-NAc Glc + UDP-NAc Glc → DolPP(NAcGlc)₂ + UDP

II. Análogos de azúcares

2-deoxi-D-arabino-hexosa (dGlc) a) la formación de DolPMan, DolPGlc y Dol-PP-NAcGlc por atrapar el DolP como DolPdGlc. } inhibición causada por GDPdGlc

 b) la manosilación de DolPP(NAcGlc)₂ y DolPP(NAcGlc)₂Man por la formación de DolPP(NAcGlc)₂-dGlc y DolPP(NAcGlc)₂ Man dGlc } inhibición causada por UDP dGlc

 c) la glucosilación de DolPP(NAcGlc)₂ Man₉ } inhibición causada por UDP dGlc

 d) DolP + UDP-Glc → DolPGlc + UDP

2-deoxi-2-fluoro-D-glucosa (dGlc) En células intactas es inhibida la formación del DolPMan y DolPGlc. Disminuye la cantidad de UDP-Glc } inhibiciones causadas probablemente por GDP-FGlc ó UDP-FGlc o ambos.

2-deoxi-2-fluoro-D-manosa (F Man) no conocida } la inhibición es probablemente vía GDP-F Man, UDP-F Man o ambos

2-amino-2-deoxi-D-glucosa no conocida } la inhibición es causada por Glc N, no por uno de sus metabolitos

b) 2-deoxi-2-fluoro-D-glucosa (FGlc)

Estudios realizados en células de embrión de pollo y en levaduras mostraron que el FGlc se metabolizaba dando UDP-FGlc y GDP-FGlc (188) y que los residuos FGlc no son incorporados a los oligosacáridos destinados a la glicosilación de proteínas. Datema y Schwarz postulan que el FGlc inhibe la glicosilación de proteínas porque evitan el ensamble de los oligosacáridos ligados a lípido (176). En células tratadas con FGlc se detectaron oligosacáridos ligados a lípido con cantidades decrecientes de manosa y glucosa (189), ellos no eran producto de ruptura de los oligosacáridos de tamaño normal ni tenían incorporados residuos FGlc. Más recientemente tratando con FGlc células de embrión de pollo infectadas con virus, Datema y Schwarz (190) encontraron que la glicosilación de la proteína viral era fuertemente pero no completamente inhibida, y los oligosacáridos transferidos eran más chicos que lo normal. Se propuso que la glicosilación en presencia de FGlc puede ocurrir por un camino similar al descrito en la mutante de células de linfoma de ratón Thy-1, a la que ya nos referimos previamente (sección 1.4.3.)

c) 2-deoxi-2-fluoro-D-manosa (FMan)

El FMan es convertido en levaduras y células de embrión de pollo en GDP-FMan y UDP-FMan (182). Al igual que la dGlc y FGlc la FMan inhibe el ensamble de los oligosacáridos ligados a lípidos. No es incorporado en glicoproteínas. El mecanismo de inhibición de la glicosilación de proteínas por FMan no ha sido investigado en detalle; sin embargo la glicosilación residual de proteína hallada en presencia de FGlc no ha sido observada en presencia de FMan por lo cual se piensa que el mecanismo inhibitorio es diferente (190). No se ha podido sintetizar en cantidad suficiente deri-

vados fluorados de los nucleótido azúcares como para probar esta idea.

d) 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (GlcN)

A concentraciones de GlcN que inhiben la multiplicación del virus solo se detectan metabolitos usuales de los amino azúcares (GlcNAc, GlcNA-6P y UDP-GlcNAc) (191).

Si las células se lavan con medio libre de GlcN, la glicosilación de las proteínas se reinicia en 15 minutos. En este tiempo, la concentración de los metabolitos de la GlcN y de los nucleótido azúcares no cambia significativamente, indicando el GlcN por si mismo es el inhibidor de la glicosilación de proteína (191).

Análisis cinéticos de la inhibición de la glicosilación por GlcN mostraron que lo primero que se inhibió fue el ensamble de los oligosacáridos ligados a lípido y luego la glicosilación de las proteínas (180).

No se sabe con claridad que paso es el inhibido. La GlcN no inhibe in vitro la formación de los oligosacáridos ligados a lípido, esto indica que el sistema de membrana debe estar necesariamente intacto para que la inhibición por GlcN sea efectiva (192).

La inhibición por GlcN tiene la ventaja de que es rápidamente reversible.

1.5.2.2. Inhibición por sustancias antibióticas.

Se han descripto en los últimos años una serie de antibióticos que inhiben la biosíntesis de las glicoproteínas a través del bloqueo en la síntesis de lípidos intermediarios. El más importante es, sin duda, la tunicamicina. Este compuesto presenta una estructura compleja (fig. 17) que contiene un uracilo, ácidos grasos, N-acetilglucosamina y un azúcar poco frecuente denominado tu-

nicamina.

Fue aislado a partir de Streptomyces lysosuperficus en el laboratorio de Tamura (193) y ha sido extensamente empleado en estudios relacionados con la función biológica de los hidratos de carbono.

La tunicamicina bloquea la transferencia de N-acetilglucosamina fosfato al dolicol fosfato (194-195).

Esta reacción constituye el primer paso en el ciclo del dolicol (reacción 3, fig. 11) y en consecuencia inhibe la formación de los doliquil derivados subsiguientes.

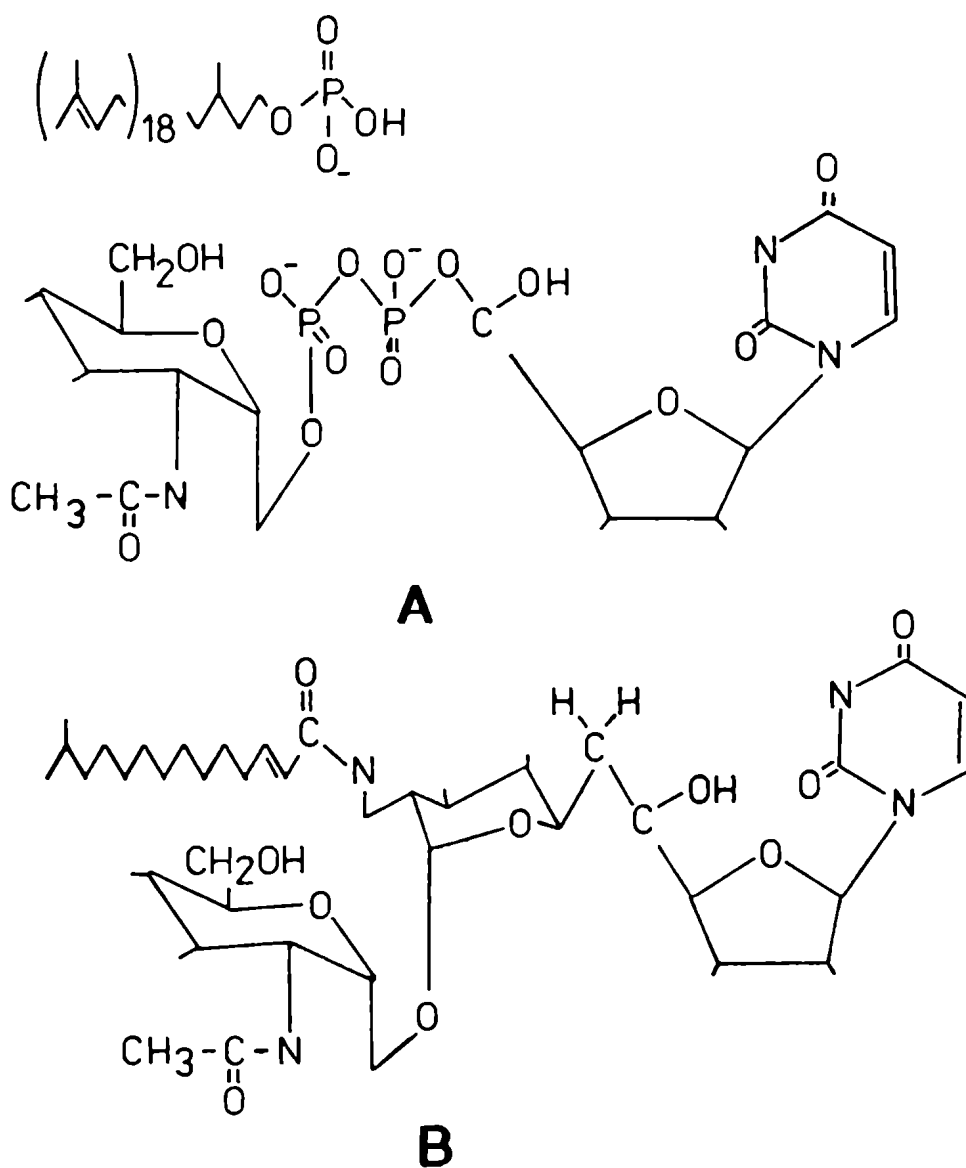


Fig. 17: Analogías estructurales entre la tunicamicina y el UDP-NAcGlc y el doliquil-P.

A) UDP-NAcGlc y doliquil-P.

B) tunicamicina.

Se han propuesto dos mecanismos de acción para este antibiótico. Según el más aceptado, la tunicamicina actúa como un inhibidor reversible de tipo competitivo, que interactúa como un bisustrato de alta afinidad con el centro activo de la enzima (196). Por otra parte el grupo de Elbein postula que la tunicamicina es un inhibidor irreversible de la N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (197).

Kong y colaboradores (198) estudiaron el efecto del antibiótico anfomicina, que posee una estructura anfipática formada por un undecapéptido unido a un ácido graso (199), en la biosíntesis de los lípidos intermediarios. Este antibiótico, en células eucarióticas, inhibe la formación de Dol-PP-NAcGlc, Dol-P-Man y Dol-P-Glc de sus respectivos nucleótido azúcares. Se piensa que su actividad se basa en su similitud estructural con el dolicol fosfato (184).

En un trabajo reciente, Elbein y sus colaboradores han descrito la inhibición de la síntesis del dolicol-PP-NAcGlc por dos antibióticos que se denominan 24.010 y streptovidina (197).

Otros antibióticos estudiados son: la showdomicina y la diumicina. Showdomicina inhibe preferentemente la formación de Dol-P-Glc mientras que la diumicina inhibió la formación de Dol-P-Man, Dol-PP-NAcGlc y Dol-PP-(NAcGlc)₂ y afectó solo muy poco la biosíntesis de Dol-P-Glc. Los resultados obtenidos con la showdomicina son interesantes ya que éste antibiótico inhibió la formación de Dol-P-Glc a partir de UDPGlc pero no la incorporación de Glc en oligosacáridos ligados a lípidos. Este inhibidor no competitivo puede luego ser usado para intentar saber más acerca de los residuos D-glucosilo en los oligosacáridos ligados a lípido.

Finalmente en un trabajo muy reciente de Elbein y colabo-

radores (200) han descripto un nuevo inhibidor, swainsonina (fig. 18), el cual inhibe el procesamiento de las glicoproteínas del tipo N-glicosídicas tanto en extractos libres de células como en cultivo de células animales. Estudios con enzimas particuladas de hígado mostraron que este alcaloide inhibe la α manosidasa pero es relativamente inefectivo para las glucosidasas, in vivo el sitio de acción es la α manosidasa II (fig. 14) que está involucrada en la eliminación de los residuos manosa (trimming) (202). En células animales en cultivo la swainsonina causa un incremento en el contenido de glicoproteínas de superficie de tipo "alta manosa" y un decrecimiento en las glicoproteínas de tipo "complejo" (203).

Este alcaloide puede ser de gran valor en estudios para determinar la función de las glicoproteínas del tipo alta manosa o complex y para estudios de la biosíntesis de estas glicoproteínas.

1.5.2.3. Ayuno de azúcares.

Un hecho interesante y no totalmente aclarado es el efecto que tiene el ayuno de glucosa en la glicosilación de las proteínas del tipo N-glicosídico.

Como se sabe, las células infectados por virus dejan de sintetizar sus propias glicoproteínas y pasan a sintetizar las glicoproteínas virales (101). Utilizando estos sistemas se observó que la ausencia de azúcares en el medio de cultivo de células trae como consecuencia un decrecimiento del peso molecular de las glicoproteínas virales (204).

En células de embrión de pollo no infectadas (205-206) y en el tumor de mieloma de ratón MOPC-46 (207) se observó, si se las privaba de glucosa, la aparición de proteínas de membrana par-

cialmente o no glicosiladas. El agregado de glucosa revertía la inhibición de la glicosilación de proteínas. Esta reversión puede ser evitada por el agregado de tunicamicina (207). Esto indica que el camino de glicosilación de proteínas a través del dolicol está involucrado en este proceso de glicosilación regulado por glucosa. Otra evidencia que apoya estos resultados es que los oligosacáridos ligados a lípidos y proteínas de células infectadas con virus, sometidas a ayuno, contienen especies que son menores que los oligosacáridos normales y además son resistentes a la endo β -N-acetilglucosaminidasa H (208).

Estos resultados recuerdan aquellos obtenidos con 2-dooxi 2 fluoro-D-glucosa (190) o con células que carecen de Dol-P-Man y sugieren que el ayuno en glucosa decrece los niveles de Dol-P-Man y por lo tanto la glicosilación de proteínas vía Dol-PP-(NAC Glc)₂ Man₉ Glc₃.

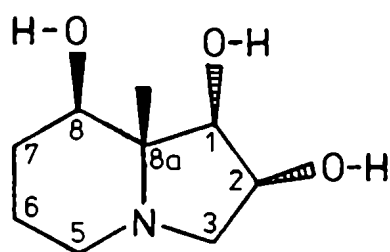


Figura 18: Estructura de la Swainsonina (201).

1.6. Función de los hidratos de carbono en las glicoproteínas del tipo N-glicosídicas.

Existen numerosas hipótesis sobre las posibles funciones biológicas que le confieren los hidratos de carbono a las proteínas. Los resultados experimentales son a menudo contradictorios, sin embargo el conjunto de evidencias obtenidas parece sugerir que las porciones glicosídicas cumplen muy diversas funciones en las distintas glicoproteínas. En algunos casos se les atribuye funciones de reconocimiento o unión, o ambas, de lectinas, toxinas y virus.

Eylar en 1966 postuló que los carbohidratos son necesarios para la exportación de proteínas de las células (210). Sin embargo, se conoce un número de proteínas que no tienen carbohidratos unidos y que sin embargo son secretadas, por ejemplo la RNasa bovina existe en forma glicosilada y no glicosilada, ambas son secretadas y exhiben propiedades catalíticas similares (211-212). Variaciones en el contenido de carbohidratos de otras enzimas como la lipasa, glucoamilasa y cloroproxidasa no influyen sobre su actividad catalítica (213). Sin embargo se encontró que en algunos casos el carbohidrato protege a las enzimas de la degradación proteolítica. Tal es el caso de la RNasa, β glucuronidasa, y del componente secretorio de la inmunoglobulina A (213).

Los azúcares juegan también un rol importante en la unión de glicoproteínas a los receptores de células.

Fueron fundamentales los trabajos de Ashwell y colaboradores quienes descubrieron que la eliminación de los residuos terminales de ácido siálico llevaba a una drástica reducción de la vida media en varias glicoproteínas plasmáticas (214-215-216). Estas asialo-

glicoproteínas-ceruloplasmina, haptoglobina, tiroglobulina, fetu-
ína, orosomucoide y protrombina- eran rápidamente captadas por
las células parenquimatosas del hígado y catabolizadas en los
lizosomas (216). Ashwell demostró que los residuos galactosa que
quedaban expuestos luego de la remoción de los ácidos siálicos,
constituían una señal de reconocimiento para la captación de las
glicoproteínas. Un resultado similar fue obtenido aplicando el
mismo tratamiento a dos hormonas glicoproteicas: la gonadotrofina
coriónica humana (GCH) y la folículo estimulante (FSH) (215).

En el laboratorio de Ashwell se logró purificar el receptor
de la asialoceruloplasmina de la membrana plasmática hepática de
conejo, resultó ser una glicoproteína que contiene ácido siálico,
galactosa, manosa y N-acetilglucosamina, siendo el ácido siálico
terminal esencial para su funcionamiento (217-218-219). Su peso
molecular aproximado fue de 500.000 (220).

Recientemente por digestión con pronasa de la glicoproteína
que constituye el receptor se han aislado dos glicopéptidos con
distinta composición en sus hidratos de carbono (221). En el hígado
de las aves se ha aislado un receptor que reconoce N-acetilglu-
cosaminas como azúcar terminal, requiriéndose en este sistema la
remoción de los ácidos siálicos y las galactosas para el reconoci-
miento de la ceruloplasmina (222).

Los trabajos comentados demuestran la importancia de oligosa-
cáridos complejos de las glicoproteínas del tipo N-glicosídicas
como señales de reconocimiento en algunos sistemas, siendo intere-
sante recalcar que el receptor sería también una glicoproteína
cuya función depende de la intergridad de sus hidratos de carbono.
Se especula que este podría ser un sistema fisiológico para la re-
moción de la circulación de glicoproteínas con muy variadas funcio-

nes biológicas (ver tabla N° 3).

Dos formas de ataque han sido utilizadas para estudiar el rol de los carbohidratos en proteínas: a) usando glicosidasas sobre una molécula que ya ha sido sintetizada y b) prevenir la adición de azúcares durante la síntesis de proteína mediante el uso de inhibidores de glicosilación. Este último método ofrece la ventaja de permitir obtener conclusiones acerca del rol de los azúcares durante la síntesis y maduración de una glicoproteína. El primer método ha sido ampliamente aplicado. En algunos casos, la eliminación del ácido siálico terminal usando sialidasas modificó la función de la glicoproteína pero en otros la función no fue cambiada. Los resultados de estas investigaciones están resumidos en una revisión por L. Warren y colaboradores (223).

Se observó frecuentemente un incremento en la sensibilidad a la degradación proteolítica, posiblemente por alteración de la conformación, lo cual lleva a exponer sitios susceptibles del esqueleto proteico. Un caso particularmente bien estudiado, en relación con la conformación proteica, lo constituye la glicoproteína G del virus VSV. Empleando tunicamicina, Kornfeld y colaboradores observaron que la forma no glicosilada presenta un efecto de agregación dependiente de la temperatura y distinta solubilidad ante tratamientos con detergentes, respecto de la forma nativa. El efecto de agregación impide el ensamble del virus. La extensión de los fenómenos observados varía al utilizar distintas cepas del mismo.

Schwarz y colaboradores (225) encuentran que la tunicamicina bloquea la normal producción de virus en células infectadas con virus Semliki Forest de Influenza, dos virus que poseen glicoproteínas del tipo asparagina en sus membranas mientras que en el virus del sarcoma aviar, que no tiene este tipo de glicoproteínas,

no tiene efecto alguno. Establece también que con el virus de la Influenza una de sus glicoproteínas (la hemaglutinina) se degrada rápidamente una vez sintetizada, cuando se bloquea su glicosilación.

Los datos comentados indicarían que los hidratos de carbono en las glicoproteínas virales cumplirían la función de permitir un correcto plegamiento de la molécula proteica, lo que determinaría su normal inserción en la membrana y migración a la superficie celular. Algunos autores, sin embargo, por estudios realizados con el virus Semliki Forest (226) encontraron que el bloqueo de la glicosilación por tunicamicina no altera el normal procesamiento de los precursores de las glicoproteínas, encontrando a las mismas insertadas correctamente en la membrana sugieren que lo que se altera es la normal migración de las proteínas a la superficie celular para dar lugar a las partículas virales maduras.

Otro aspecto interesante de la posible función de los hidratos de carbono en las glicoproteínas lo constituye las enzimas lisosomales.

Como ya se señaló en la sección 1.4.7.2.6., se ha propuesto en los últimos años que el mecanismo por el que estas enzimas llegan a su destino final en el lisosoma de la célula es a través de su excreción y reentrada a la misma por un mecanismo de reconocimiento y endocitosis, en el cual estarían involucrados los grupos manosa-6-fosfato en su porción de hidrato de carbono (154-155).

Se ha propuesto un receptor específico para la manosa-6-fosfato como al responsable de este interesante fenómeno.

Jourdan y colaboradores (227) comunicaron la aislación y purificación parcial de un receptor fosfomanosilo de hígado bovino que se une a β -galactosidasa.

Se aislaron mutantes de células de ovario de hamster deficientes

tes en la actividad receptora en manosa-6-fosfato y se encontró que una de ellas conocida como β -4-2-1, fue incapaz de sintetizar Dol-P-Man (228).

Hoy se piensa que debe existir algún otro requerimiento además de la manosa-6-fosfato que hace que las enzimas lisosomales se dirijan a los lisosomas ya que se ha encontrado, cuando se estudió la cinética de fosforilación de los oligosacáridos de la glucuronidasa en células de ratón (164), que la enzima que es secretada al medio tiene la misma estructura que la que se dirige a los lisosomas.

Stahl y colaboradores (229) propusieron que la N-acetilglucosamina terminal sería la responsable de la eliminación del torrente circulatorio de distintas enzimas lisosomales, mientras que otros trabajos realizados con RNasa pancreática β atribuyen importancia a un receptor de manosas para el proceso de internalización celular (230).

Se ha demostrado (231), que el destino de las enzimas internalizadas por la vía del receptor que reconoce N-acetilglucosamina es la célula de Kupffer y no la del parenquima hepático, así como que su entrada es más eficientemente competida por otras glicoproteínas que tengan manosas terminales, lo que sugiere que los receptores de N-acetilglucosamina o manosa dirigen las enzimas a células distintas que los receptores de manosa-6-fosfato propuesto para las enzimas lisosomales en los fibroblastos (232), lo que abre la posibilidad de que pueda regular el destino de una glicoproteína particular, según el receptor celular involucrado (233) (ver tabla 3).

Es interesante respecto de la función de los hidratos de carbono como sistemas de reconocimiento los resultados presentados

por Day y colaboradores (234). Estos autores encuentran que las inmunoglobulinas M exponen en la superficie de la molécula residuos de hidratos de carbono del tipo alta manosa al interactuar con el antígeno específico, posiblemente como consecuencia del cambio conformacional que inducen en la proteína. Estos residuos de alta manosa así expuestos son reconocidos por un receptor de la superficie celular de la célula de Kupffer promoviendo una rápida internalización del inmunocomplejo.

Melcher (235) trabajando con células productoras de inmunoglobulina G, encontró que si inhibía la glicosilación con 2-deoxiglucosa se alteraba la normal migración de la IgG desde el retículo endoplasmático rugoso, lugar de su síntesis, al retículo endoplasmático liso, afectando de esta forma su normal excreción.

Kornfeld (236) confirmó estos resultados usando como inhibidor de la glicosilación la tunicamicina y encontró que este antibiótico inhibe la secreción de inmunoglobulinas A y E en plasmocitomas aumentando al mismo tiempo la degradación intracelular de ambas glicoproteínas.

Un trabajo contradictorio respecto de la función de los hidratos de carbono en las inmunoglobulinas es el de Vasalli y colaboradores (237). Estos autores trabajan con inmunoglobulina M, de la que se sabe existen dos formas (ambas glicosiladas), una secretada al exterior de la célula donde cumple funciones de anticuerpo circulante y la otra insertada en la membrana del linfocito B que actúa como receptor para el "gatillado" de la respuesta inmune (237). En este sistema de linfocitos B la inhibición de la glicosilación con el antibiótico tunicamicina no modifica la inserción de la inmunoglobulina en la membrana, demostrándose que la cadena pesada de la misma posee un segmento hidrofóbico extra que deter-

minaría su destino en la misma (237). En este caso debe atribuirse a la porción proteica la señal para la secreción o inserción en la membrana sin participación aparente de la porción de hidratos de carbono.

En resumen, podemos asignarle a los hidratos de carbono de las glicoproteínas N-glicosídicas las siguientes funciones:

- 1°) Exportación: Son necesarios para la normal excreción de ciertas glicoproteínas como las inmunoglobulinas G, A y E (235-236).
- 2°) Resistencia a la proteólisis: Juegan un rol en la protección de algunas proteínas frente a la acción de proteasas endocelulares (225-236).
- 3°) Reconocimiento: Cumplen un papel importante en los sistemas de reconocimiento tanto de las proteínas circulantes, como de las insertadas en membranas plasmáticas de células de distintos tejidos (214-227-234).
- 4°) Conformación: Intervienen en el plegamiento y mantenimiento de la estructura terciaria de las glicoproteínas (224-225). Es importante hacer notar que los puntos 1°, 2° y 3° pueden considerarse como casos particulares del 4° que engloba a todos ellos.

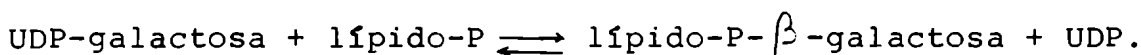
Tabla 3: Breve enumeración de los residuos señal caracterizados hasta el momento y de los tipos celulares en que se expresan los respectivos receptores.

Señal en la porción glicosídica	Células en que se expresa el receptor
Galactosa	Hepatocito de mamífero (221)
N-acetilglucosamina	Hepatocito de ave (222)
N-acetilglucosamina, manosa	Células de Kupffer (229-230)
Manosa-6-fosfato	Fibroblastos (232-227)

2. Antecedentes recientes y objetivos de la investigación.

En nuestro laboratorio se encontró que preparaciones enzimáticas particuladas de *Acetobacter xylinum*, una bacteria gram negativa que se caracteriza por producir celulosa, catalizaban la síntesis de ficaprenol monofosfato- β -galactosa, a partir de ficaprenol monofosfato y UDP-galactosa, en presencia de detergente (238). Este producto tuvo las mismas propiedades que el compuesto formado por el aceptor endógeno, un poliprenol de estructura parcialmente caracterizada (46). Se obtuvo, además que el dolicol monofosfato era también buen aceptor de galactosa, aunque el producto obtenido tenía propiedades algo diferentes de las del compuesto natural.

Estas reacciones enzimáticas se pueden representar con la siguiente reacción:



Donde lípido-P puede ser lípido fosfato endógeno, ficaprenol monofosfato o dolicolfosfato.

Por otra parte la participación de doliquilfosfato derivados de N-acetilglucosamina, manosa y glucosa en la síntesis de glicoproteínas en eucariotes ha sido demostrada ampliamente (12-101-239-240-241), no está claro un rol similar para los derivados galactosilados.

Como ya se señaló en la sección 1.4.3.1., la síntesis de dolicol monofosfato galactosa en sistemas eucariotes es muy controvertida, han aparecido numerosos trabajos que presentan resultados negativos, sin embargo Zatta y colaboradores (79) comunicó la formación de poliprenilmonofosfato galactosa, presumiblemente dolicol monofosfato galactosa, incubando una fracción microsomal de hígado de ternero con UDP(^{14}C)gal en presencia de ATP como inhibidor

de la nucleótido fosfatasa.

Por su parte Mc. Evoy y colaboradores (75) trabajando con membranas de fibroblastos de ratón encontraron que el dolicol monofosfato estimulaba la incorporación de galactosa a partir de UDP-Gal en glicoproteínas. Sin embargo, no pudieron detectar la formación de dolicol monofosfato galactosa aunque la concentración de UDP-Gal no disminuyó mayormente durante la incubación. Ellos atribuyeron su no detección a su extrema labilidad.

Recientemente Mellor y Lord (242) trabajando con una fracción microsomal de tejido de endosperma de semilla de castor sugieren que en la galactosilación de una proteína exógena, la asialoagalactofetúina, a partir de UDP(¹⁴C)gal intervendría un lípido intermediario, que por su movilidad cromatográfica en TLC se comportaría como un doliquil derivado.

Con estos antecedentes y la posibilidad de poder usar preparados enzimáticos de *Acetobacter xylinum* para sintetizar dolicolmonofosfato galactosa, nos propusimos estudiar la metabolización de este compuesto en eucariotes.

3. Materiales y Métodos

3.1. Preparación de enzimas.

3.1.1. Preparación de enzima de Acetobacter xylinum NRRL B 42. (238)

Acetobacter xylinum NRRL B 42 fue cultivado y liberado de celulosa como lo describieron Hestrin y Schram (243).

El precipitado de células, obtenido por centrifugación, fue resuspendido cuidadosamente en buffer EDTA-Tris 0,01M pH: 8,0 (2,5 ml de buffer por litro de medio de cultivo) congelado y descongelado (238). Esta suspensión fue usada directamente como preparación enzimática.

3.1.2. Preparación de microsomas de hígado de rata (109)

Se utilizaron ratas Wistar Albinas. El peso de las mismas osciló entre 200 y 400 gramos. A los animales ayunados durante 3 días, se les inyectó 10 unidades de insulina Ely Lilly de origen bovino por vía intraperitoneal y luego de 1 hora se los sacrificó por decapitación. Se procedió luego a extraer los hígados, los cuales fueron perfundidos con una solución de sacarosa 0,25 M, EDTA 5 mM, mercaptoetanol 10 mM (buffer A), hasta la total extracción de la sangre retenida en su interior.

Los hígados perfundidos se lavaron con buffer A y se llevaron a una relación peso/volumen en el mismo buffer de 1 a 2, se cortaron con tijeras en trozos pequeños y se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem (vidrio-teflón) por 10 pasadas a 500 r.p.m. y se llevó con buffer A a una relación peso/volumen de 1 a 1. Se homogeneizó con Ultra Turrax (Typ 18/10 Janke y Kunkel K. G.) por 10 tratamientos a máxima velocidad de 10 segundos de duración cada uno. Todas las operaciones fueron realizadas a 4°C. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 xg en centrí-

fuga Sorvall refrigerada. Se descartó el precipitado. El sobrenadante se centrifugó 3 horas a 100.000 xg en centrífuga Spinco refrigerada, descartándose los sobrenadantes. Los precipitados microsomales fueron resuspendidos cuidadosamente en buffer A, utilizando un volumen tal como para llevar la concentración proteica a 100 mg por milimetro aproximadamente.

3.1.3. Preparación enzimática de cerebro de rata.

Ratas Wistar albinas adultas fueron sacrificadas por decapitación. Los cerebros fueron extraídos y se llevaron con buffer Tris-ClH 0,1 M pH:7, sacarosa 0,25 M y EDTA 1 mM (buffer B) a una relación peso-volumen (1:1). El tejido fue homogeneizado en Dounce por 10 golpes con el émbolo A y 10 golpes con el émbolo B. El homogeneizado se centrifugó durante 15 minutos a 9.000 xg en centrífuga Sorvall refrigerada. El precipitado se descartó. El sobrenadante se centrifugó durante 15 minutos a 39.000 xg en centrífuga Spinco refrigerada. El sobrenadante de 39.000 xg se centrifugó 2 horas a 100.000 xg. Ambos precipitados, el de 39.000 xg y el de 100.000 xg, fueron resuspendidos en buffer B como para obtener una concentración final de proteínas de aproximadamente 20 mg por mililitro.

3.1.4. Preparación enzimática de timo.

Se usó timo de ternero extraído del animal recién sacrificado. El timo se cortó en trozos pequeños y se llevó con buffer A a una relación peso/volumen de 1 a 1. Se homogeneizó con Ultra Turrax (Typ 18/10 Janke y Kunkel K.G.) por 10 tratamientos a máxima velocidad de 10 segundos de duración cada uno. Todas las operaciones fueron realizadas a 4°C. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 xg en centrífuga tipo Sorvall. El precipitado se descartó y el sobrenadante, al cual se le sacó una

capa de grasa por filtración por un embudo con lana de vidrio se usó como fuente de enzima.

La concentración proteica fue de 28 mg/ml.

3.1.5. Preparación enzimática de páncreas.

Se extrajo el páncreas de 5 ratas Wistar albinas y se los cortó en trozos pequeños con tijera. Se homogeneizaron con 15 ml de sacarosa 0,3 M con inhibidor de tripsina 0,01% en Ultra Turrax a baja velocidad por seis tratamientos de 30 segundos de duración cada uno. El homogeneizado se filtró por tela para quesos. El filtrado se centrifugó durante 15 minutos a 9.000 xg y el sobrenadante de esta centrifugación se volvió a centrifugar durante 1 hora a 100.000 xg. El precipitado se resuspendió en el mismo buffer utilizando un volumen tal como para llevar la concentración proteica a $100 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$.

Nota: En todos los casos la medición de proteínas se hizo por el método de Lowry y col. (244).

3.2. Preparación de sustratos.

3.2.1. Preparación de dolicol de hígado de cerdo.

Se usó el método de Burgos y col. modificado (39).

Este método consiste en una saponificación seguido por una extracción con éter sulfúrico. Hígado de cerdo, de animal recién sacrificado o conservado en congeladora a -70°C , cortado en pequeños trozos, se trató con KOH 14 N en una solución de etanol: agua (1:1) durante toda una noche. La saponificación se realizó en presencia de pirigalol y bajo atmósfera de N_2 . El material así tratado se extrajo con éter sulfúrico. Este extracto etéreo llevado a seco se retomó con éter de petróleo ($\text{pe-60-80}^{\circ}\text{C}$). El colesterol se eliminó de este extracto precipitándolo por sucesivos

enfriamientos y filtraciones. El filtrado llevado a seco se resuspendió en la menor cantidad posible de éter de petróleo (pe-30-65°C) y se cromatografió por una columna de alúmina Brockmann grado II. Se eluyó con concentraciones crecientes de éter sulfúrico (del 0,5 al 10%) en éter de petróleo. Se analizaron las distintas fracciones por cromatografía en placa delgada en sílica gel G usando cloroformo como solvente. Las placas se revelaron con una solución que contenía 1% de anisaldehído y SO_4H_2 2N en etanol 90%. El dolicol da una mancha verde característica ($R_f=0,75$) al calentar a 100°C durante 5 minutos.

Las fracciones que contenían dolicol se unieron y concentraron. Las fracciones combinadas se cromatografiaron usando placas de sílica gel G y cloroformo como solvente.

Se obtuvieron 110 mg de dolicol a partir de 1,5 Kg de hígado de cerdo.

3.2.2. Preparación del dolicol fosfato.

El dolicol obtenido como se describe en 3.2.1. se fosforiló de acuerdo al método de Rugar y Carroll (245). El agente fosforilante usado fue el 2-clorometil-4-nitrofenilfosfodicroato. Este método no presentó mayores ventajas sobre la técnica de Cramer (40) descrita por Popjak (41) y modificada por Behrens y Leloir (42).

Se verificó que el dolicol-fosfato obtenido además de comportarse como tal en distintos sistemas cromatográficos (39), estimulaba 8 a 10 veces la formación de dolicol monofosfato glucosa usando un sistema de microsomas de hígado de rata y $\text{UDP}(^{14}\text{C})\text{Glc}$ como sustrato (42).

Como se señaló anteriormente (sección 1.4.3.1.a), bajo

ciertas condiciones, la formación de dolicol monofosfato glucosa da una medida de la cantidad de dolicol fosfato. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se pudo determinar que usando el método de Rugar y Carroll (245) el rendimiento fue del 4% respecto del dolicol usado.

3.2.3. Preparación de UDP(¹⁴C)Glc y UDP(³H)Glc.

Fueron preparados por Susana Raffo y Marta Eirin a partir de (U¹⁴C)glucosa (Amersham. Searle, 200-300 mCi/m mol de actividad) y (C₁-³H)glucosa (NEN, 3 m Ci/_umol) respectivamente, siguiendo la técnica descrita por Thomas y colaboradores (250) con diversas adaptaciones (270).

3.2.4. Preparación de UDP(¹⁴C)Gal.

Fue preparado a partir de UDP(¹⁴C)Glc (200-300) mCi/m mol por Susana Raffo y Marta Eirin Con el método descrito por García y colaboradores (238).

3.2.5. Preparación de Dol-P-(¹⁴C)Gal.

Se usó enzima de *Acetobacter xylinum* y la técnica descrita por Romero y colaboradores (46).

La mezcla de incubación contenía:

Dol-P en cloroformo: metanol (2:1)	2 μ l
Tris ClH 0,5M pH = 8,2	70 mM
Tritón x 100	0,12% a 0,6%
Cl ₂ Mg	8,5 mM
UDP(¹⁴ C)Gal 56 μ M (300 ul/ μ m)	150.000 cpm
enzima de <i>A. xylinum</i>	230 a 300 ugr

El volumen final de reacción fue de 70 μ l y se incubó a 30°C durante 2 horas.

El cloroformo:metanol usado para solubilizar el Dol-P se evaporó con N_2 antes del agregado de los demás componentes de la mezcla de incubación. Se agitó con vortex antes del agregado de la enzima. Las reacciones se inactivaron por agregado de 0,1 ml de butanol. La incorporación de marca en Dol-P-(^{14}C)Gal se determinó extrayendo la mezcla 3 veces con 0,1 ml de butanol, luego los extractos butanólicos combinados se lavaron 3 veces con 0,1 ml de agua (46).

Se tomaron alícuotas de las fracciones butanólicas para determinar la radioactividad.

Se hicieron controles en los cuales no se agregó Dol-P en la mezcla de incubación. Esto da una idea del nivel de lípido fosfato endógeno (46).

Conviene aclarar que las cantidades de enzima y de detergente hay que determinarlas para cada preparación enzimática.

En general, se obtiene un rendimiento de Dol-P-(^{14}C)Gal del 30% respecto del UDP-(^{14}C)Gal usado como sustrato. Este Dol-P-(^{14}C)Gal tiene un 10 a 15% de lípido-fosfato-(^{14}C)galactosa obtenido a partir del lípido-fosfato endógeno (46).

Cantidades razonables de Dol-P-(^{14}C)Gal se obtuvieron incubando simultáneamente 24 tubos con la mezcla estándar. Las fases butanólicas se unieron y llevaron a seco. Se resuspendió el residuo en cloroformo: metanol (2:1) a una concentración tal como para tener 10.000 a 15.000 cpm de Dol-P-(^{14}C)Gal en 10 ul. Este material se utilizó sin posterior purificación.

Rutinariamente, se caracterizó el producto por tres criterios:

1°) El compuesto corría con un $R_f=0,85$ a $0,9$ al cromatografiar-

lo en papel con solventes C (246) y H (247). En estos solventes, los lípido-fosfato-azúcares migran cerca del frente, mientras que los nucleótido-azúcares, hexosas y sus ésteres fosfóricos tienen menor movilidad.

2°) Por hidrólisis ácida suave (ClH 0,01N 10' a 100°C) (Sección 3.6.1.) seguida de una partición con cloroformo: metanol: agua (3:2:1), con la cual se forman dos fases, la radioactividad se hizo soluble en la fase acuosa. Esta fase se llevó a seco varias veces para eliminar el ClH y se sembró en papel Whatman N°1. Se cromatografió con el solvente A (248) el cual permite distinguir distintos azúcares. Se obtuvo un único pico de radioactividad que coincidió con el estándar interno de galactosa.

3°) El compuesto se cromatografió en una columna de DEAE celulosa equilibrada en cloroformo: metanol (1:1). Se eluyó con AcoNH_4 0,1M en cloroformo: metanol (1:1) (sección 3.7.1.1.). Esto se tomó como criterio para verificar que el compuesto tiene un solo residuo fosfato (238).

3.2.6. Preparación de Dol-P-(^{14}C)Glc.

Se preparó a partir de UDP-(^{14}C)Glc y Dol-P por el método de Behrens y colaboradores utilizando como fuente enzimática microsomas de hígado de rata (249).

3.2.7. Preparación de Dol-PP-oligosac-Glc marcado en la Glc.

Este compuesto fue preparado por diferentes métodos. El EDTA-Mg se obtuvo como lo describieron Behrens y Tabora (249).

3.2.7.1. Método I (249): En este caso se partió de UDP(^{14}C)Glc ó UDP(^3H)Glc (135). La mezcla de incubación contenía buffer Tris-maleato 100 mM pH=7,7, EDTA-Mg 10 mM, Cl_2Mg 10 mM, β Mercaptoetanol 100 mM, UDP-(^{14}C)Glc (200-300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$) ó UDP-(^3H)Glc (3mCi/

uM) ($2,5 - 5 \times 10^6$) cpm y microsomas de hígado de rata (40 a 50) mg. El volumen final de la mezcla de reacción era de 0,5 ml. Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo por agregado de 1 ml de metanol y 1,5 ml de cloroformo (la relación cloroformo-metanol-agua final es de 3:2:1). Se agitó con vortex y se centrifugó 5 minutos en centrífuga clínica. En estas condiciones se formaron tres fases: una fase inferior orgánica, una fase superior acuosa y una interfase formada por la proteína desnaturalizada. Se sacó la fase superior con pipeta Pasteur. Esta fase contiene el UDP-Glc que no reaccionó y otros productos hidrosolubles como la glucosa libre. Se volcó la fase inferior en otro tubo y se la lavó exhaustivamente con fase superior teórica (cloroformo-metanol- Cl_2Mg 4 mM) 3:48:47. En estas condiciones la radioactividad recuperada en esta fase era fundamentalmente Dol-P-(^{14}C)Glc ó Dol-P-(^3H)Glc.

A la interfase proteica se le hicieron tres particiones más (según el método de Folch y colaboradores modificado (251)) con 0,5 ml de Cl_2Mg 4 mM, 1 ml de metanol y 1,5 ml de cloroformo, se la lavó tres veces con 0,5 ml de fase superior teórica y luego se la extrajo 3 veces con 1 ml de cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3). Se unieron los extractos. Se determinó la radioactividad. La radioactividad recuperada en el solvente 1103 era fundamentalmente Dol-PP-oligosac-Glc.

3.2.7.2. Método II: Se partió de UDP-(^{14}C)Glc, y la principal diferencia con el Método I consistía en la presencia del detergente. La mezcla de incubación contenía buffer Tris-ClH pH=7,6 100 mM, Tritón x 100 1,2%, Cl_2Mg 5 mM, UDP-(^{14}C)Glc (200-300 uCi/uM) ($2,5 \times 10^6$ a 5×10^6 cpm) y microsomas de hígado de rata (40 a

50 mg). El volumen final de la mezcla de reacción era de 0,5 ml. Se incubó 30 minutos a 30°C. La reacción se detiene por el agregado de 1 ml de metanol y 1,5 ml de cloroformo. Los pasos siguientes fueron iguales a los descritos en el Método I.

3.2.7.3. Método III: Se partió de Dol-P-(¹⁴C)Glc (10.000 a 20.000 cpm). La mezcla de incubación contenía buffer Trismaleato pH=7,7 100 mM, { mercaptoetanol 100mM, EDTA-Na₂ 10 mM, deoxicolato de sodio 0,5%, enzima de microsomas de hígado de rata, 4 mg. El volumen final de incubación era de 0,1 ml. Se incubó 10 minutos a 30°C. Se inactivó por agregado de 0,2 ml de metanol y 0,4 ml de cloroformo. A continuación se siguió el mismo procedimiento ya descrito en el método I.

3.2.8. Preparación de Dol-PP-oligosacáridos marcados en manosa y glucosa.

Se usó un método de preparación "in vivo". Oviducto de gallina fue incubado durante 1 hora (1,5 gr) según el método descrito por Spiro y colaboradores (80) con 300 uCi de (U-¹⁴C)glucosa. La extracción de Dol-PP-oligosacáridos se realizó como la describió Parodi (252).

3.3. Sistemas de incubación.

3.3.1. Incubación en pequeña escala.

Las incubaciones realizadas para estudiar la incorporación de (¹⁴C)galactosa a distintos componentes se efectuaron normalmente a 30°C durante 30 minutos y utilizando dos mezclas de incubación ligeramente diferentes.

Mezcla A:

Buffer Tris-ClH pH=7,6	0,1 molar
Tritón X-100	1,2%

Microsomas de hígado 2 a 5 mg
(excepto dónde se indica otra preparación
enzimática)

Volumen final 50 a 100 ul

Con esta mezcla de incubación se utilizó Dol-P-(¹⁴C)Gal como dador en las cantidades que se indicaron en cada caso (aproximadamente 10.000 cpm).

Cuando además se investigó la incorporación de (¹⁴C)Gal a proteína se añadió Cl₂Mn, 7-10 mM.

Esta mezcla se utilizó para estudiar la transferencia de Dol-PP-oligosacáridos a proteína.

Mezcla B:

Buffer Tris-maleato pH=7,8	0,1 molar
Tritón X-100	1,2 a 1,8%
MSH	100 mM
Cl ₂ Mn	10 mM
Microsomas de hígado	2 mg
Volumen final	50 ul

En esta mezcla de incubación se utilizó Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal o Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc como dador, según se indicó en cada caso.

En ambas mezclas, los solventes orgánicos usados para solubilizar los lipidoazúcares exógenos fueron evaporados por corriente de N₂ antes del agregado de los demás componentes de la mezcla de incubación. Las reacciones se detuvieron por el agregado de butanol (Método A), cloroformo: metanol (Método B) o TCA 5% (Método C), como se describe a continuación.

3.3.1.1. Método A: A la mezcla de incubación se le agregó 0,1 ml de butanol, se agitó en vortex, se centrifugó en centrífuga clí-

nica durante 5 minutos y se separó la fase superior orgánica. A la fase inferior acuosa se la extrajo tres veces más con 100, 50, y 50 μ l de butanol respectivamente. A la fase acuosa se le agregó 1 ml de TCA 5% y el precipitado formado se procesó por dos caminos alternativos:

A₁: se lo filtró al vacío por papel de fibra de vidrio, los filtros se lavaron varias veces con TCA 5% frío y se secaron con lámpara IR. Se midió la radioactividad.

A₂: se lavó por centrifugación 3 veces con TCA 5% frío y una vez con éter sulfúrico. Se secó con N₂. Este material se trató después como se indicó en cada caso.

3.3.1.2. Método B: La reacción se detuvo por el agregado de metanol y cloroformo hasta tener una relación cloroformo: metanol: agua de 3:2:1 (249). Se centrifugó a máxima velocidad en centrifuga clínica durante 5 minutos. En estas condiciones se formaron tres fases; una fase inferior orgánica, una fase superior acuosa y una interfase proteica formada por la enzima desnaturalizada. Se separó la fase superior acuosa con pipeta Pasteur y se le dio un pequeño golpe al tubo, con lo cual la interfase quedó como un disco adherido a la pared del tubo; se procedió luego a separar la fase orgánica volcándola en otro tubo. La interfase se lavó tres veces más con 0,2 ml de Cl₂Mg 4 mMolar, 0,4 ml de metanol y 0,6 ml de cloroformo. Se combinaron las fases orgánicas por una parte y las fases acuosas por la otra. Cuando se usa Dol-P-(¹⁴C) Gal como sustrato, en la fase orgánica quedó el exceso que no reaccionó y en la fase acuosa los posibles productos de ruptura hidrosolubles. La interfase proteica lavada se extrajo tres veces con 0,5 ml de cloroformo: metanol: agua (1:1:0,3). A los extrac-

tos combinados se los llamó "extracto 1103". Este extracto contenía el Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal formado. Cuando se usó Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal como dador en este extracto quedó el exceso de sustrato que no reaccionó.

Para determinar la formación de glicoproteína, al residuo de la extracción con solvente 1103 se le agregó 1 ml de TCA 5% y se calentó durante 10 minutos a 95°C en baño de agua, agitando esporádicamente para evitar que el contenido del tubo se derramara. Con este tratamiento se hidrolizan los doliquil derivados que podrían quedar retenidos en la proteína liberando la fracción azúcar radioactiva que es soluble en agua. Luego de enfriar en baño de hielo durante 5 minutos, el contenido de los tubos se procesó por dos caminos alternativos: B₁) filtrándolos por fibra de vidrio y lavando con TCA 5% frío como en el método A₁; B₂) centrifugando, desechando el sobrenadante y lavando el precipitado 3 veces con 0,5 ml de TCA 5% frío, una vez con 1 ml de éter sulfúrico, y 2 veces con metanol. Este precipitado se secó con N₂ y se trató después como se indicó en cada caso.

3.3.1.3. Método C: Este método se aplicó cuando lo único que interesaba determinar era la radioactividad unida a proteína. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA 5% y luego se calentó durante 10 minutos a 95°C en baño de agua como se indicó en el Método B. De aquí en adelante se siguieron los mismos pasos que en dicho método, es decir, cuando se separó el precipitado por filtración se llamó Método C₁, y cuando se separó por centrifugación, Método C₂.

3.3.2. Incubación en gran escala.

Se usó para obtener proteína marcada con (^{14}C)Gal a partir

de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal.

Se incubaron 4 tubos en una escala 10 veces mayor que la descrita en la sección 3.3.1. Se usó la mezcla de incubación B y Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal purificado por columna de Sephadex LH 20 (65.000 cpm por tubo). La concentración de Tritón X-100 fue de 2%. Los tubos se procesaron según el método B₂ descrito en la sección 3.3.1.2. Se obtuvieron 16.000 cpm de proteína marcada con (¹⁴C)Gal en total.

3.4. Preparación de standards.

3.4.1. Preparación de oligosacáridos-Glc marcados con (³H) ó (¹⁴C) a partir del dolicol-difosfato-oligosacárido.

Los extractos del solvente 1103 obtenidos por los métodos I, II ó III descritos en la sección 3.2.7. se llevaron a seco bajo corriente de nitrógeno en tubos de vidrio. Se añadió al tubo 0,3 ml de agua destilada, 1 gota de indicador Timol Blue y se agitó vigorosamente en vortex para resuspender el lípido azúcar. Se añadió ClH 0,5 N hasta llevar el pH a 2 (el indicador viró al color anaranjado). Se realizó la hidrólisis ácida suave calentando durante 10 minutos a 100°C. Se enfrió. Se agregó 0,6 ml de metanol y 0,9 ml de cloroformo. Se agitó en vortex y se centrifugó 5 minutos en centrífuga clínica a velocidad máxima. Se separaron dos fases. La fase superior acuosa contenía los Glc-oligosacáridos libres marcados. En estas condiciones se recuperó en la fase acuosa el 90 a 100% de la radioactividad extraída en el solvente 1103.

3.4.2. Separación de los oligosac-Glc₁, Glc₂ y Glc₃ por cromatografía en papel.

Los oligosacáridos libres obtenidos en la fase superior

acuosa luego de la hidrólisis ácida suave descrita en 3.4.1. se concentraron por evaporación con corriente de aire tibio en una cazoleta de vidrio y se sembraron en papel Whatman N°1 para cromatografiarlos en forma descendente durante 5 a 7 días en el solvente E. En estas condiciones se pudo separar con buen grado de resolución a los oligosacáridos con una, dos o tres glucosas denominados oligosac-Glc₁, Glc₂ ó Glc₃, respectivamente, los que se localizaron con un radioescaner y se recuperaron por elución del papel con agua.

3.4.3. Preparación de maltooligosacáridos.

Se hidrolizaron 150 mg de amilosa con 30 ml de SO₄H₂ 0,1 N durante 60 minutos a 100°C. Se añadió 150 ml de SO₄H₂ 0,1 N y se continuó la hidrólisis 10 minutos más. Se neutralizó el SO₄H₂ con CO₃Ba. Se centrifugó en frío y el sobrenadante se concentró en un aparato de Craig hasta 2 a 4 ml. Se usaron 5 a 10 µl de esta solución como standard de maltooligosacáridos.

3.5. Tratamientos enzimáticos.

3.5.1. α-Manosidasa.

Se usó α-manosidasa de "Jack bean" purificada hasta la etapa de la columna de DEAE-celulosa (253). El tratamiento se hizo en buffer trietanol amina-acetato 0,05M pH=4,5 durante 48 horas a 37°C bajo atmósfera de tolueno. Se usaron 0,3 unidades de enzima. Se inactivó por agregado de metanol y cloroformo como para obtener una composición cloroformo: metanol: agua (3:2:1). Se separaron ambas fases por centrifugación. La fase superior se procesó como se indica en cada caso.

3.5.2. β-galactosidasa.

Se usó β-galactosidasa (Sigma grado III). El tratamien-

to se hizo en buffer imidazol-ClH pH=7,2 0,05 M. Se incubó 3 horas a 30°C. Se usaron 0,16 U de enzima. Se inactivó por agregado de metanol y cloroformo como para obtener la relación cloroformo: metanol: agua (3:2:1). Se separaron ambas fases por centrifugación y la fase superior se cromatografió con el solvente A.

3.5.3. α-galactosidasa.

Se usó α-galactosidasa de *Aspergillus niger* de Sigma. El tratamiento se hizo en buffer citrato de sodio 0,05 N pH=4,2 (25). Se incubó 3 horas a 30°C. Se usaron 0,1 U de enzima. Se inactivó de igual manera que en el caso 3.5.2.

Nota: En todos los casos, se verificó la actividad enzimática usando los p-nitro-fenil derivados correspondientes como sustratos. Se midió a 440 nm el desarrollo de color amarillo en la mezcla de reacción. El agregado de CO_3Na_2 2% intensificó dicha coloración.

3.5.4. Endo-N-acetilglucosaminidasa H.

Se usó endo β-N-acetilglucosaminidasa H de *Streptomyces griseus* (Miles Laboratories, Inc.). El tratamiento se hizo en buffer trietanol-amina-acetato 0,05 M pH=5,5 (211). Se añadió 0,06 U de enzima y se incubó 1 día a 37°C bajo atmósfera de tolueno. Se inactivó por agregado de medio volumen de etanol, se centrifugó y el sobrenadante se procesó como se indicó en cada caso.

3.5.5. Tratamiento con proteasa.

Se usó proteasa tipo VI de *Streptomyces griseus*, repurificada (Sigma).

La proteína a digerir se resuspendió en buffer Tris-ClH 100 mM pH=8,2 con 10 mM de Cl_2Ca , se agregaron 2 mg/ml de proteasa (5U/mg). Usualmente queda una relación final de enzima/proteína a digerir del 1%. Se incubó 7 a 10 días a 37°C bajo atmósfe-

ra de tolueno con control del pH y agregado de 2 mg de proteasa cada 2 días. Se centrifugó el hidrolizado final y el sobrenadante límpido conteniendo los glicopéptidos se cromatografió en una columna de Biogel-P-6 de 98 cm x 1,0 cm como se describe en 3.7.4.

3.5.6. Medición de la actividad de manosidasas en microsomas de hígado.-

Para medir la actividad de las manosidasas de Golgi se usó buffer A (fosfato de sodio 0,05 M pH=6,5; Cl_2Mg 5 mM), y para medir la actividad de las manosidasas lisosomales se usó buffer B (fosfato - citrato 0,05 M pH=4,5; Cl_2Mg 5 mM). Como sustrato se usó p-nitro α D-metilmanósido 10 mM. Se usaron 4 mg de microsomas de hígado en un volumen de 100 μ l. Se incubó durante una hora a 37°C. Se inactivó agregando CO_3Na_2 2%, el cual además intensificó el color.

Cuando se usaron como sustratos los oligosacáridos radioactivos, se partió aproximadamente de 5.000 cpm de cada una de las muestras y la incubación se efectuó en el buffer A. Se incubó durante 1 hora a 37°C. El volumen de incubación fue de 100 μ l. Para inactivar la reacción se añadió un volumen de metanol. Se centrifugó y el sobrenadante se procesó como se indica en cada caso.

3.6. Tratamientos químicos.

3.6.1. Hidrólisis ácida suave.

La muestra se llevó a seco bajo corriente de N_2 o a presión reducida. Se resuspendió añadiendo 300 μ l de agua y agitando vigorosamente con vortex. Se agregó 1 gota de Timol Blue. Se llevó a pH=2 con ClH 0,5 N (el indicador viró del amarillo al naranja). Se calentó 10 minutos a 100°C en baño de agua. Se enfrió y se

añadieron 600 μ l de metanol y 600 μ l de cloroformo. Se agitó, se centrifugó, y las dos fases que se formaron (una fase superior acuosa y una fase inferior orgánica) se las separó con pipeta Pasteur y se las llevó a seco en cazoletas de vidrio con corriente de aire caliente. Se agregaron unas gotas de agua destilada a cada cazoleta y se las volvió a llevar a seco. Este procedimiento se llevó a cabo 2 ó 3 veces y tuvo por finalidad eliminar el ClH para que no molestara al cromatografiar los productos en los distintos solventes. Se midió la radioactividad de las cazoletas en un contador de flujo. Las muestras hidrolizadas pudieron ser recuperadas por lavado de las cazoletas con agua destilada. La fase orgánica se desechó.

3.6.2. Hidrólisis ácida total.

La muestra llevada a seco bajo corriente de N_2 se trató con ácido trifluoro acético (TFA) 3 N a 100°C durante 4 horas en tubo de vidrio cerrado a la llama; el TFA se eliminó por secado repetido bajo corriente de aire caliente en cazoleta de vidrio.

Los productos recuperados de la cazoleta por lavado con agua se analizaron por cromatografía en papel Whatman N°1 con solvente A durante 48 horas con los estándares internos que se indicaron en cada caso.

3.6.3. Tratamiento alcalino reductor (125).

A la muestra llevada a seco en un tubo de plástico se la resuspendió en 160 μ l de agua destilada. Se añadieron 40 μ l de NaOH 10 N y 8 mg de borohidruro de sodio (las concentraciones finales fueron: NaOH 2 N y BH_4Na 1 N). Se tapó el tubo y se calentó 6 horas a 100°C. Se dejó enfriar. Se agregó 1 gota de indicador rojo congo y se neutralizó con AcoH gacial hasta viraje del indicador.

La muestra fue desalada pasándola por una columna de biogel P₂ equilibrada en buffer acetato de piridina 0,1 M pH=5 (sección 3.7.3.). Se eluyó con el mismo buffer y se recogieron fracciones de 0,5 a 1 ml. Se midió radioactividad en alícuotas de las distintas fracciones y se combinaron los tubos que la contenían.

3.6.4. Acetolisis.

Se usó el método de Kocourek y Ballou modificado (255).

La mezcla acetilante contenía 0,5 ml de ácido acético glacial, 0,5 ml de anhídrido acético y 0,05 ml de SO₄H₂ concentrado.

La muestra se llevó a seco, se disolvió en 0,25 ml de mezcla acetilante, se cerró el tubo a la llama y se dejó 3 horas a 55°C.

Se agregó 1 ml de piridina anhidra y se concentró hasta aproximadamente 0,3 ml. Esta operación se repitió 3 veces, llevando en la última el material hasta casi seco (quedó un residuo de característica siruposa). Se dejó durante una noche en desecador. Se agregó 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, se agitó bien con vortex y se separó la fase acuosa superior. La fase inferior clorofórmica se lavó con 1 ml de agua varias veces (aproximadamente 7 veces) hasta que los lavados fueron neutros y luego se llevó a seco bajo corriente de N₂. Se agregaron 0,2 ml de metanol y 60 µl de metóxido de sodio (25 mg de Na en 5 ml de metanol). Se dejó 30 minutos a 30°C. Se finalizó la reacción mediante el agregado de resina Dowex 50 x 8 hasta que se observó neutralidad frente al indicador Azul de Bromotimol. Se centrifugó, se pasó el sobrenadante a otro tubo, se lavó la resina varias veces con 0,1 ml de agua destilada y se combinaron los sobrenadantes. Este ex-

tracto contenía los productos de acetólisis desacetilados.

3.6.5. Oxidación con periodato.

Se realizó la oxidación con metaperiodato de sodio Mallinkrodt (IO_4Na) en las condiciones descritas por Fales y colaboradores (256).

La muestra se disolvió en 0,1 ml de agua, se le agregó 0,1 ml de metaperiodato de sodio 0,2 M y se dejó 48 horas a 4°C en oscuridad, luego se le agregó 10 μl de etilenglicol y se dejó 1 hora a temperatura ambiente.

Para determinar la cantidad de ácido fórmico formado, 50 μl de la muestra oxidada se sometieron a electroforesis en papel en buffer K (tris-ClH 0,1 M, pH=7,8). La electroforesis se realizó a 4°C con una corriente constante de 2 mAmp por tira de papel de 3 cm de ancho durante 40 minutos, luego se secaron las tiras a temperatura ambiente, se cortaron en bandas de 1 cm y se determinó la radioactividad.

3.6.6. Permetilación.

Se realizó por el método de Hakomori (256), con algunas modificaciones.

Para este método se utilizó metilsulfinilación para generar el alcóxido de oligo o polisacáridos antes de agregar el agente metilante, yoduro de metilo.

Reactivos:

-Dimetilsulfóxido (DMSO). El dimetilsulfóxido se agitó en presencia de H_2Ca a 40°C durante 30 horas y se destiló a aproximadamente 20 mm Hg (temperatura de ebullición 72°C). Se conservó en desecador al vacío.

-Hidruro de sodio (HNa). Se utilizó hidruro de sodio Sigma sin

aceite mineral. Se conservó en desecador al vacío.

-Ioduro de metilo (IME) (Fluka o Sigma). Se conservó en heladera (4-8°C).

Preparación del dimetilsulfinilanión (DMSA):

A 15 ml de DMSO, contenidos en un tubo con salida lateral, y sumergido en un baño de vaselina a 65-68°C, se le agregaron 750 mg de HNa, con agitación y en atmósfera de N₂. Luego de 2 horas la suspensión se centrifugó a temperatura ambiente. Se conservó con una capa de vaselina líquida a -20°C. En estas condiciones la estabilidad fue de aproximadamente 1 mes.

La muestra se llevó a seco en un tubo cónico de paredes gruesas de 0,6 ml de capacidad. Por cada mg de muestra se agregó 1 ml de DMS (con muestras radioactivas se redujo la escala tres veces). Se sonicó (Sonifier modelo W 140) al máximo de potencia en tres períodos de 2 minutos con intervalos de 1 minuto. La solución se transfirió a un tubo de ensayo, conteniendo una barra magnética, se agregó 1 volumen de DMSA y se agitó en ambiente de N₂ durante 3 horas. Se agregó 1 volumen de IME y se continuó agitando durante 2 horas más. La reacción se detuvo por agregado de 2 ml de agua, se agitó con vortex y la solución se extrajo con 2 ml de Cl₃CH. Las fases clorofórmicas reunidas se lavaron por centrifugación 5 veces con 6 ml de agua cada vez; se transfirieron a un tubo de 13 x 100 mm y se llevaron a seco en corriente de N₂.

El material permetilado se hidrolizó resuspendiéndolo con agitación en 1,5 ml de ClH 1 N y calentando el tubo cerrado a la llama durante 4 horas a 100°C. El ClH se eliminó por repetidas evaporaciones a sequedad con evaporador rotatorio. El residuo

final se resuspendió en 100 μ l de agua y se cromatografiaron alícuotas en placa delgada de Silica gel como se describe más adelante (sección 3.7.5.).

3.6.7. Reducción con borohidruro de sodio.

La reducción se efectuó en la forma descrita por García y colaboradores (238). La muestra se disolvió en 0,1-0,2 ml de agua, se agregó 5-10 ml de NaBH_4 y se dejó una noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por agregado de Dowex 50 x 8 (forma H^+) para destruir el exceso de borohidruro y eliminar los cationes, y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se llevó a seco bajo corriente de N_2 y el ácido bórico fue eliminado por sucesivas adiciones de metanol y evaporaciones a sequedad. Se resuspendió en agua y se procedió como se indica en cada caso.

3.7. Cromatografías.

3.7.1. Cromatografía en columna de DEAE celulosa.

3.7.1.1. Columna preparativa: Se usó DEAE celulosa acetato preparada para correr muestras lipídicas según el método de Dankert y colaboradores (259). Se utilizó una columna de 0,7 x 20 cm equilibrada con cloroformo: metanol (1:1). Luego de cargar la muestra, se lavó con 21 ml de cloroformo: metanol (1:1) para eliminar los compuestos neutros. Se eluyó con concentraciones crecientes de AcoNH_4 en cloroformo: metanol (1:1): 0,1-0,2-0,3 y 0,4 molar.

Se recogieron fracciones de 3 ml. Se determinó la radioactividad en cada una de las fracciones midiendo alícuotas de 0,3 a 0,5 ml. Los lípido-monofosfato-azúcares se eluyeron con AcoNH_4 0,1 M. Se unieron las fracciones radioactivas y se desalaron por

el método de Folch modificado, utilizando fase superior teórica sin Cl_2Mg (sección 3.3.1.2.)

3.7.1.2. Columna analítica: Se usó el método descrito por Leloir y colaboradores. Se utilizó una columnita (1,5 x 0,6 cm) de DEAE celulosa, forma acetato en cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3). Se eluyó primero con el mismo solvente y luego con formiato de amonio 10 mM. Se recogieron fracciones de 1 ml. En estas condiciones los dolicol monofosfato azúcares no se pegan, eluyéndose con el solvente 1103; mientras que los dolicol difosfato oligosacáridos se eluyeron con formiato de amonio 10 mM.

3.7.2. Cromatografía en columna de Sephadex L H-20.

Este método se utilizó para purificar Dol-PP-oligosacárido (^{14}C)Gal. Se empleó una columna (0,7 x 86 cm) equilibrada con el solvente cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3). Se eluyó con el mismo solvente. El flujo fue de 0,5 ml cada 5 minutos. Se colectaron fracciones de 0,5 ml. Se determinó la radioactividad midiendo alícuotas de 5 μl . Se obtuvo un solo componente, se unieron las fracciones que contenían radioactividad.

3.7.3. Cromatografía en columna de Bio gel P 2 (200-400 mesh).

Esta técnica se empleó para eliminar sales de varios tipos de muestras. Se utilizó una columna (1,2 x 12 cm) equilibrada en buffer acetato de piridina 0,1 M pH=5,3. Se eluyó con el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 0,5 a 1 ml directamente en cazoletas de vidrio. Se llevaron a sequedad bajo corriente de aire caliente y se midieron en un contador de flujo. Se usó dextrano azul (4 mg) y Cl_2Co (200 μmoles) para medir los volúmenes de exclusión y de inclusión respectivamente. Las muestras desaladas

radioactivas, se eluyeron de las cazoletas con agua y se procesaron como se indicó en cada caso.

3.7.4. Cromatografía en columna de Bio gel P 6 (50-100 mesh).

Se utilizó para purificar glicopéptidos una columna de Bio gel P 6 (1 x 98 cm) equilibrada en buffer acetato de piridina 0,1 M pH=5,3. Se eluyó con el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 1 ml. El flujo fue de 1 ml cada 3 minutos. Los volúmenes de exclusión total y de inclusión total se determinaron por los volúmenes de elución del dextrano azul (4 mg) y del Cl_2Co (200 u moles) respectivamente. Se determinó la radioactividad midiendo alícuotas (0,1 ml) de cada fracción. Se combinaron las fracciones radioactivas.

3.7.5. Cromatografía y electroforesis en papel.

Se utilizó papel Whatman N°1.

Los solventes empleados fueron los siguientes:

A: Butanol - piridina - agua (6/4/3) (V/V) (248).

B: Butanol - piridina - agua (4/3/4) (V/V) (260).

C: Isopropanol - ácido acético - agua (27/4/9) (V/V) (246).

D: Etanol - ácido acético 1 M - acetato de amonio 1 M (75/26/4) (V/V) (247).

E: N-propanol - nitrometano - agua (5/2/4) (99).

F: Benceno - acetona - agua - NH_3 (50/200/1/1,35) (88).

G: Molibdato de amonio 0,1 M pH=5 (261).

H: Amoníaco 3 M en etanol 80% (V/V) (238).

I: Carbonato - bicarbonato de sodio 0,25 M pH=9,8 (262).

J: Acido fórmico - agua (5% V/V) (263).

K: Tris - ClH 0,1 M pH=7,8 (256).

Para el solvente I se usó la técnica ascendente.

El solvente F se utilizó para cromatografía en placa delgada. La electroforesis en el buffer J se efectuó con un voltaje de 1000 Volts durante 3 a 6 horas. Se pusieron los estándares indicados en cada caso.

La electroforesis en el buffer I se efectuó con un voltaje de 600 Volts durante 4 horas. Se pusieron los estándares indicados en cada caso.

La electroforesis en el buffer G se efectuó con un voltaje de 1000 volts durante 3 horas. Los estándares se indican en cada caso.

Para la ubicación de los azúcares reductores se usó el nitrato de plata alcalino (264).

Para revelar amino ácidos se usó ninhidrina 0,25% en etanol (265). El papel se calentó 10 minutos a 100°C. Los amino ácidos dan un color rosa característico.

3.8. Medida de la radioactividad.

3.8.1. Medida de la radioactividad en papel.

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 (266) 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 eficiencia de conteo para el (^{14}C) fue de 80% y para el (^3H) 10%.

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 ve-

ces con éter etílico para eliminar el tolueno y poder así eluir las sustancias medidas.

Para determinar la radioactividad unida a proteína se disgregó la proteína con 200 ul de protosol calentando unos minutos a 60°C y se neutralizó con papel de AcOH glacial. Se midió con solución de Bray.

3.8.2. Contaje diferencial de 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 --- ∞

3.8.3. Medida de la radioactividad en solventes orgánicos:

Cuando las mezclas provenían de particiones de cloroformo: metanol: agua (3:2:1) o de extractos (1:1:0,3) la radioactividad se determinó en cazoletas de vidrio con un contador de flujo y escalímetro Alfa nuclear modelo S.T.P. Cuando las muestras se quisieron recuperar, las cazoletas se eluyeron con los solventes indicados en cada caso.

La eficiencia del contaje fue de 40% para el (^{14}C).

4. RESULTADOS.

4.1. Incorporación de (^{14}C) galactosa a partir de Dol-P- (^{14}C) Gal a material insoluble en TCA.

Como ya se mencionó en la sección "antecedentes recientes", nuestro objetivo fue encontrar un sistema enzimático y condiciones de incubación tales que permitieran transferir la galactosa a partir de Dol-P- (^{14}C) Gal a otros componentes. Teniendo en cuenta que interesaba encontrar transferencia de galactosa a glicoproteínas, se investigó en primer lugar su incorporación a material insoluble en TCA.

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos usando preparaciones enzimáticas de dos tejidos distintos de rata. Como puede observarse en ambos, se obtiene una ligera incorporación de radioactividad a material insoluble en TCA por encima de los controles.

Utilizando enzima de microsomas de hígado se trató de optimizar esta transferencia variando las condiciones de incubación. El efecto de distintas concentraciones de detergente se muestra en la fig. 19. Se observa que las mejores incorporaciones se obtuvieron con una concentración de Tritón de 1%. Usando esta concentración de detergente se varió la temperatura, y la mejor transferencia se obtuvo incubando a 30°C (Tabla 5).

Tabla 4: Incorporación de (¹⁴C)galactosa a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal a material insoluble en TCA.

Fuente de enzima	Tiempo de incubación (min)	Material insoluble en TCA	
		cpm	pmol/mg prot
Cerebro	30	219	1,3
"	control no incubado	82	0,4
Hígado	30	611	0,6
"	control no incubado	277	0,25

Se empleó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.) pero utilizando 0,1% de Tritón X-100, 7mM de Cl₂Mn y 16,5 pmoles de Dol-P-(¹⁴C)Gal (268 uCi/uM en un volumen final de 60 ul. La enzima de cerebro consistía en 0,4 mg del precipitado de 39.000 X g (sección 3.1.3.) y la de hígado en 2 mg de microsomas (sección 3.1.2.). En ambos casos se incubó a 37°C. Los controles se efectuaron deteniendo inmediatamente la incubación con 100 ul de butanol luego de agregar la enzima. En todos los casos se procesó por el método A₁ (sección 3.3.1.1.).

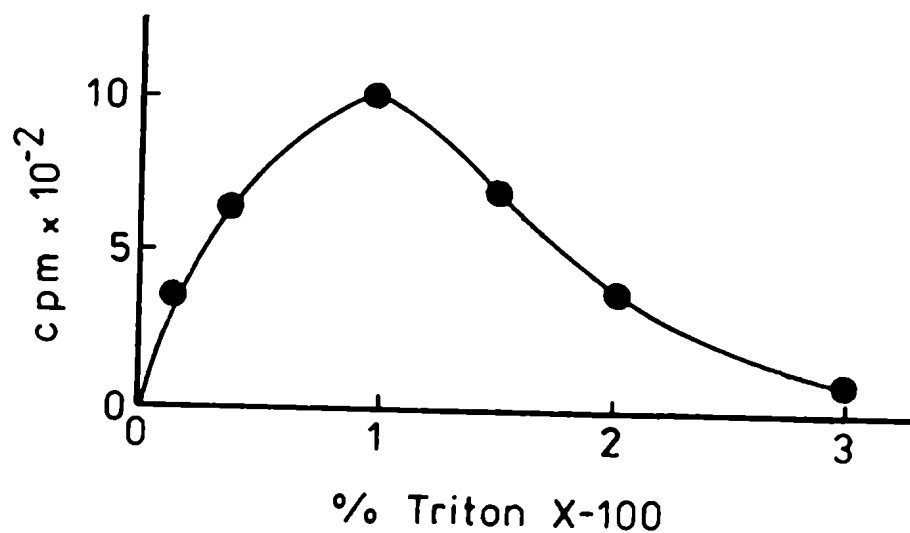


Fig. 19: Efecto de la concentración de Tritón X-100 sobre la incorporación de galactosa a material insoluble en TCA. Las condiciones de incubación fueron similares a las indicadas en la leyenda de la Tabla 1, con la salvedad que se usaron las concentraciones de Tritón X-100 indicadas. Se procesó por el método A₁ (sección 3.3.3.1.).

Tabla 5: Efecto de la temperatura sobre la incorporación de galactosa a material insoluble en TCA.

Temperatura (°C)	Incorporación (cpm)
20	900
30	1300
37	450

Las condiciones de incubación fueron similares a las indicadas en la leyenda de la fig. 19, salvo que la concentración de Tritón X-100 se fijó en 1%, a las temperaturas indicadas en cada caso. Se procesó por el método A₁ (sección 3.3.1.1.).

Se estudió también la dependencia de la incorporación de (¹⁴C)galactosa a material insoluble en TCA con el tiempo de incubación (fig. 20). La incorporación aumentó hasta llegar a una meseta a los 30-60 minutos y a tiempos de incubación mayores comenzó a decaer.

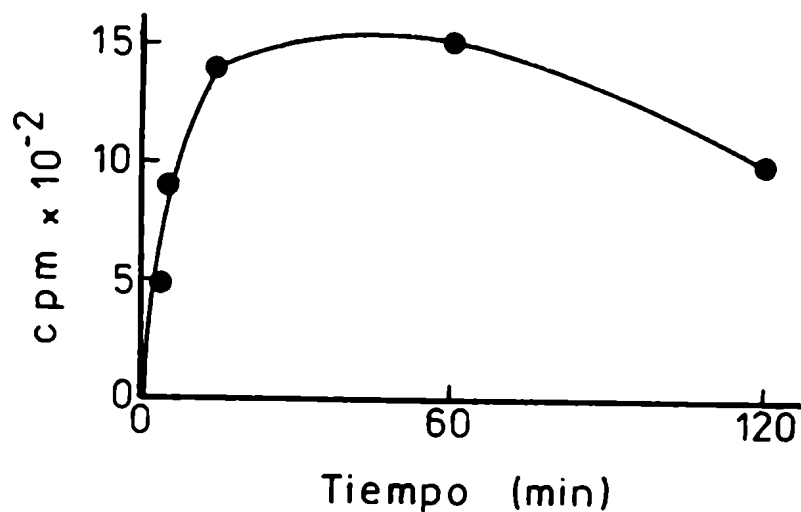


Fig. 20: Incorporación de (¹⁴C)galactosa a material insoluble en TCA en función del tiempo.

Las condiciones de incubación son similares a las indicadas en la leyenda de la fig. 19.
Se fijó la concentración de Tritón X-100 en 1% y la temperatura en 30°C.
Se procesó por el método A₁ (sección 3.3.1.1.).

4.2. Análisis de la radioactividad incorporada a material insoluble en TCA.

Se trató de investigar si la radioactividad incorporada en el material insoluble en TCA era (^{14}C)galactosa. Para ello, luego de obtener este material en forma análoga a la ya vista (sección 4.1.), se sometió una alícuota a la hidrólisis ácida total (sección 3.6.2.), y se analizó el azúcar liberado por cromatografía desarrollada con el solvente A (fig. 21A). El radiocromatograma mostró un único pico de radioactividad que coincidió con un estándar interno de galactosa.

Aclarado este punto, se pensó que parte de la marca incorporada se podía deber a doliquil-difosfato-oligosacáridos. Se sabe que estos compuestos son fácilmente hidrolizables por tratamiento ácido suave liberando el oligosacárido (sección 1.4.3.). Aprovechando esta propiedad se sometió otra alícuota del material insoluble en TCA a este último tratamiento. Gran parte de la radioactividad fue liberada en forma de un compuesto soluble en fase acuosa. El radiocromatograma de este compuesto en el solvente A dio un único pico que no se movió del origen (fig. 21B). Este mismo compuesto eluido y vuelto a cromatografiar en el solvente B migró un poco menos que un estándar de maltooligosacáridos de 11 unidades (fig. 21C) y aproximadamente en la posición en que corrió el producto de hidrólisis ácida suave del Dol-PP-oligosac-Glc (sección 1.4.3.2.b).

Estos resultados concluyeron que la galactosa se había incorporado como tal, es decir, que no había epimerización ni otra alteración en el azúcar y que se hallaba unida en parte a un compuesto que podía ser un oligosacárido. A este compuesto se lo llamó tentativamente "oligosacárido- (^{14}C)Gal."

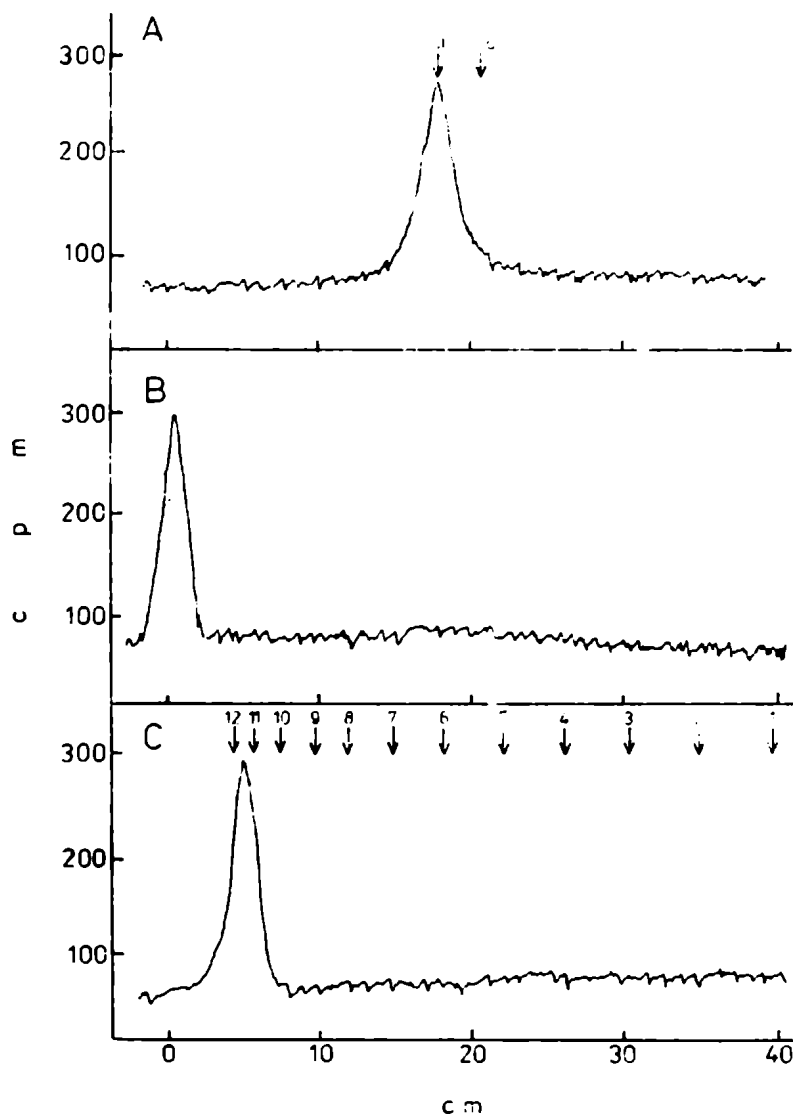


Fig. 21: Análisis de la radioactividad incorporada a material insoluble en TCA.

Se obtuvo material insoluble en TCA a partir de Dol-P-(^{14}C)Gal en forma análoga a la descrita en la leyenda de la fig. 20. Se procesó por el método A₂ (sección 3.3.1.1.). Una alícuota se sometió a hidrólisis ácida total (sección 3.6.2.) y la radioactividad liberada a la fase acuosa se cromatografió en el solvente A durante 2 días (A). A otra alícuota se le hizo una hidrólisis ácida suave (sección 3.6.1.) y el producto soluble en agua se cromatografió en el solvente A durante 2 días (B). Este mismo producto fue eluído y vuelto a cromatografiar en el solvente B durante 1 día (C).

4.3. Fraccionamiento del material insoluble en TCA.

Demostrado que se incorporaba galactosa a material insoluble en TCA, y que parte de esa galactosa se hallaba unida a un compuesto que podría ser un oligosacárido, se investigó la existencia de compuestos intermediarios asociados a dolicol. Para ello, se averiguó si se incorporaba galactosa a material soluble en cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3), un solvente desarrollado específicamente para extraer doliquil-difosfato-oligosacáridos (89), y al que en lo sucesivo llamaremos 1103. Se realizaron dos incubaciones en las condiciones óptimas (fig. 20). Luego de inactivar y eliminar el exceso de Dol-P-(^{14}C)Gal con butanol, se procesaron de diferente forma; en un caso se midió el material insoluble en TCA en forma análoga a la ya vista (Tabla 6, Fracción A) y en el otro caso el precipitado se extrajo con 1103 (Tabla 6, Fracción B), y el residuo se trató con TCA caliente (Tabla 6, Fracción C). Se observó que el material insoluble en TCA (Fracción A) estaba formado por lo menos por dos tipos de compuestos, uno de carácter lipídico soluble en 1103 (Fracción B) y otro insoluble (Fracción C). Este último además resultó ser resistente al tratamiento con TCA 5%, 10 min a 95°C, propiedad característica de una glicoproteína. Estos resultados son similares a los presentados por Behrens y col. (89) que comunicaron la transferencia de (^{14}C)glucosa a partir de Dol-P-(^{14}C)Glc a un aceptor endógeno dando Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc (sección 1.4.3.2.b).

Nota: conviene aclarar que las incorporaciones en las distintas fracciones no variaron si el exceso de sustrato (Dol-P-(^{14}C)Gal) se eliminaba por sucesivos lavados con cloroformo-metanol (2:1) en lugar de usar butanol.

Tabla 6: Incorporación de marca a distintas fracciones.

Fracción	Incorporación	
	cpm	pmol/mg prot.
A: material TCA precipitable	1.700	1,75
B: material extraíble con 1103	1.450	1,5
C: material insoluble en TCA caliente	300	0,3

Se efectuaron dos incubaciones durante 30 min en las condiciones indicadas en la leyenda de la fig. 20, utilizando 16,5 pmoles de Dol-P-(¹⁴C)Gal. Uno de los tubos se procesó según el método A₁ (sección 3.3.1.) y se obtuvo el residuo insoluble en TCA (Fracc. A), el otro tubo se inactivó y se eliminó el exceso de sustrato con butanol, luego se extrajo con 1103 (Fracc. B) y el residuo se trató con TCA 5%, 10 min a 100°C (Fracc. C).

4.4. Transferencia de galactosa con preparados de diferentes tejidos y utilizando diferentes dadores.

Se estudió si en preparaciones enzimáticas de otros tejidos, además de hígado, ocurría también la transferencia de galactosa a una fracción soluble o extraíble en 1103 y a otra insoluble en TCA (Tabla 7). Se observó que preparaciones de cerebro, timo y páncreas catalizaban estas transferencias (Tabla 7, líneas 1, 2, y 3). Si bien el tejido más activo fue el cerebro, de aquí en adelante se trabajó con enzima de microsomas de hígado, ya que los resultados obtenidos con enzima de cerebro no fueron del todo reproducibles.

Se investigó también la transferencia de (^{14}C)galactosa a partir de otros dadores. Uno de ellos fue el ficaprenol-monofosfato-(^{14}C)galactosa, un prenol-monofosfato-azúcar obtenido con la misma enzima de *Acetobacter xylinum* utilizada para la síntesis del Dol-P-(^{14}C)Gal (sección 2), pero usando ficaprenol-monofosfato y UDP-(^{14}C)Gal (sección 2). La parte lipídica está constituida por un prenol no saturado del tipo de los descritos en procariotes (sección 1.4.3.). El ficaprenol-monofosfato-(^{14}C)galactosa actuó como dador de (^{14}C)galactosa a material soluble en 1103 menos eficientemente que el Dol-P-(^{14}C)Gal y no se detectó radioactividad en material insoluble en TCA (Tabla 7, línea 4).

Como ya se mencionó más arriba, y en la sección 2, la síntesis de Dol-P-(^{14}C) se puede esquematizar como sigue:



Se pensó que si en el sistema de microsomas de hígado tenía lugar este proceso, el Dol-P-(¹⁴C)Gal usado como sustrato podía producir UDP-(¹⁴C)Gal, pues la reacción es reversible. Por otra parte, el UDP-(¹⁴C)Gal se puede epimerizar a UDP-(¹⁴C)Glc, y este último puede transferir glucosa a material soluble en 1103 (sección 1.4.5.). Para descartar esta posibilidad, se siguieron dos caminos: por una parte se utilizó como dador UDP-(¹⁴C)Gal directamente. En este caso, no se observó incorporación de (¹⁴C)galactosa a material soluble en 1103, aun en presencia de Dol-P o Fic-P (Tabla 7, líneas 6, 7, y 8); en cambio se incorporó radioactividad al residuo insoluble en TCA (Tabla 7, líneas 6, 7, y 8), lo que no llamó la atención pues se sabe que este nucleótido-azúcar cede la galactosa directamente a muchas glicoproteínas (sección 1.4.7.5.). Confirmando estos resultados, en otro experimento se incluyó un exceso de UDP-Gal no radioactivo en la mezcla de incubación (Tabla 7, líneas 1 y 5), pero este agregado no interfirió con la transferencia de (¹⁴C)galactosa a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal a ninguna de las dos fracciones. Estos resultados indicaron que en microsomas de hígado de rata el sistema que sintetiza Dol-P-Gal a partir de UDP-Gal y Dol-P está ausente o no es operante bajo las condiciones usadas y que el dador de las galactosas al material soluble en 1103 es el Dol-P-Gal y no el UDP-Gal.

Todos los esfuerzos realizados para observar la síntesis de Dol-P-Gal a partir de Dol-P y UDP-Gal utilizando sistemas de eucariotes dieron resultados negativos.

Tabla 7: Transferencia de galactosa con preparaciones de distintos tejidos y utilizando diferentes dadores.

Sustrato	$(^{14}\text{C})\text{Gal}$ incorporada (pmol/mg prot)	
	Material soluble en 1103	Residuo insoluble en TCA
1) Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$	0,78	0,61
2) Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}^c$	5,25	2,41
3) Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}^d$	0,31	0,21
4) Fic-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}^a$	0,16	0,02
5) Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ + UDPGal (500 pmoles)	0,85	0,62
6) UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}^b$	0,01	0,27
7) UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ + Dol-P (2 ul)	0,01	0,38
8) UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ + Fic-P	0,01	0,37

Se usó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.), a la que se le agregó Cl_2Mn 8 mM. El dador fue el Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ (10.000 cpm = 20 pmoles, salvo en el caso "a", en el que se usó Fic-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ (10.000 cpm = 20 pmoles), o en el caso "b", en el que se usó UDP- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ (140.000 cpm = 20 pmoles).

En "c" se usó enzima de cerebro (sección 3.1.3.); en "d" se usó enzima de timo (sección 3.1.4.); donde no hay aclaración se usó enzima de microsomas de hígado (sección 3.1.2.). Donde se indica se añadió además Dol-P ó UDP-Gal. Las incubaciones se procesan según el método B₁ (sección 3.3.1.2)

4.5. Condiciones óptimas de obtención de material marcado con (^{14}C) galactosa soluble en 1103.

Con el objeto de obtener cantidades adecuadas de material marcado con (^{14}C) galactosa soluble en 1103, se buscaron las condiciones óptimas de incubación para encontrar el máximo de incorporación de (^{14}C) galactosa a partir de Dol-P- (^{14}C) Gal a este material que llamaremos "extracto 1103".

Se estudió primero el efecto de la concentración de detergente (fig. 22). Se obtuvo un máximo de incorporación a una concentración de Tritón X-100 de 1,25%. Debe destacarse que con otras preparaciones enzimáticas, este máximo de incorporación se obtuvo entre 0,6 y 1,2% de Tritón X-100. Por esta razón para cada preparación enzimática se buscaron las condiciones óptimas de detergente.

Se estudió también como variaba la incorporación de galactosa al extracto 1103 en función del tiempo de incubación (fig. 23). Se observó que la incorporación fue aumentando hasta llegar a un máximo a los 30 min y luego se mantuvo constante hasta por lo menos 60 min.

En condiciones óptimas se obtuvo en el extracto 1103 una incorporación de (^{14}C) galactosa de 20% respecto del Dol-P- (^{14}C) gal inicial.

Se estudió también la incorporación de galactosa al extracto 1103 variando la concentración de enzima (fig. 24). Se observó que la incorporación fue aumentando al aumentar la concentración de enzima hasta llegar a los 3 ó 4 mg de proteína, luego comenzó a decaer a concentraciones mayores. Este efecto no

es difícil de explicar si se piensa que estamos usando como fuente enzimática un extracto crudo que puede incluir enzimas que degradan el producto y/o el sustrato.

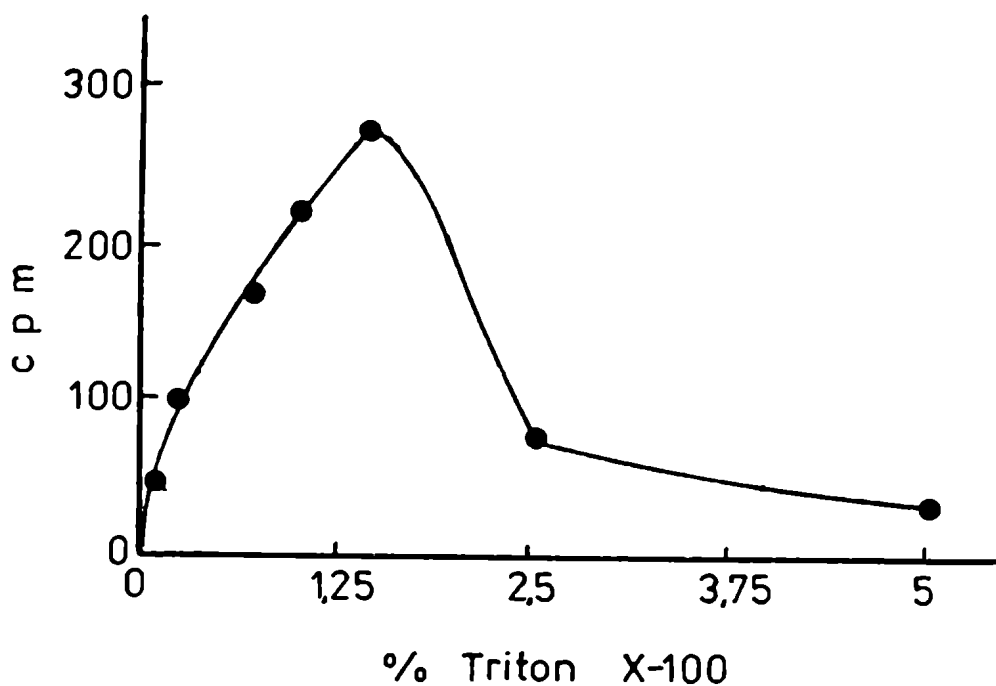


Fig. 22: Efecto de la concentración de Tritón X-100 sobre la incorporación de (¹⁴C)galactosa al extracto 1103.

Se utilizó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.). Se emplearon 16.000 cpm de Dol-P-(¹⁴C)Gal (309 uCi/umol) y 5 mg de enzima de microsomas de hígado en un volumen de 100 ul. Las cantidades de detergente se indicaron en cada caso. Se procesó según el método B (sección 3.3.1.2.). La radioactividad incorporada al extracto 1103 se midió en cazoletas de vidrio (sección 3.8.3.).

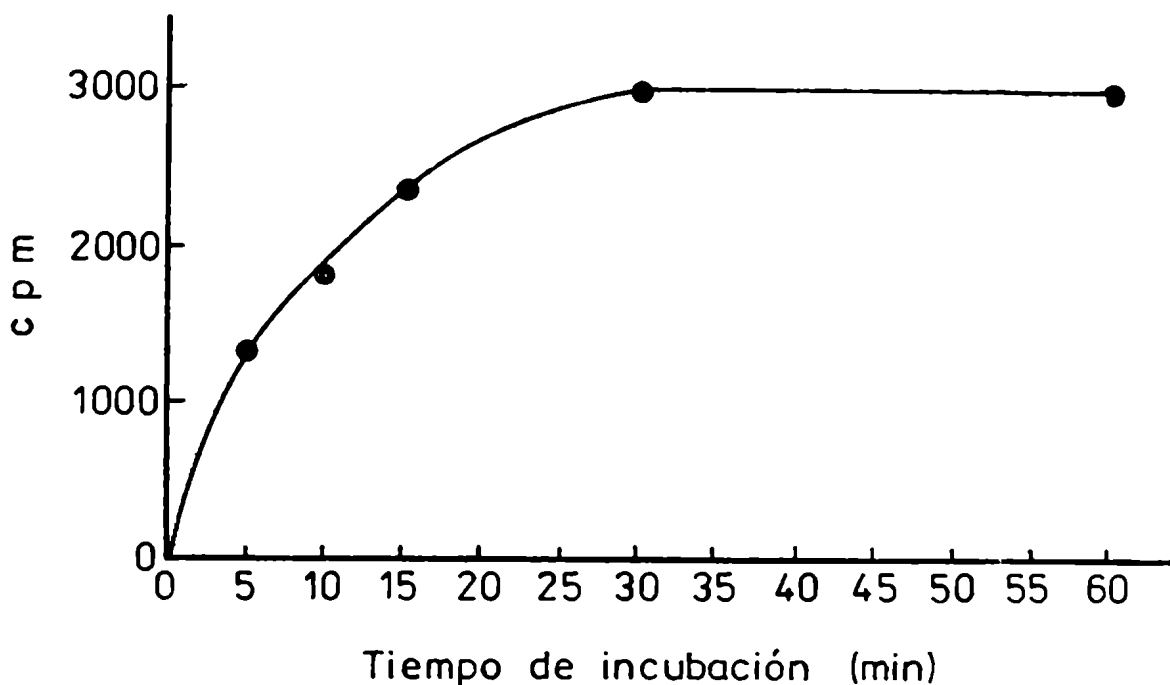


Fig. 23: Incorporación de (¹⁴C)galactosa al extracto 1103 en función del tiempo.

Se utilizó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.) con Tritón X-100 1,25%, 16.000 cpm de Dol-P-(¹⁴C)Gal (309 uCi/umol) y 5 mg de enzima de microsomas de hígado en un volumen final de 100 ul. Los tiempos de incubación fueron los indicados en cada caso. Se procesó según el método B (sección 3.3.1.2.). El extracto 1103 se midió como se indica en la fig. 22.

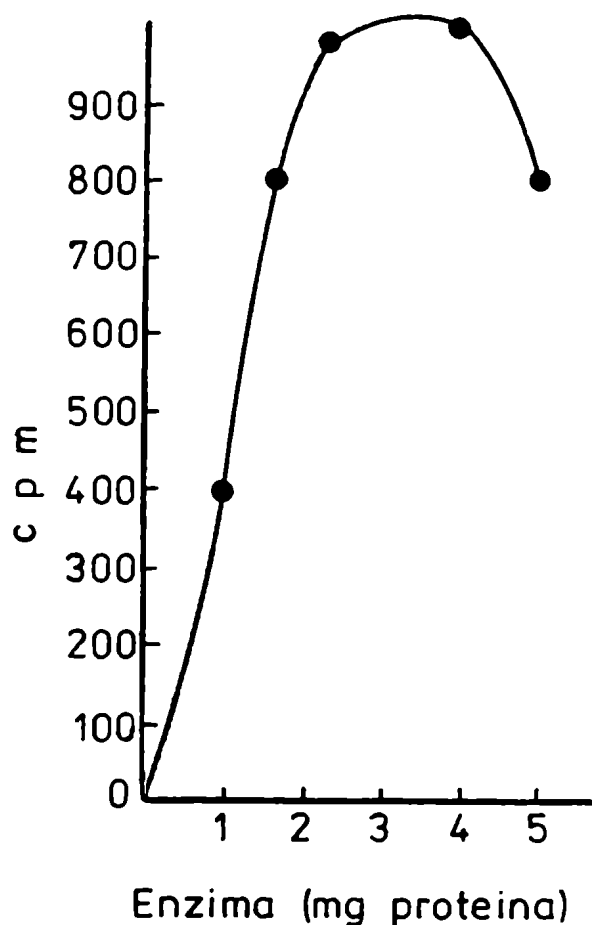


Fig. 24: Incorporación de (^{14}C)galactosa en el extracto 1103
variando la concentración de enzima.

La mezcla de incubación A (sección 3.3.1.) contenía además, 10.000 cpm de Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ (20 pmoles), y las cantidades de microsomas de hígado indicadas en cada caso en un volumen de incubación de 100 ul. El extracto 1103 se obtuvo según el método B (sección 3.3.1.2.). Se midió la radioactividad como en la fig. 22.

Otra de las variables que pareció interesante estudiar fue el efecto de los cationes bivalentes sobre la incorporación de (^{14}C)galactosa al extracto 1103, ya que se sabe que la transferencia de glucosa de Dol-P-Glc a Dol-PP-oligosac-Glc no requería la presencia de dichos cationes (1.4.3.2.b). La incorporación de galactosa al extracto 1103 tampoco se vio influenciada mayormente por la presencia o no de Cl_2Mg 6 mM o EDTA- Na_2 2 mM en la mezcla de incubación (Tabla 8, líneas 1, 3 y 4). A la ligera estimulación observada en presencia de Cl_2Mg (línea 3) no se la consideró significativa, pues empleando otros preparados enzimáticos no se la observó o inclusive el Cl_2Mg produjo una leve inhibición.

Debido a estos resultados se optó por suprimir el agregado de Mg^{++} en la mezcla de incubación a menos que se aclare lo contrario. El Cl_2Mn 8 mM, en cambio, produjo una fuerte inhibición (aproximadamente 50%) en la incorporación de (^{14}C)Gal al extracto 1103 respecto de la obtenida sin ningún agregado (Tabla 8, líneas 1 y 2).

4.5.1. Incorporación simultánea de galactosa y glucosa.

Los resultados anteriores mostraron que similarmente a lo que sucede con la transferencia de glucosa de Dol-P-Glc a Dol-PP-oligosac-Glc, la incorporación de (^{14}C)galactosa a partir de Dol-P-(^{14}C)Gal al extracto 1103 no requiere catión bivalente. Esto sugirió que la galactosa podría competir con la glucosa por el mismo aceptor endógeno (89). Se estudió, entonces, qué efecto tenía el agregar en la mezcla de incubación un gran exceso (5.000

veces) de UDP-Glc no marcado. Se observó una reducción del 53% en la radioactividad incorporada al extracto 1103 (Tabla 8, líneas 1 y 5). Este resultado dejó abierta la posibilidad de que el aceptor lipídico de galactosa fuera el mismo que el de glucosa.

Para tratar de esclarecer esta posibilidad, se efectuó una incubación usando como substratos UDP-(³H)Glc y Dol-P-(¹⁴C)Gal simultáneamente. Se investigó la incorporación de (¹⁴C) y (³H) al extracto 1103; este material se trató con ácido suave, y el producto de hidrólisis se sometió a cromatografía en papel (fig. 25). Se observó un único pico en el cual ambas marcas coincidieron. Debido a la poca radioactividad incorporada, no se pudo seguir caracterizando este producto.

Este resultado, si bien no descartaría la posibilidad que tanto la galactosa como la glucosa se unan al mismo aceptor endógeno, sugirió la conveniencia de estudiar el problema desde otro ángulo.

Tabla 8: Efecto de cationes bivalentes y de UDP-Glc en la formación de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal.

Condiciones de incubación	Incorporación en 1103 (cpm)	% de la incorporación relativo a la mezcla de inc. sin ningún catión bivalente
1) Sin catión bivalente	1.470	100
2) Mn ⁺⁺ 8 mM	740	50
3) Mg ⁺⁺ 6 mM	1.782	120
4) EDTA-Na ₂ 2 mM	1.580	106
5) Mg ⁺⁺ 6 mM + UDP-Glc 1 mM	690	47

La mezcla de incubación A (sección 3.3.1.) contenía 10.000 cpm de Dol-P-(¹⁴C)Gal (20 pmoles), 2 mg de enzima y los agregados que se indican en cada caso en un volumen de incubación de 100 ul. El extracto 1103 se obtuvo según el método B (sección 3.3.1.2.). La radioactividad se midió en cazoletas de vidrio (sección 3.8.3.).

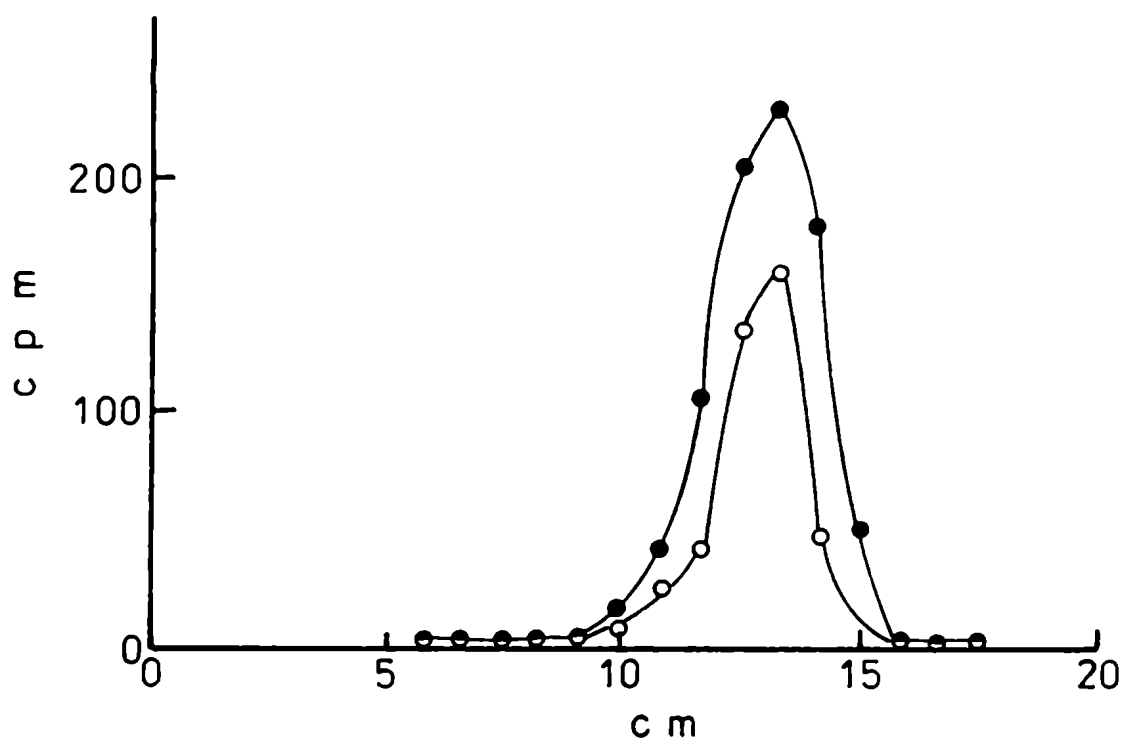


Fig. 25: Incorporación simultánea de (¹⁴C)galactosa y (³H)glucosa.

La mezcla de incubación A (sección 3.3.1.) contenía además 10.000 cpm de Dol-P-(¹⁴C)Gal (309 uCi/uM), UDP-(³H)Glc 2.6 x 10⁵ cpm (2,5 mCi/uM) y Cl₂Mg 6 mM. Se hicieron cinco incubaciones análogas para obtener suficiente material y los extractos 1103 se combinaron. Este material se sometió a hidrólisis ácida suave (pH = 2, 10 min a 100°C) (sección 3.6.1.), y el producto se cromatografió durante 3 días con el solvente B. Se cortó el papel en tiras de 0,5 cm, y la radioactividad se determinó como se indica en la sección 3.8.2.

●—● (¹⁴C)
○—○ (³H)

4.6. Propiedades y caracterización parcial del material marcado con (¹⁴C)galactosa extraíble con 1103.

Como ya se señaló anteriormente, las propiedades del material extraíble de la interfase proteica con el solvente 1103 obtenido al incubar los microsomas de hígado de rata con Dol-P-(¹⁴C)Gal nos recordaron las de los lípidos intermediarios glucosilados (Dol-PP-oligosac-Glc) encontrados por el grupo de Leloir y col (89), cuya estructura ya había sido muy bien caracterizada (94) (1.4.3.2.b y 1.4.4.). Por esta razón, una vez fijadas las condiciones para obtener el derivado galactosilado en cantidades razonables y ante las dificultades para obtener material doblemente marcado (sección 4.5.1.), se hizo como se verá a continuación un estudio comparativo de las propiedades de ambos compuestos.

4.6.1. Análisis de los compuestos sin degradar.

4.6.1.1. Cromatografía en papel.

1°) Ninguno de los compuestos migró al ser cromatografiado con los solventes A, C y D (los resultados no se muestran).

2°) Ambos compuestos corrieron un poco más que la glucosa ($R_{Glc} = 1,15$) al cromatografiarlos con el solvente B (fig. 26).

4.6.1.2. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

La cromatografía en DEAE-celulosa, empleando solventes orgánicos, ha sido muy utilizada desde los primeros momentos en la caracterización de prenil-fosfo-azúcares (238). Permite, por ejemplo, distinguir claramente entre derivados con uno o dos fos-

fatos, pues se eluyen a concentraciones muy diferentes. Material marcado con (^{14}C)galactosa o con (^{14}C)glucosa se sometió a este procedimiento (fig. 27) y se observó que ambos compuestos se eluían prácticamente en la misma posición (formiato de amonio 10 mM). Esto indicaría que el compuesto galactosilado posee también un puente pirofosfato (81). En estas mismas condiciones tanto el Dol-P-(^{14}C)Gal como el Dol-P-(^{14}C)Glc no se fijaron a la DEAE-celulosa y se eluyeron con el solvente de lavado. Debido a su similitud con las propiedades del Dol-PP-oligosac-Glc, al compuesto marcado con galactosa extraído con 1103 lo llamaremos Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal.

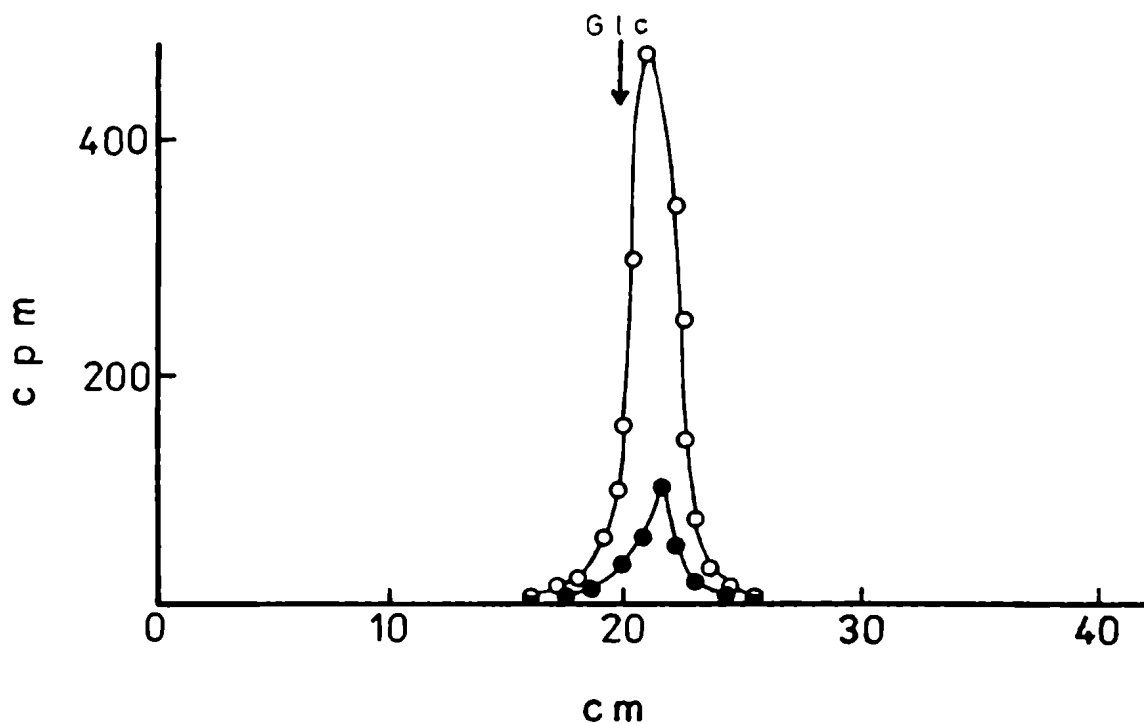


Fig. 26: Cromatografía en papel del material marcado con ^{14}C galactosa o ^3H glucosa extraíble con 1103.

El Dol-PP-oligosac- ^3H Glc se preparó por el método I (sección 3.2.7.1.). El Dol-PP-oligosac- ^{14}C Gal se preparó como se indica en la leyenda de la fig. 23. Ambas sustancias fueron sembradas juntas en el papel y luego cromatografiadas con el solvente B durante 2 días. El papel fue cortado en tiras de 0,5 cm de ancho y luego contado en forma diferencial para ^3H y ^{14}C (sección 3.8.2.).

- — ○ Dol-PP-oligosac- ^3H Glc.
- — ● Dol-PP-oligosac- ^{14}C Gal.

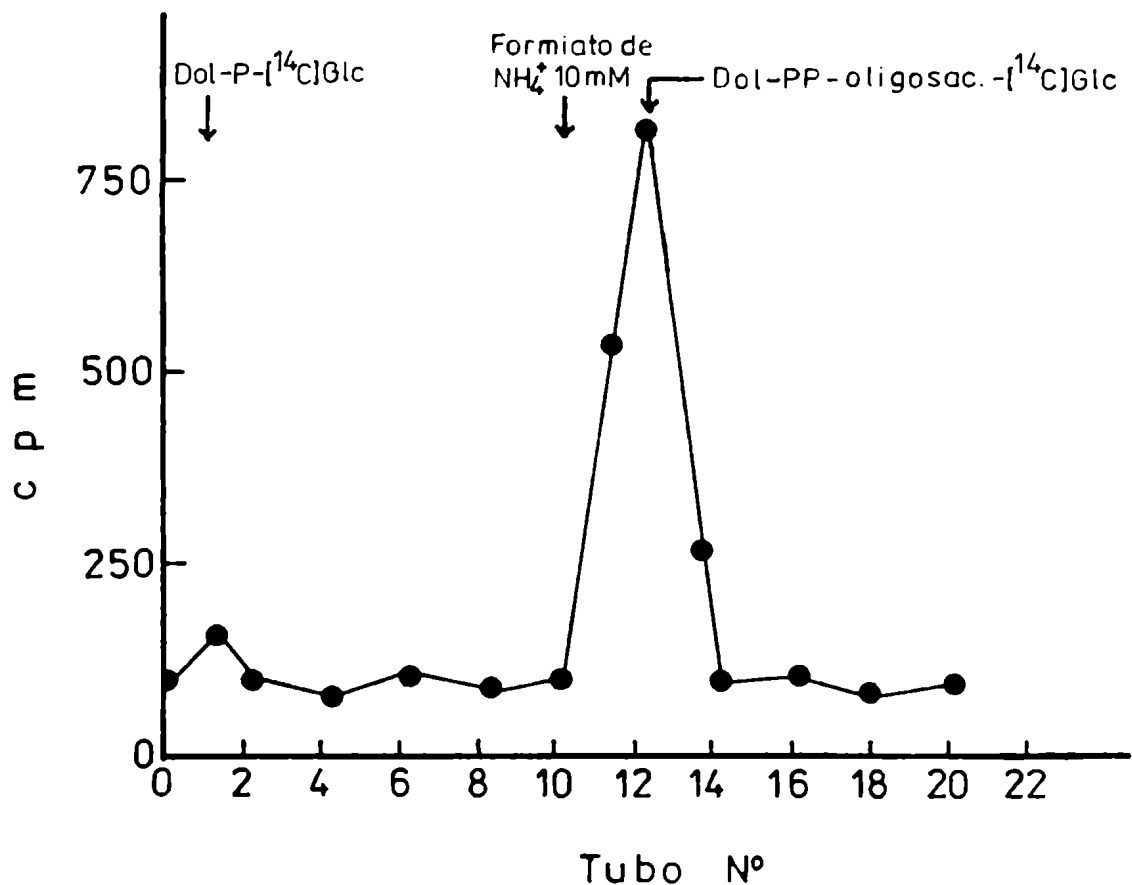


Fig. 27: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal.

Se cargó en una columna (1,5 x 0,6 cm) de DEAE-celulosa, equilibrada con 1103 un material soluble en 1103 marcado con (¹⁴C)Gal (2.500 cpm), preparado como se indicó en la fig. 23. Se lavó la columna con 10 ml de 1103 y luego con 10 ml de formiato de amonio 10 mM en 1103. Se recogieron fracciones de 1 ml. Se determinó la radioactividad en cada una de las fracciones. Las flechas indican las posiciones donde eluye el Dol-P-(¹⁴C)Glc y el Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc (preparado por el método I (sección 3.2.7.1.)), corridos en las mismas condiciones.

4.6.2. Análisis del azúcar incorporado.

Por tratamiento con HCl 0,1 N durante 150 min a 100°C, el extracto 1103 obtenido a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal liberó galactosa a juzgar por cromatografía en papel con el solvente A (fig. 28). Un tratamiento similar sobre el Dol-PP-oligosac-Glc liberó glucosa (42).

4.6.3. Productos de la hidrólisis ácida suave.

Dol-PP-oligosac-(³H)Glc y Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal se hidrolizaron al tratarlos con ácido suave (sección 3.6.1.), liberando los oligosacáridos respectivos, y el análisis por cromatografía en papel de los mismos mostró que la movilidad del oligosac-(¹⁴C)Gal ($R_{Glc} = 0.09$) era ligeramente mayor que la del oligosac-(³H)Glc ($R_{Glc} = 0.07$) (fig. 29).

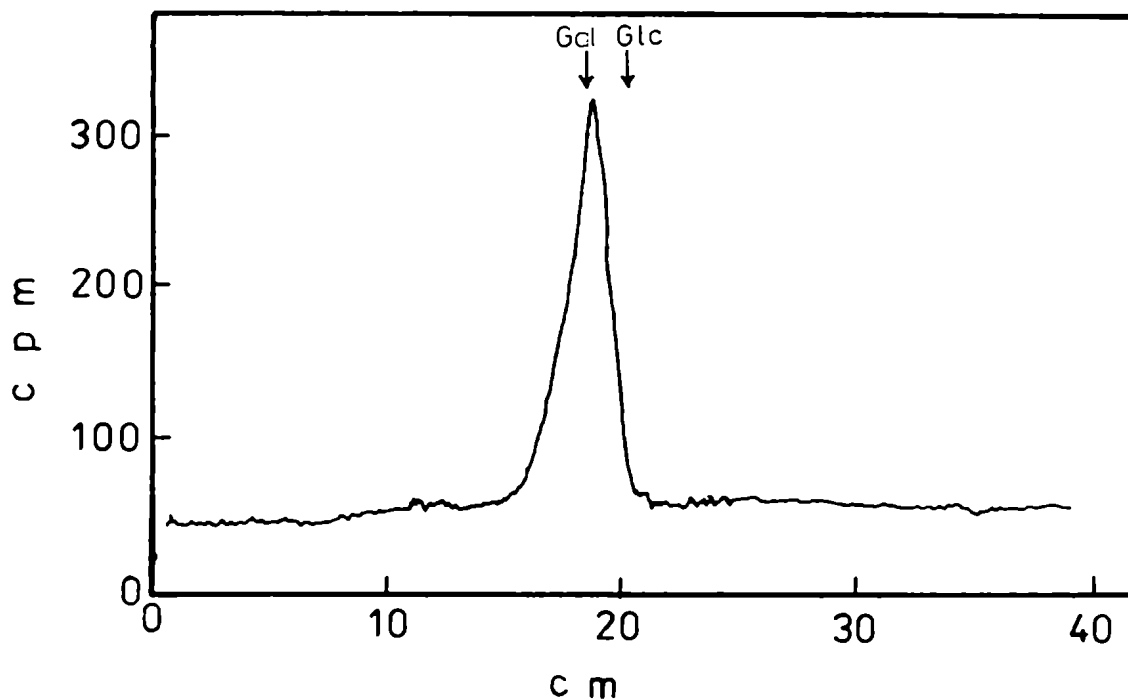


Fig. 28: Tratamiento ácido fuerte del extracto 1103 marcado con
(¹⁴C)galactosa.

El extracto 1103 obtenido como se indicó en la fig. 23 se hidrolizó con HCl 0,1 N durante 150 min a 100°C. Luego de hacer una partición con cloroformo-metanol-agua (3:2:1) la fase superior, llevada a seco varias veces para eliminar el exceso de ácido, se sembró en papel y se cromatografió en el solvente A durante 2 días.

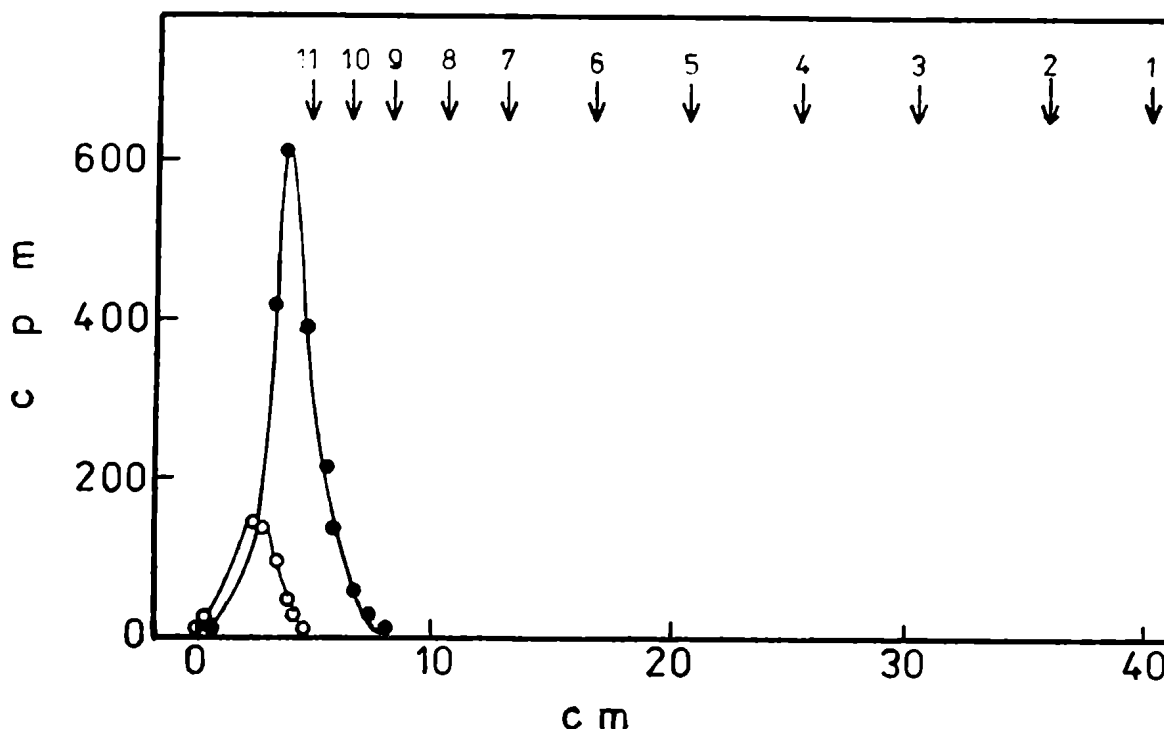


Fig. 29: Cromatografía del oligosac-(¹⁴C)Gal y del oligosac-(³H)Glc en el solvente B.

El Dol-PP-oligosac-(³H)Glc se preparó a partir de UDP-(³H)Glc por el método I descrito en 3.2.7.1. El Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal se preparó como se indicó en la leyenda de la fig. 23. Ambos lípidos azúcares fueron mezclados y sometidos a tratamiento ácido suave (sección 3.6.1.). Se hizo una partición con cloroformo-metanol-agua, y la fase acuosa se cromatografió en el solvente B durante 3 días.

El cromatograma se cortó en tiras de 0,5 cm de ancho y la radioactividad se determinó por contaje diferencial de (³H) y (¹⁴C) como se determinó en la sección 3.8.2.

- Oligosac-(¹⁴C)Gal
- Oligosac-(³H)Glc

Los números sobre las flechas indican el número de hexosas que contienen los maltooligosacáridos utilizados como estándar, y las flechas la posición a la que migran.

4.6.3.1. Preparación de Dol-PP-oligosac-Glc en presencia y ausencia de detergente.

La diferencia de movilidad observada por cromatografía en solvente B de los oligosacáridos marcados con (^3H)glucosa y con (^{14}C)galactosa (fig. 28) podría deberse a diferencias de estructura o de tamaño. Para aclarar esta duda se preparó, por una parte, Dol-PP-oligosac-(^3H)Glc a partir de UDP-(^3H)Glc usando el método I (sección 3.2.7.1.), y por otra, usando el método II (sección 3.2.7.2.), que es similar al empleado para preparar Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal. La principal diferencia entre estos dos métodos es que en el método II la mezcla de incubación lleva detergente, mientras que en método I no se usa detergente ninguno, pues se parte de UDP-(^3H)Glc.

La fig. 30 muestra la movilidad de los oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave de los lípido-azúcares obtenidos por ambos métodos. Se observó que el oligosacárido obtenido por el primer método (marcado con ^3H) migró menos que el obtenido por el método II (marcado con ^{14}C).

Teniendo en cuenta que se utilizó el mismo nucleótido-azúcar dador, y suponiendo que el aceptor era el mismo, se atribuyó la diferencia de movilidades de ambos oligosacáridos a diferencias de tamaño. Por lo tanto, en el caso de los derivados de galactosa y de glucosa (fig. 29) se consideró que la diferencia de movilidades se podía también deber a una diferencia de tamaño.

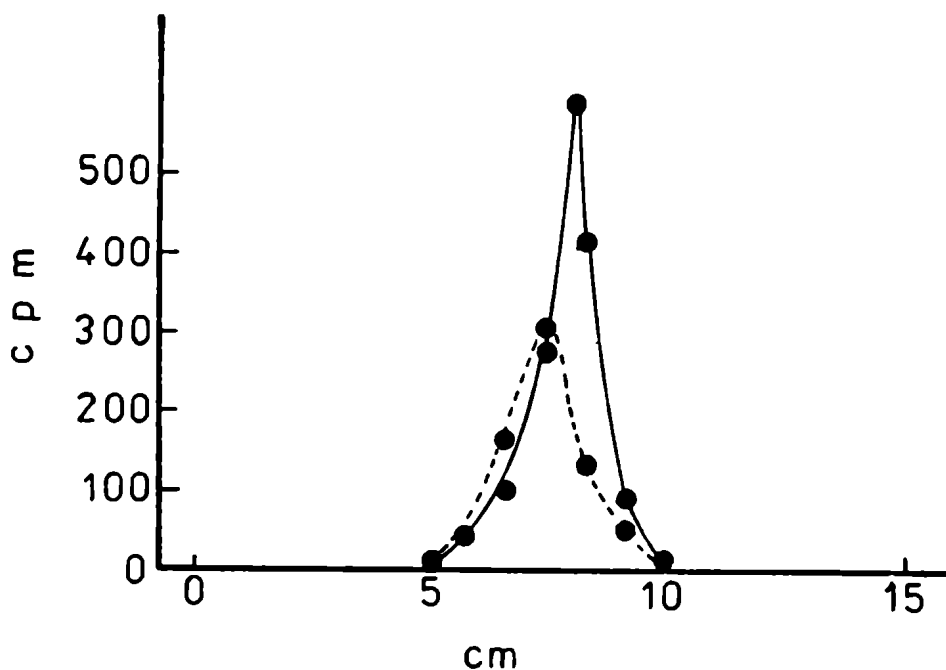


Fig 30: Cromatografía en papel de los oligosac-Glc preparados en presencia y en ausencia de detergente.

Se colocaron en un mismo tubo 6.000 cpm de Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc preparado por el método II (sección 3.2.7.2.) en presencia de Tritón X-100 y 20.000 cpm de Dol-PP-oligosac-(^3H)Glc preparado por el método I (sección 3.2.7.1.). Los oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave se cromatografiaron en papel desarrollándose por 3 días con el solvente B. El cromatograma se cortó en tiras de 0,5 cm de ancho y se contaron en el Packard, utilizando como líquido de centelleo tolueno-omnifluor, como se describió en 3.8.2. para el conteo diferencial de (^3H) y (^{14}C).

----- Oligosac-(^3H)Glc preparado por método I (sin detergente).
 _____ Oligosac-(^{14}C)Glc preparado por método II (con detergente).

4.6.4. Análisis de la porción oligosacarídica.

Pareció interesante en este punto estudiar la estructura del oligosac-(^{14}C)Gal. Para ello se aplicaron muchas de las técnicas empleadas para determinar la estructura del oligosac-Glc (sección 1.4.4.).

4.6.4.1. Tratamiento con α manosidasa.

Se sabía que el oligosac-Glc es sensible al tratamiento con α manosidasa y que por tratamiento prolongado con esta enzima pierde las cinco manosas de la rama α 1-6 (números 3, 6, 7, 8, y 9, fig. 9, sección 1.4.3.2.a). El oligosac-(^{14}C)Gal y el oligosac-(^{14}C)Glc se trataron con α manosidasa, y los productos de degradación se cromatografiaron en el solvente B (fig. 31, A y C). En ambos casos se observaron tres componentes cuyas movilidades son mayores que las de los respectivos oligosacáridos sin tratar (fig. 31, B y D). Este incremento en la movilidad se estimó que podía corresponder a la pérdida de 3 a 5 residuos azúcar. En ningún caso se observó liberación de glucosa o galactosa.

Esto indicaría que el oligosac-(14)Gal posee manosas.

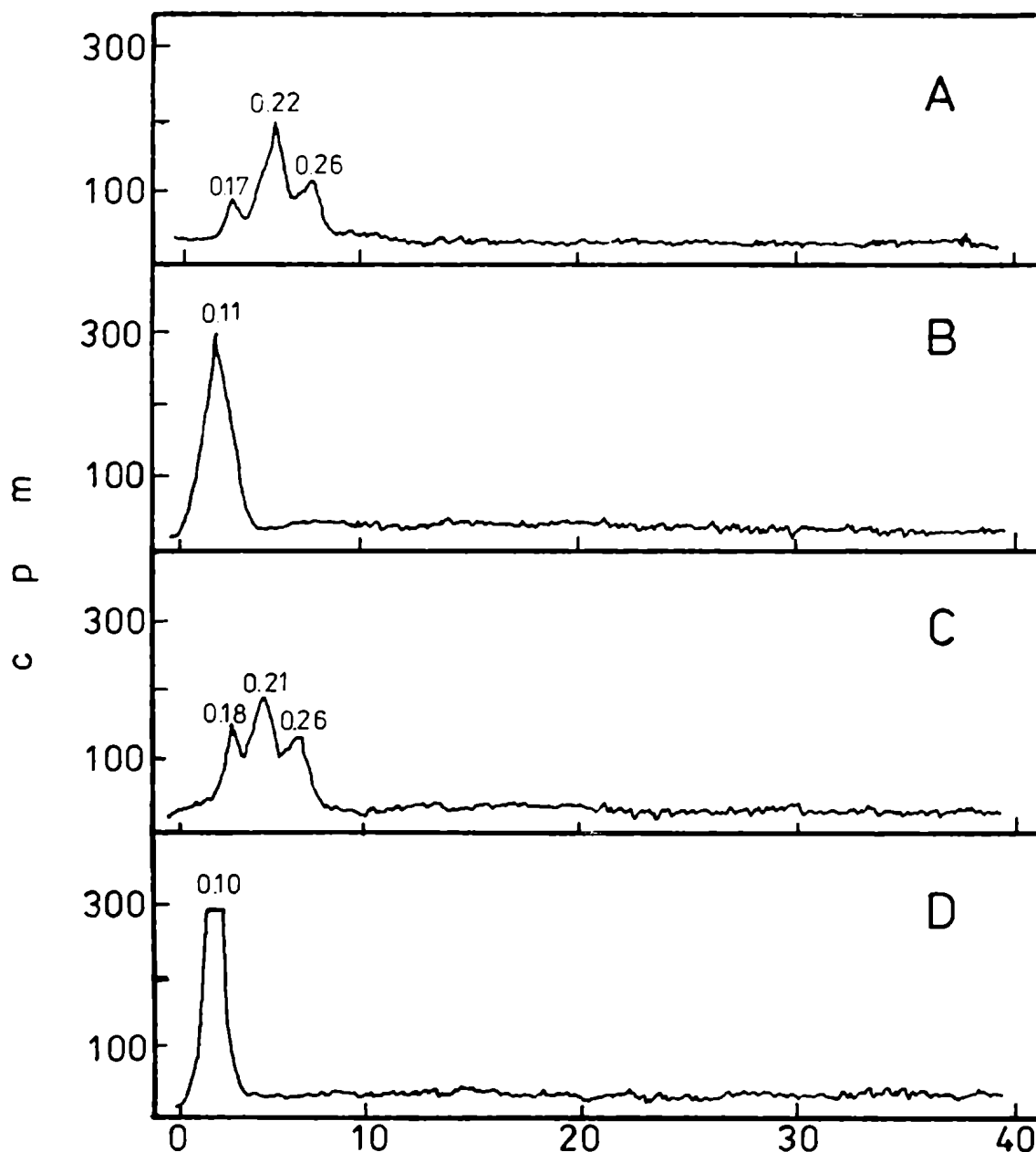


Fig. 31: Tratamiento con α manosidasa de los oligosacáridos marcados con (^{14}C)galactosa y con (^{14}C)glucosa.

El Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal se preparó como se indicó en la leyenda de la fig. 23. El Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc se preparó a partir de UDP-(^{14}C)Glc por el método I (sección 3.2.7.1.). Los oligosacáridos (^{14}C)galactosa y (^{14}C)glucosa se obtuvieron de sus respectivos lípido-oligosacáridos por hidrólisis ácida suave (sección 3.6.1.).

Perfiles A y B: oligosacáridos marcados con (^{14}C)galactosa.
 Perfiles C y D: oligosacáridos marcados con (^{14}C)glucosa.
 Las muestras en B y en D corresponden a los oligosacáridos (^{14}C)galactosa y (^{14}C)glucosa sin tratar, respectivamente. Las muestras en A y en C fueron incubadas con α manosidasa (sección 3.5.1.). Luego de la incubación se hizo una partición en cloroformo-metanol-agua (3:2:1). La fase acuosa se cromatografió con el solvente B. Los números sobre los picos corresponden a sus R_{Glc} .

4.6.4.2. Tratamiento alcalino reductor.

Ya está descrito que por tratamiento alcalino reductor con borohidruro de sodio e hidróxido de sodio, el grupo hemiacetal del oligosac-(^{14}C)Glc se reduce y los grupos acetilos unidos a sus dos residuos hexosamina se eliminan (81). Esta pérdida de residuos hexosamina trae aparejada la aparición de compuestos cargados positivamente al someterlos a electroforesis en buffer J. La movilidad de estos compuestos depende del número de cargas adquiridas como consecuencia del número de residuos acetilo perdidos. Cuando se sometieron a este tratamiento el oligosac-(^{14}C)Gal y el oligosac-(^{14}C)Glc, y los productos se separaron por electroforesis, se observó en ambos casos tres picos de radioactividad: un pico neutro, un pico lento, y un pico rápido; que correspondieron a la eliminación de ninguno, uno o dos grupos acetilos, respectivamente (fig. 32, B, C). El oligosac-(^{14}C)Gal sin ningún tratamiento se comportó como neutro (fig. 32 A).

Estos resultados indicaron que el oligosac-(^{14}C)Gal poseía dos residuos hexosamina, al igual que lo que ya se sabía acerca del oligosac-(^{14}C)Glc.

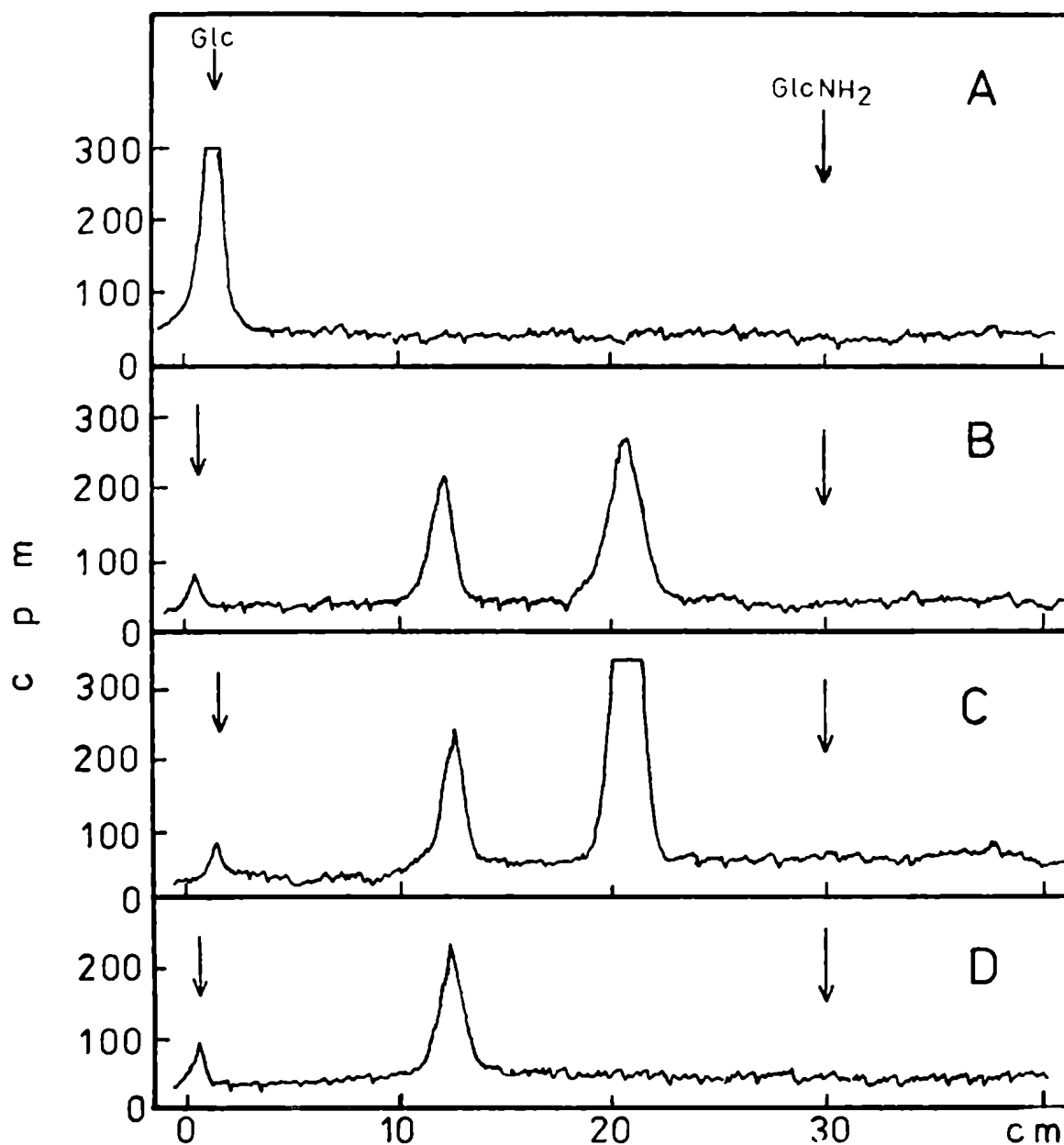


Fig. 32: Electroforesis de los oligosacáridos marcados con (^{14}C) galactosa y (^{14}C) glucosa parcialmente desacetilados.

Los oligosacáridos (^{14}C) galactosa y (^{14}C) glucosa obtenidos como se indicó en la leyenda de la fig. 31 se trataron con NaOH 2 M/ BH_4Na 1 M a 100°C durante 6 hs. Luego de destruir el exceso de BH_4Na con ácido acético y de desalar las muestras cromatografiándolas por columnas de Bio Gel P 2 (sección 3.6.3.), se electroferetizaron en el solvente J a 20 V/cm durante 3 hs.

A: oligosac- (^{14}C) Gal sin tratar.

B: oligosac- (^{14}C) Gal parcialmente desacetilado.

C: oligosac- (^{14}C) Glc parcialmente desacetilado.

D: oligosac- (^{14}C) Glc tratado con endo-N-acetilglucosaminidasa H y luego parcialmente desacetilado.

4.6.4.3. Tratamiento con endo-N-acetilglucosaminidasa H.

Pareció interesante estudiar la naturaleza y posible ubicación de los dos residuos hexosamina encontrados en el oligosac-(¹⁴C)Gal (sección 4.6.4.2.). Para ello, y aprovechando la especificidad de la enzima endo-N-acetilglucosaminidasa H, que se sabía que hidrolizaba la N-N'diacetilquitobiosa de los oligosacáridos tipo "high mannose" (sección 1.4.7.2.), se trató el oligosac-(¹⁴C)Gal con esta enzima. Al producto de dicha degradación se lo sometió al tratamiento alcalino reductor y luego se lo electroforetizó en buffer J. Se obtuvieron solo dos picos de radioactividad, un pico neutro y un pico lento (fig. 32 D). Estos resultados nos permitieron concluir que las dos hexosaminas observadas por tratamiento alcalino reductor corresponden a dos residuos N-acetilglucosaminas, y que estos dos residuos están juntos formando N, N'diacetilquitobiosa.

Hay que destacar una vez más el gran parecido entre las estructuras de los oligosacáridos (¹⁴C)galactosa y (¹⁴C)glucosa.

4.6.4.4. Tratamiento con α ó β galactosidasa.

Se trató de estudiar si galactosidasas de distintas fuentes naturales degradaban el oligosac-(¹⁴C)Gal. Para ello se probaron la α galactosidasa de *Aspergillus niger* y la β galactosidasa de hígado.

El oligosac-(¹⁴C)Gal no liberó (¹⁴C)galactosa al tratarlo con ninguna de las dos enzimas (sección 3.5.2. y sección 3.5.3.).

4.6.4.5. Fraccionamiento del oligosacárido (^{14}C)galactosa.

Durante el desarrollo de esta tesis se demostró que el oligosacárido-Glc, que se comportaba como un único compuesto al cromatografiarlo con el solvente B durante 2 ó 3 días, en realidad estaba formado por tres compuestos que poseían dos N-acetilglucosaminas, nueve manosas y cuyo número de glucosas variaba entre uno y tres (135). A estos compuestos los llamaremos oligosac-Glc₁, oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₃, o abreviadamente Glc₁, Glc₂ y Glc₃, donde el subíndice indica el número de glucosas que poseen. Estos tres oligosacáridos se pudieron resolver cromatografiándolos con el solvente B durante 3 semanas o con el solvente E durante 1 semana (99).

A la luz de estos nuevos resultados, se trató de averiguar si el oligosac-(^{14}C)Gal se podía resolver también en más de un componente. Se observó que al cromatografiarlo en el solvente E dio dos compuestos (fig. 33 A). A estos compuestos se los llamó oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂, o Gal₁ y Gal₂, respectivamente, por su analogía con la posición en que migraron el oligosac-Glc₁ y el oligosac-Glc₂, respectivamente (fig. 33, A y B).

Pensando que podrían existir otros compuestos minoritarios no observables por la escasa radioactividad empleada para el análisis (aproximadamente 2000 cpm de oligosac-(^{14}C)Gal), se cromatografió en el solvente E mayor cantidad de material. En este caso se observaron además de los dos compuestos arriba mencionados, una serie de picos minoritarios (fig. 34). Para verificar si estos picos minoritarios provenían de compuestos reales o

eran atribuibles a artefactos de la técnica seguida, se eluyó por separado cada uno de los picos y se los volvió a cromatografiar en las mismas condiciones. Todos ellos volvieron a migrar en la misma posición en que lo hicieron anteriormente (fig. 35). Lamentablemente, el material minoritario (picos 0, 3, 4, y 5) no se pudo seguir analizando debido a su pequeña cantidad.

4.6.4.6. Efecto del tiempo de incubación en la proporción de los oligosacáridos marcados con (^{14}C)glucosa o con (^{14}C)galactosa.

Como se mencionó en la sección 3.6.7.1., el Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc se puede obtener incubando UDP-(^{14}C)Glc con una preparación de microsomas de hígado. Vimos que en realidad se trataba de una mezcla de lípido-oligosacáridos donde la porción oligosacarídica estaba constituida por oligosac-Glc₁, oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₃ en distintas proporciones.

Estudios realizados por Ugalde (139) mostraron que la relación entre los oligosac-Glc₁, oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₃ variaba notablemente al variar el tiempo de incubación. Se quiso ver si la relación entre el oligosac-Gal₁ y el oligosac-Gal₂ variaba también al modificarse el tiempo de incubación empleado en la obtención del Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal a partir de Dol-P-(^{14}C)Gal. Se observó que, a diferencia de lo que ocurre para los oligosacáridos de glucosa, esta relación para un preparado enzimático dado no varió con el tiempo de incubación (fig. 36). En cambio sí se observaron variaciones al utilizar distintos preparados enzimáticos. En este último caso, el oligosac-Gal₁

osciló entre 55% y 70% del total. Estas diferencias pueden ser atribuibles a las variaciones en los lípido-oligosacáridos endógenos existentes en cada preparado enzimático.

Se intentó entonces obtener un derivado galactosilado del tamaño del oligosac-Glc₃ incubando en presencia de dadores de glucosa y de galactosa simultáneamente. Ello exigía realizar las incubaciones en presencia de detergente, pues el único dador efectivo de galactosa era el Dol-P-(¹⁴C)Gal (tabla 7). Por este motivo pareció conveniente estudiar como variaba la relación de los oligosac-Glc₁, oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₃ en los lípido-oligosacáridos preparados en presencia o ausencia de Tritón X-100.

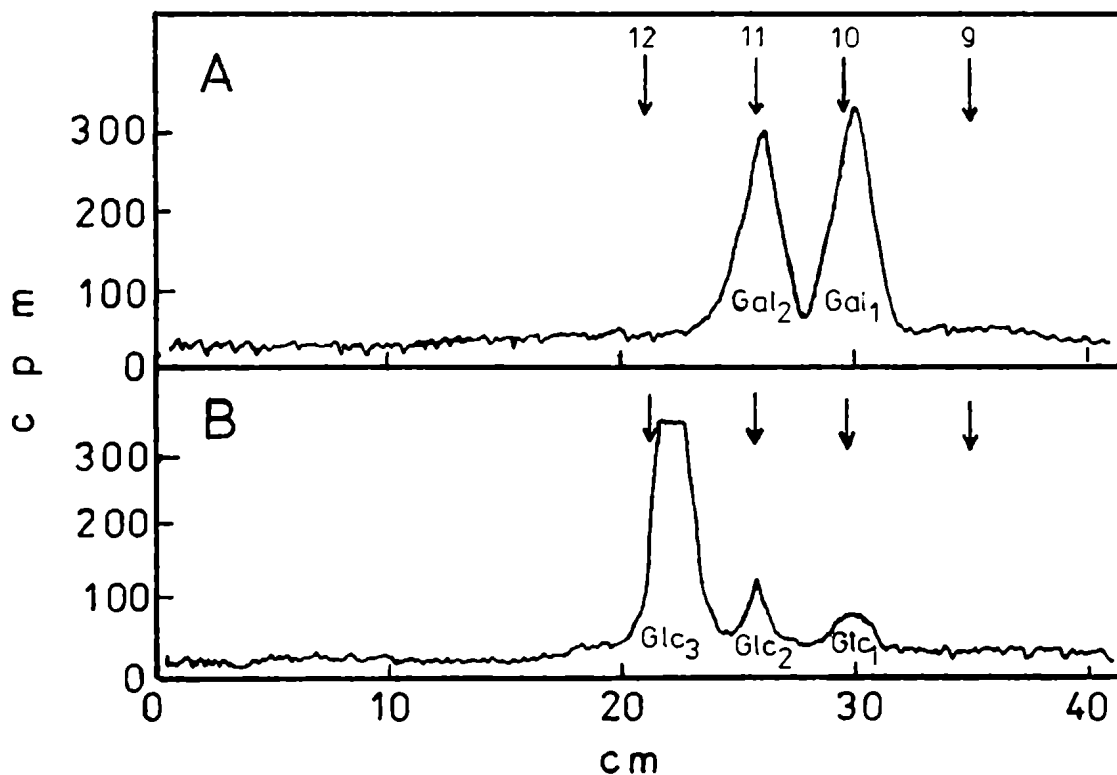


Fig. 33: Cromatografía en el solvente E de los oligosac-(¹⁴C)Gal y oligosac-(¹⁴C)Glc.

El Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal se preparó a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal como se indicó en la leyenda de la fig. 23. El Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc se preparó a partir de UDP-(¹⁴C)Glc por el método I (sección 3.2.7.1.). Los oligosac-(¹⁴C)Gal y oligosac-(¹⁴C)Glc se obtuvieron por hidrólisis ácida suave de sus respectivos lípido-oligosacáridos (sección 3.6.1.).

2.000 cpm de oligosac-(¹⁴C)Gal (cuadro A) y 5.000 cpm de oligosac-(¹⁴C)Glc (cuadro B) se cromatografiaron con el solvente E durante 7 días.

Los números sobre las flechas indican el número de hexosas que contienen los maltooligosacáridos utilizados como estándar, y las flechas las posiciones en que migran.

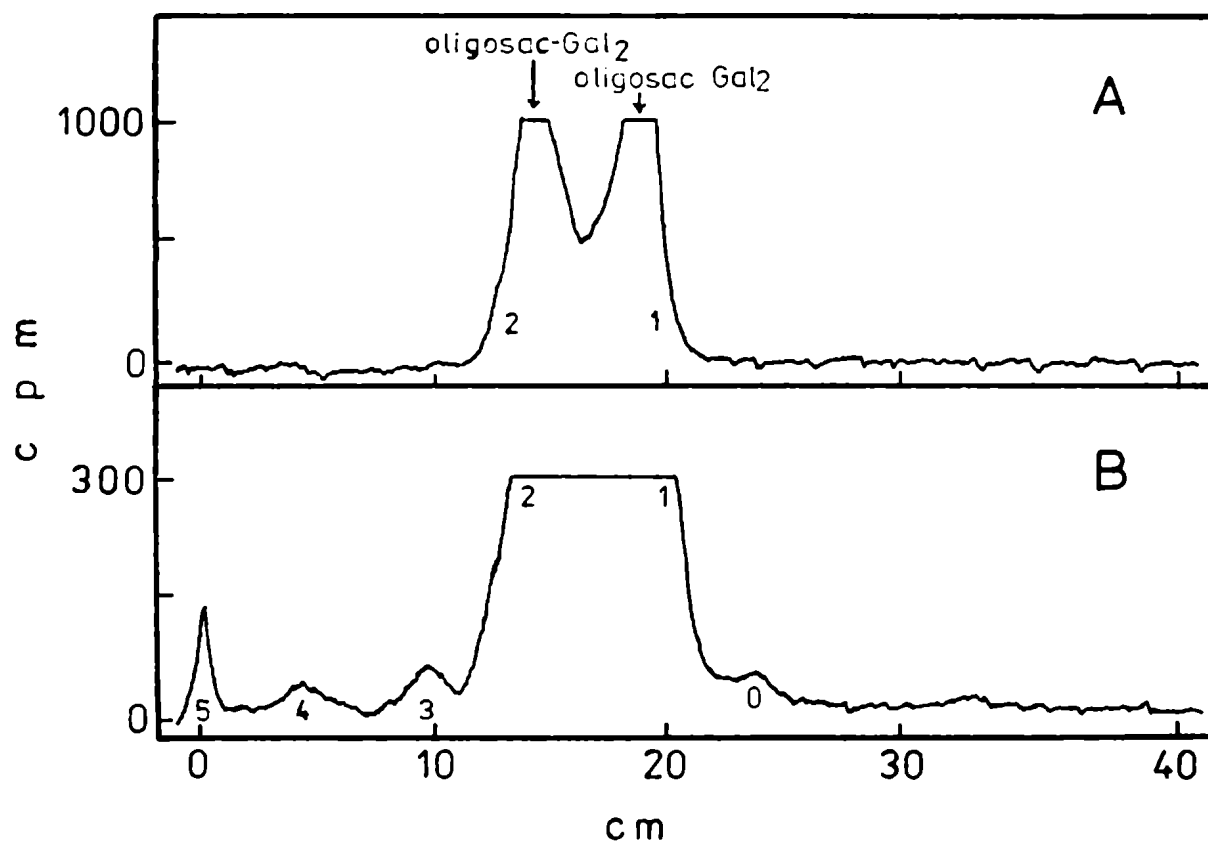


Fig. 34: Cromatografía en el solvente E de los componentes mayoritarios y minoritarios del oligosac-(¹⁴C)Gal.

El Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal se preparó a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal como se indicó en la leyenda de la fig. 23.

El oligosac-(¹⁴C)Gal se obtuvo por hidrólisis ácida suave (ClH 0,01, 10 min a 100°C) del Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal. Una alícuota de 10.000 cpm de oligosac-(¹⁴C)Gal se cromatografió en el solvente E durante 8 días.

Los cuadros A y B muestran el perfil obtenido y analizado en distintas escalas: 1.000 y 300 cpm, respectivamente.

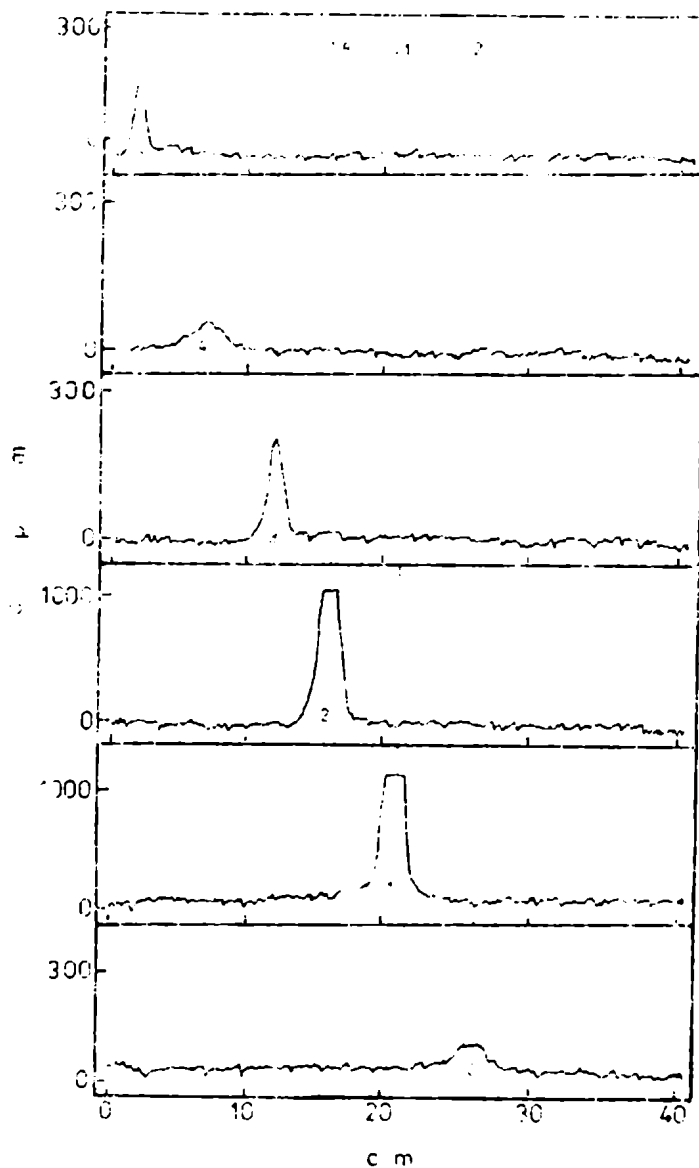


Fig. 35: Recromatografía en el solvente E de cada uno de los componentes del oligosac-(¹⁴C)Gal fraccionados por cromatografía en el mismo solvente.

El material eluído de los picos 0, 1, 2, 3, 4, y 5 del cromatograma mostrado en la fig 34 se eluyó y se volvió a cromatografiar desarrollándolo con el solvente E durante 8 días. Los números sobre las líneas de puntos indican los cm que migró cada compuesto.

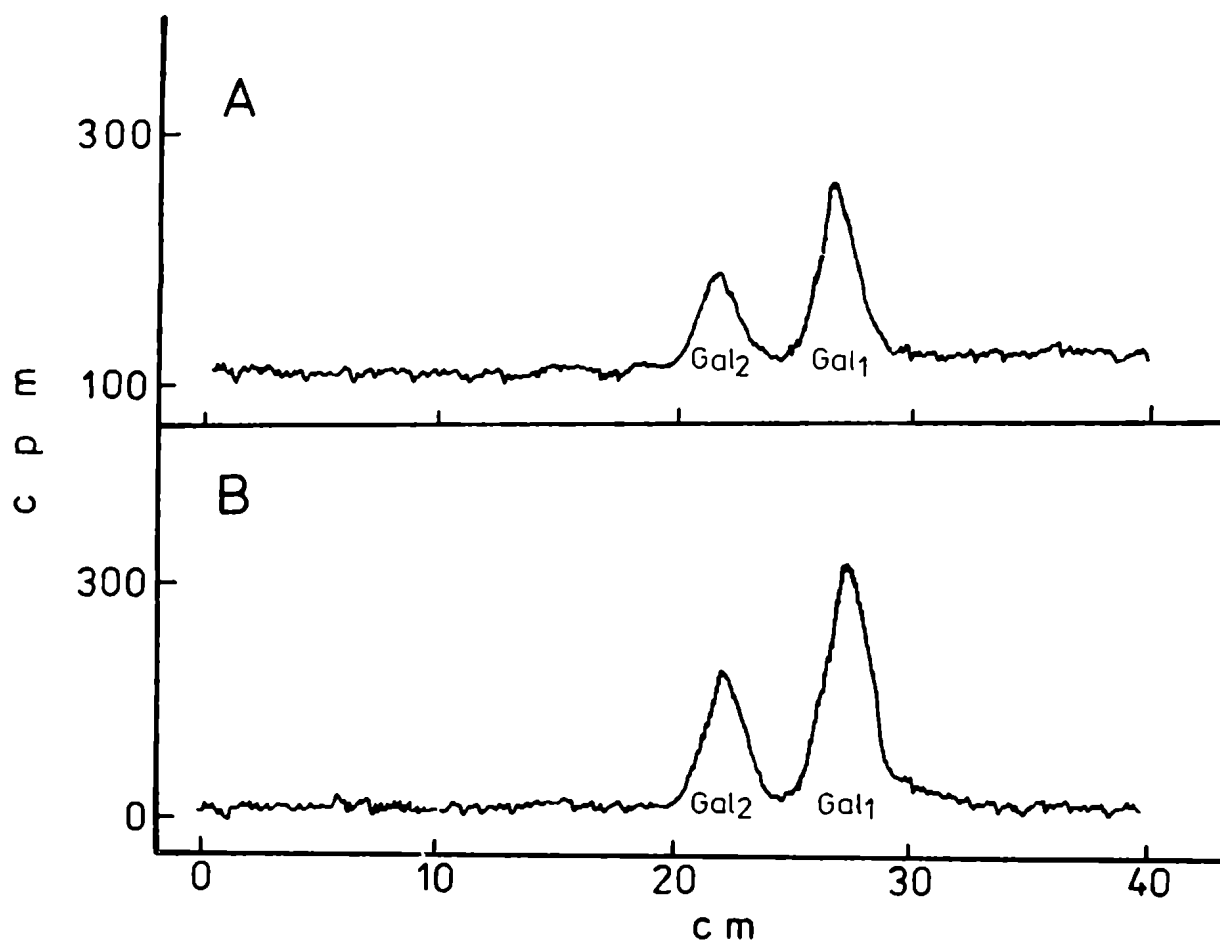


Fig. 36: Efecto del tiempo de incubación en el perfil de los oligosacáridos marcados con $(^{14}\text{C})\text{Gal}$.

Se utilizó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.) con Tritón X-100 1,25%, 10.400 cpm de Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ (309 uCi/uM) y 5 mg de enzima en un volumen final de 100 μl . El tiempo de incubación fue de 10 min (cuadro A) o 30 min (cuadro B). Las incubaciones se procesaron según el método B (sección 3.3.1.2.). Los oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ se obtuvieron por hidrólisis ácida suave (pH = 2, 10 min a 100°C) de los extractos 1103. Los oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ se cromatografiaron en el solvente E durante 7 días.

Gal₁: oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_1$.
Gal₂: oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_2$.

4.6.4.7. Tamaño de los oligosacáridos marcados con (^{14}C)glucosa obtenidos en presencia o en ausencia de detergente.

Como ya se mostró en la fig. 30, el tamaño de los oligosacáridos glucosilados dependía de la presencia o ausencia de Tritón X-100 en la mezcla de incubación. Se fijó entonces el tiempo de incubación en 30 minutos y se prepararon lípido-oligosacáridos en presencia de Tritón X-100, utilizando tanto UDP-(^{14}C)Glc como dador con el agregado o no de Dol-P, como Dol-P-(^{14}C)Glc directamente. Como control se preparó también material a partir de UDP-(^{14}C)Glc en ausencia de Tritón X-100. Los oligosacáridos obtenidos se analizaron por cromatografía en papel con solvente E. Se pudieron observar los tres componentes solamente en el control (fig. 37 A). En los otros tres casos (fig. 37, B, C y D), solo se detectaron los oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₁. Esto se explicaría por la existencia de glucosidasas específicas que se activarían en presencia de detergente (135). Es por esta razón que todos los intentos realizados para tratar de obtener el Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc₃ en presencia de detergente y utilizando tiempos de incubación más bien largos (30 min) fueron infructuosos (135).

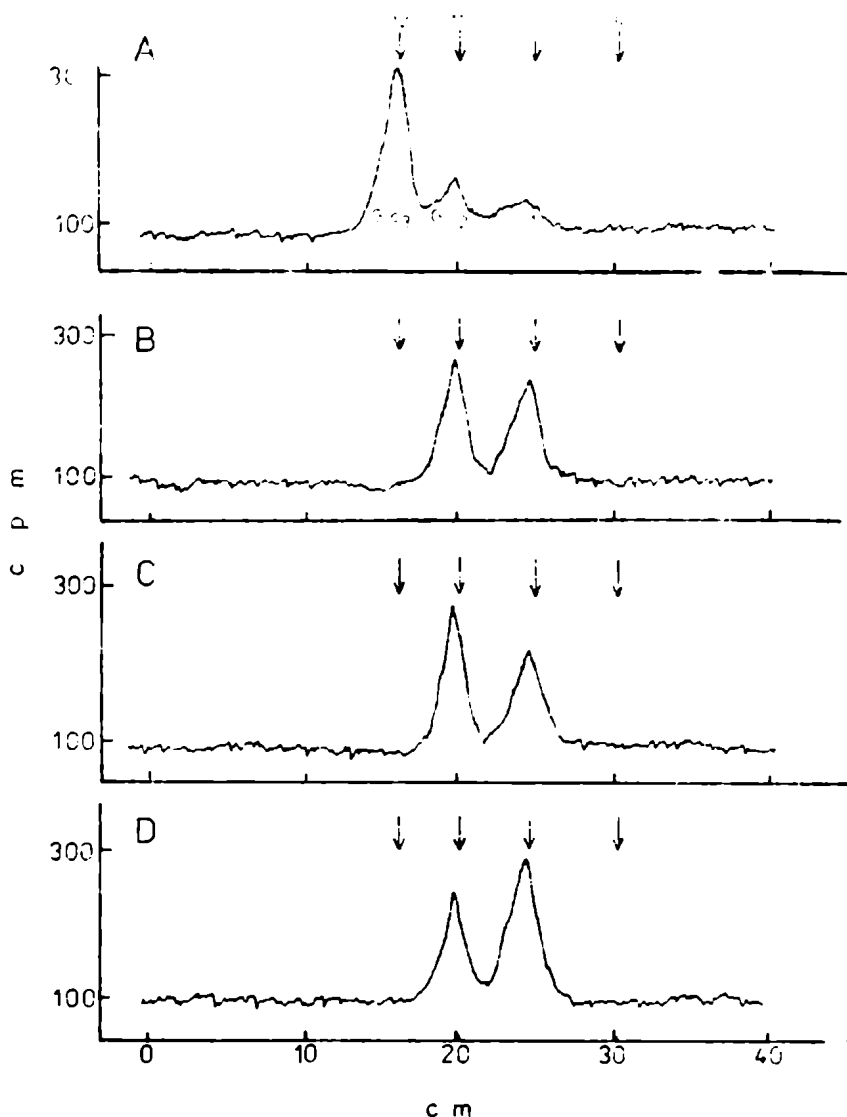


Fig. 37: Perfil cromatográfico de los oligosacáridos marcados con ^{14}C glucosa obtenidos en distintas condiciones de incubación y a partir de diferentes sustratos.

Cromatografía desarrollada durante 7 días con el solvente E de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida suave de los extractos 1103 obtenidos en las siguientes condiciones:

A: La incubación se efectuó a partir de UDP- ^{14}C Glc en las condiciones estándar descritas en 3.2.7.1. (método I, sin detergente).

B: La incubación se efectuó en presencia de Tritón X-100, 1,2% y UDP- ^{14}C Glc en las condiciones descritas en 3.2.7.2. (método II).

C: Las condiciones de incubación son similares a las descritas en 3.2.7.2. (método II), con la salvedad que se agregó 20 μl de Dol-P en la mezcla de incubación.

D: Las condiciones de incubación son las descritas en la sección 3.2.7.3. (método III), es decir, a partir de Dol-P- ^{14}C Glc y DOC-0,5%. En este caso se incubó 30 min. Los números sobre las flechas indican el número de hexosas que contienen los maltooligosacáridos utilizados como estándar y las flechas la posición a la que migran. Glc₁, Glc₂ y Glc₃ corresponden a los oligosac- ^{14}C Glc₁, Glc₂ y Glc₃, respectivamente.

4.6.4.8. Incorporación de (¹⁴C)galactosa en presencia de dadores de glucosa.

A pesar de los resultados negativos obtenidos al tratar de preparar un derivado glucosilado del tamaño de oligosac-Glc₃ en presencia de Tritón X-100 (sección 4.6.4.7.), se hicieron incubaciones en presencia de dicho detergente, pero utilizando simultáneamente Dol-P-(¹⁴C)Gal como dador de (¹⁴C)galactosa y UDP-Glc o Dol-P-Glc como dador de glucosa, pensando que probablemente la galactosa incorporada en el oligosacárido evitaría la acción de las glucosidasas sobre el mismo. Además de incubar durante 30 min, se usó un tiempo de incubación más corto (10 min) para minimizar el efecto de las glucosidasas sobre el oligosacárido formado.

a) UDP-Glc como dador de glucosa.

En la fig. 38 se muestran los perfiles cromatográficos de los oligosacáridos obtenidos incubando Dol-P-(¹⁴C)Gal y UDP-Glc con enzima de microsomas de hígado durante dos tiempos diferentes: 10 min (fig. 38 A) o 30 min (fig. 38 B). En ninguno de los dos casos se observó un pico cuya movilidad coincidiera con un estándar externo de oligosac-(³H)Glc (fig. 38 C), ni siquiera utilizando un tiempo de incubación corto (10 min), en el cual la actividad de las glucosidasas es menos marcada (135).

b) Dol-P-Glc como dador de glucosa.

En este caso se utilizó Dol-P-(¹⁴C)Gal solo o en presencia de distintas cantidades de Dol-P-Glc no radioactivo y se incubó durante 10 y 30 min.

Asimismo, se hizo un control empleando Dol-P-(¹⁴C)Glc

para verificar la transferencia de glucosa en las condiciones del ensayo. Se observó (Tabla 9) que las incubaciones efectuadas a partir de Dol-P-(^{14}C)Gal en presencia de cantidades equimoleculares de Dol-P-Glc estimularon la incorporación de (^{14}C)galactosa al extracto 1103, 20% aproximadamente (comparar incubaciones A y B, 30 min de incubación). Si en cambio la relación de Dol-P-(^{14}C)Gal a Dol-P-Glc era de 1 a 10 (pmol a pmol), se inhibió la incorporación de galactosa en un 50% aproximadamente (comparar incubaciones A y C, 30 min de incubación). Un control obtenido incubando en estas mismas condiciones pero utilizando Dol-P-(^{14}C)Glc en lugar de Dol-P-(^{14}C)Gal mostró que la incorporación de (^{14}C)glucosa al extracto 1103 era más eficiente (aproximadamente el doble) que la incorporación de (^{14}C)galactosa (comparar incubaciones A y D).

En ninguno de los tres casos (A, B y C) se obtuvo por hidrólisis ácida suave del extracto 1103 respectivo un oligosac-(^{14}C)Gal del tamaño del oligosac-Glc₃. En el caso D, el material se perdió y no pudo ser analizado.

c) Dol-P-Glc como dador de glucosa, utilizando deoxicolato como detergente.

Durante el transcurso de estos experimentos, Leloir y col. desarrollaron condiciones de incubación que resultaron ser muy útiles para nuestro estudio. Utilizando Dol-P(^{14}C)Glc como dador, observaron que en presencia de deoxicolato, en lugar de usar Tritón X-100, e incubando 10 min en lugar de 30 min, se obtenía por hidrólisis ácida suave del extracto 1103 el oligosac-(^{14}C)Glc₃ como principal producto. Se investigó enton-

ces si en estas condiciones de incubación en presencia de dadores de glucosa y galactosa simultáneamente se podía obtener un derivado galactosilado del tamaño del oligosac-Glc₃.

Se hicieron tres incubaciones. Una de ellas consistió en un control y se utilizó Dol-P-(¹⁴C)Glc como dador (fig. 39 A). En otra se empleó Dol-P-(¹⁴C)Gal y en la tercera este mismo dador juntamente con Dol-P-Glc no radioactivo. Como era de esperar, en el primer caso (fig. 39 A), se observó oligosac-Glc₃ como componente mayoritario, pero en los otros dos no se observó ningún compuesto que migrara como oligosac-Glc₃ (fig. 39, B y C).

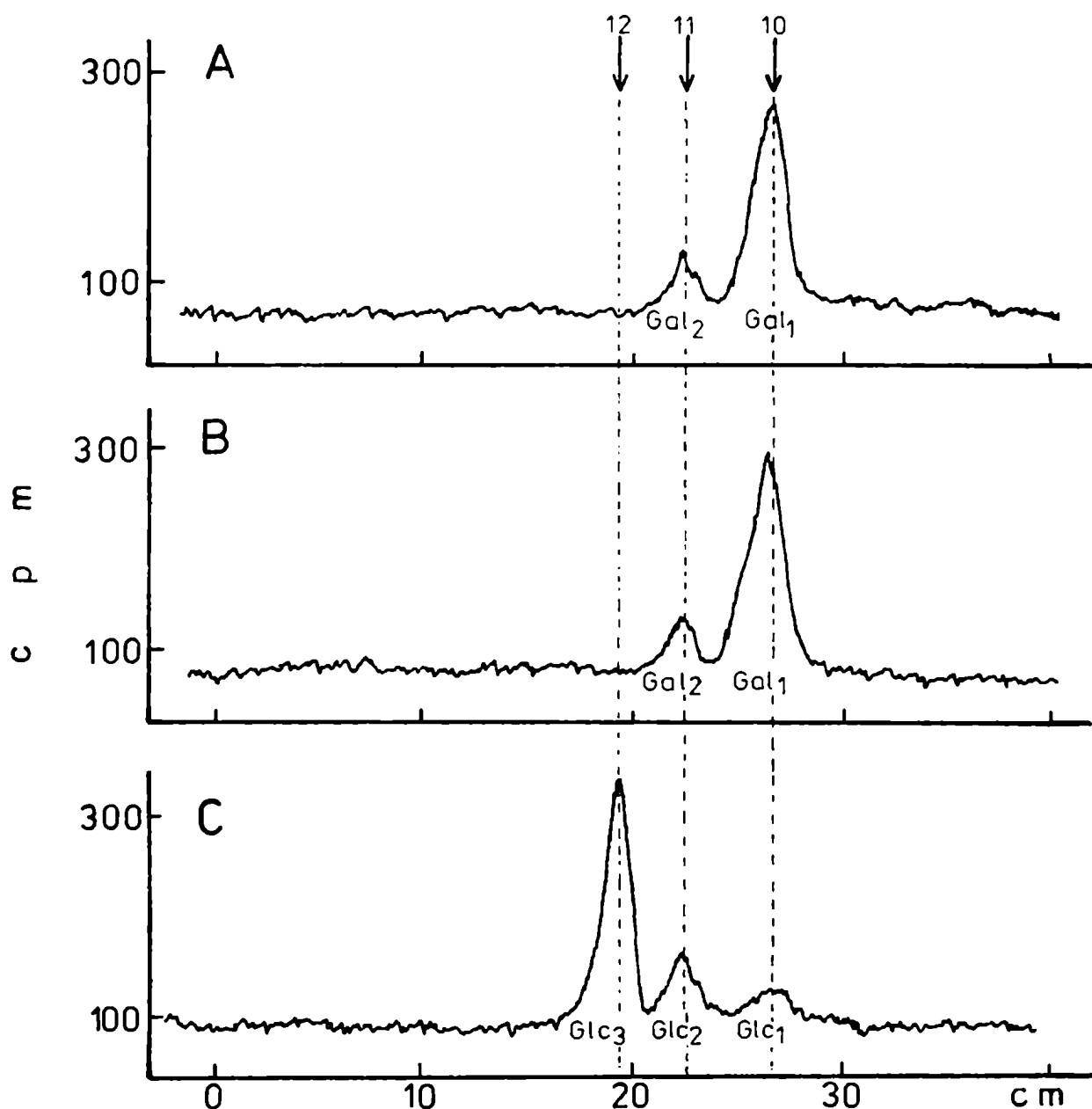


Fig. 38: Oligosacáridos marcados con (¹⁴C)galactosa obtenidos en presencia de UDP-Glc.

El Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal se preparó a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal como se indicó en la leyenda de la fig. 23. Se usó la mezcla de incubación A descrita en 3.3.1., a la cual se le añadió además Cl₂Mg 6 mM y UDP-Glc 50 nmoles.

En el cuadro A se incubó durante 10 min y en el B durante 30 min. Los oligosacáridos fueron liberados por hidrólisis ácida suave de los extractos 1103 (sección 3.6.1.) y cromatografiados con el solvente E durante 6 días. En el cuadro C se cromatografió un estándar de oligosac-(³H)Glc₁, oligosac-(³H)Glc₂, y oligosac-(³H)Glc₃ preparado como se describió en 3.2.7.1 (método A).

Tabla 9: Efecto del Dol-P-Glc sobre la incorporación de (¹⁴C)galactosa a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal a extracto 1103.

Incub.	Sustrato	⁽¹⁴ C)Gal inc. en 1103 (cpm)		⁽¹⁴ C)Glc inc. en 1103 (cpm)	
		10 min	30 min	10 min	30 min
A	Dol-P-(¹⁴ C)Gal	1.860	2.940	---	---
B	Dol-P-(¹⁴ C)Gal/Dol-P-Glc 1:1	2.550	3.570	---	---
C	Dol-P-(¹⁴ C)Gal/Dol-P-Glc 1:10	1.395	1.355	---	---
D	Dol-P-(¹⁴ C)Glc	---	---	4.215	4.735

Se efectuaron incubaciones con mezcla A como se indicó en la sección 3.3.1. a partir de los siguientes sustratos:

Incub. A: Dol-P-(¹⁴C)Gal (32,4 pmoles) (8.800 cpm).

Incub. B: Dol-P-(¹⁴C)Gal (32,4 pmoles) (8.800 cpm) y Dol-P-Glc (30 pmoles).

Incub. C: Dol-P-(¹⁴C)Gal (32,4 pmoles) (8.800 cpm) y Dol-P-Glc (300 pmoles).

Incub. D: Dol-P-(¹⁴C)Glc (7.700 cpm).

El tiempo de incubación fue 10 o 30 min según se indica en cada columna. Se midió la radioactividad incorporada en el extracto 1103.

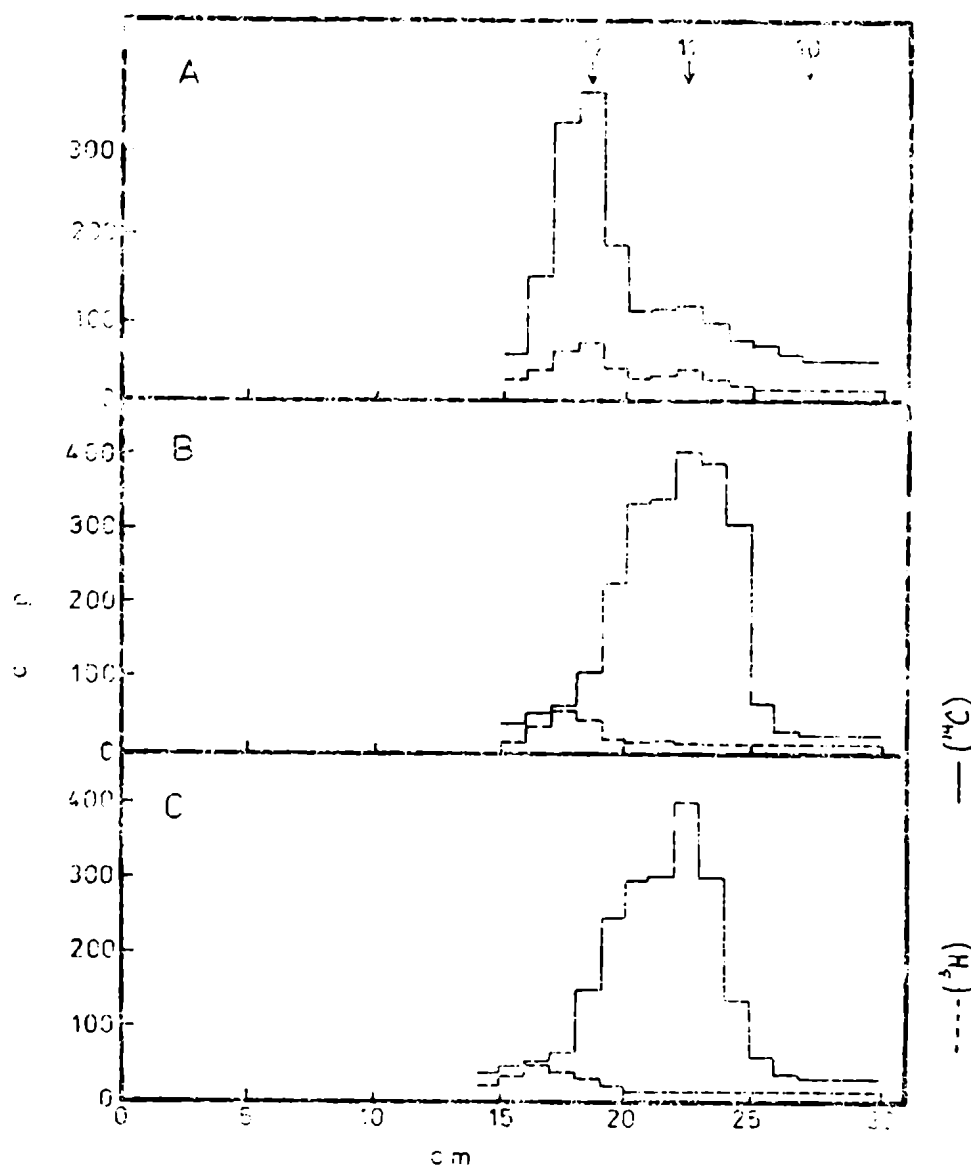


Fig. 39: Oligosacáridos glucosilados y galactosilados obtenidos en presencia de DOC 0,5% en la mezcla de incubación.

Se efectuaron tres incubaciones en las condiciones descritas en la sección 3.2.7.3. (método III), es decir usando DOC como detergente, a partir de distintos sustratos:

Cuadro A: Dol-P-(¹⁴C)Glc (7.000 cpm = 20 pmoles).

Cuadro B: Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.500 cpm = 32,4 pmoles).

Cuadro C: Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.500 cpm = 32,4 pmoles) y Dol-P-Glc (30 pmoles).

Las incubaciones (volumen final = 100 ul) se realizaron a 30°C durante 10 min se procesaron por el método B (sección 3.3.1.2.). Los extractos 1103 así obtenidos se sometieron a hidrólisis ácida suave y los oligosacáridos liberados se cromatografiaron con el solvente E durante 5 días. En los tres casos se añadió estándar interno de oligosac-(³H)Glc₃ y oligosac-(³H)Glc₂ preparados por el método I (sección 3.2.7.1.).

4.7. Estudios estructurales de los oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂.

Al no encontrar la manera de obtener un compuesto galactosilado con la movilidad del oligosac-Glc₃ (sección 4.6.4.8.), y teniendo en cuenta que utilizando Dol-P-(¹⁴C)Gal como dador único o en presencia de UDP-Glc o de Dol-P-Glc, los derivados principales que se obtenían eran los oligosac-(¹⁴C)Gal₁ y oligosac(¹⁴C)Gal₂ (sección 4.6.4.8.); se decidió indagar un poco más su estructura, pues hasta aquí solo se sabía que la mezcla de ambos contenía manosa (sección 4.6.4.1.) y dos N-acetil-amino azúcares, presumiblemente N-acetilglucosamina (sección 4.6.4.2.).

4.7.1. Oxidación con periodato.

Se utilizó esta técnica para averiguar, especialmente en el caso del oligosac-(¹⁴C)Gal₂, si las galactosas eran terminales o estaban cubiertas por algún substituyente. Para ello, el oligosac-(¹⁴C)Gal₁, el oligosac-(¹⁴C)Gal₂ y metil α -D-(¹⁴C)glucosa, se trataron con mataperiodato de sodio por el método descrito en la sección 3.6.5., y los productos de degradación se analizaron por electroforesis (fig. 40). En los tres casos se observaron dos picos de radioactividad. El menor de ellos correspondió al ácido fórmico formado y el otro al oligosacárido oxidado. Midiendo las áreas de ambos picos se determinaron los porcentajes de ácido fórmico liberado (Tabla 10).

Para hexosas terminales, el rendimiento teórico de ácido fórmico es 16,6%, ya que solo uno de los seis átomos de carbono daría lugar a la formación de dicho ácido. Los resultados de la tabla 10 indican que las galactosas son terminales o están a lo sumo O-glicosídicamente substituidas en la posición 6, pues es la

única forma por la cual se obtienen los porcentajes de ácido fórmico indicados.

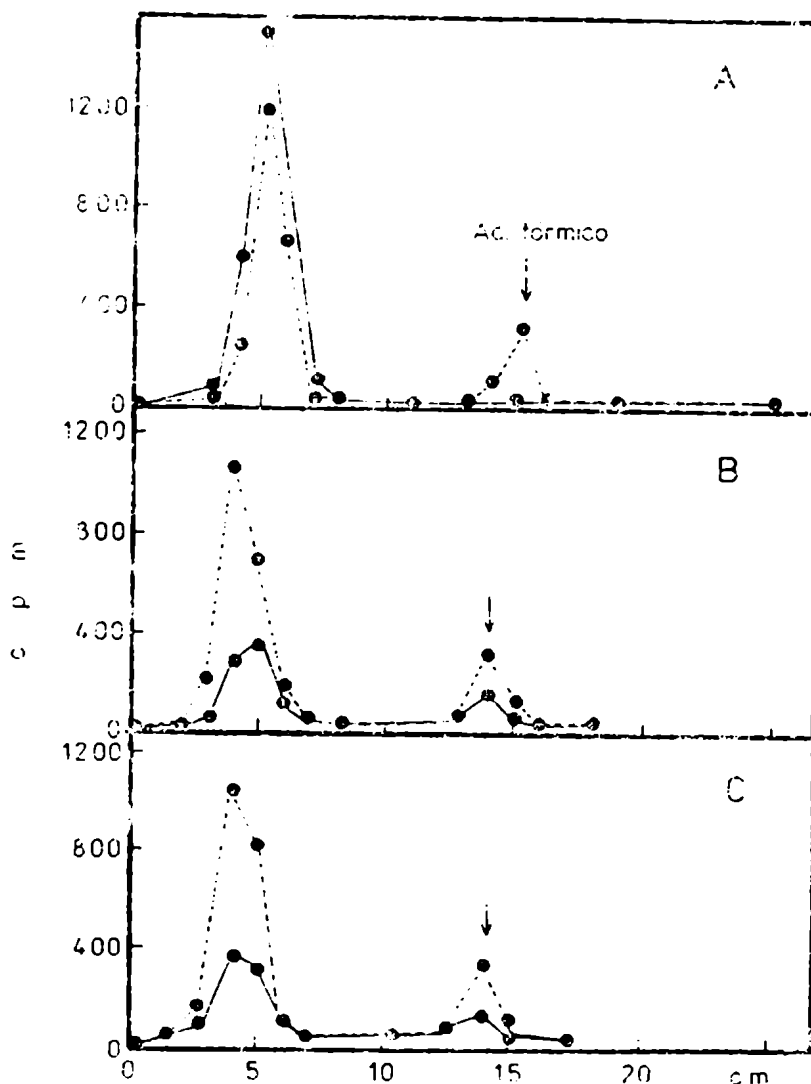


Fig. 40: Liberación de ácido fórmico por tratamiento de oligosac-(¹⁴C)Gal₁ y oligosac-(¹⁴C)Gal₂ con periodato.

Los oligosac-(¹⁴C)Gal₁ (2.500 cpm) y oligosac(¹⁴C)Gal₂ (2.600 cpm) fueron tratados con periodato (sección 3.6.5.). Como no se disponía de estandar de ácido fórmico, se lo preparó sometiendo metil-α-D-(¹⁴C)glucosa a idéntico tratamiento tres muestras (I, II y III) conteniendo 6.000 cpm cada una. Los productos formados fueron electroforetizados en papel, en buffer Tris-ClH 0,1 M pH 7,8 a 2 mA por tira de 3 cm de ancho durante 40 min, en grupos de a dos en la siguiente forma:

Cuadro A: — metil-α-D-(¹⁴C)glucosa sin tratar.
 --- metil-α-D-(¹⁴C)glucosa oxidado (muestra I).

Cuadro B: — oligosac-(¹⁴C)Gal₁ oxidado con periodato.
 --- metil-α-D-(¹⁴C)glucosa oxidado (muestra II).

Cuadro C: — oligosac-(¹⁴C)Gal₂ oxidado con periodato.
 --- metil-α-D-(¹⁴C)glucosa oxidado (muestra III).

En todos los casos las tiras de papel fueron cortadas en bandas de 1 cm de ancho y en cada una de ellas se midió la radioactividad como se describió en la sección 3.8.1.

Tabla 10: Liberación de ácido fórmico por oxidación con periodato.

Compuesto	% de ácido fórmico liberado
oligosac-(¹⁴ C)Gal ₁	17,5
oligosac-(¹⁴ C)Gal ₂	17
metil- α -D-(¹⁴ C)glucosa (muestra I)	15,4
metil- α -D-(¹⁴ C)glucosa (muestra II)	16,4
metil- α -D-(¹⁴ C)glucosa (muestra III)	17,2

Estas cifras se calcularon midiendo las áreas de los picos mostrados en la fig. 40, y calculando que porcentaje del área total correspondería al pico de ácido fórmico.

4.7.2. Permetilación.

Para discernir entre estas dos posibilidades, los dos oligosacáridos de galactosa se permetilaron según el método descrito en la sección 3.6.6. Los compuestos permetilados fueron hidrolizados y corridos en capa delgada con el solvente F (fig. 41). Tanto el oligosac-(^{14}C)Gal₁ como el oligosac-(^{14}C)Gal₂ dieron un único pico de radioactividad coincidente con el estándar de 2,3,4,6-tetrametilgalactosa. Con este resultado se concluyó que tanto en el oligosac-(^{14}C)Gal₁ como en el oligosac-(^{14}C)Gal₂, la galactosa es terminal.

4.7.3. Tratamiento con α manosidasa.

Teniendo en cuenta los estudios realizados hasta aquí (permetilación, oxidación con periodato, tratamiento con α manosidasa y endo N-acetilglucosaminidasaH, tratamiento alcalino reductor y tamaño de los oligosacáridos) se postularon para los oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂ las estructuras mostradas en la fig. 46.

Para confirmar estas estructuras, se trataron con manosidasa a los oligosacáridos galactosilados aislados (oligosac-(^{14}C)Gal₁ y oligosac-(^{14}C)Gal₂). Como parte de este estudio comparativo, también se incubaron con α manosidasa los oligosac-(^{14}C)Glc, oligosac-(^{14}C)Glc₂ y oligosac-(^{14}C)Glc₃. En todos los casos, se analizaron los productos de degradación por cromatografía en solvente E. Se pudo observar que cada uno de los cinco componentes estudiados produjeron dos compuestos radioactivos. Estos compuestos radioactivos presentaron un cambio de movilidad que se adjudicó a la pérdida de 4 a 5 residuos

manosa como era de esperar de acuerdo a las estructuras propuestas (fig. 46), siendo el de menor movilidad el producto principal (fig. 42). La presencia del otro compuesto minoritario posiblemente se debió a degradación parcial, pues la manosa unida en posición α 1-6 a la manosa del core (fig. 3) es más difícil de eliminar (observaciones personales de Parodi, A.J.)

Es importante destacar que el oligosac-(^{14}C)Gal₁ se comportó en forma similar al oligosac-(^{14}C)Glc₁ y el oligosac-(^{14}C)Gal₂ al oligosac-(^{14}C)Glc₂.

No se observó liberación de (^{14}C)galactosa ni de (^{14}C)glucosa .

Estos resultados sugirieron que las galactosas estarían en la misma rama que las glucosas, es decir, unidos a la manosa α 1-3 del core (fig. 46).

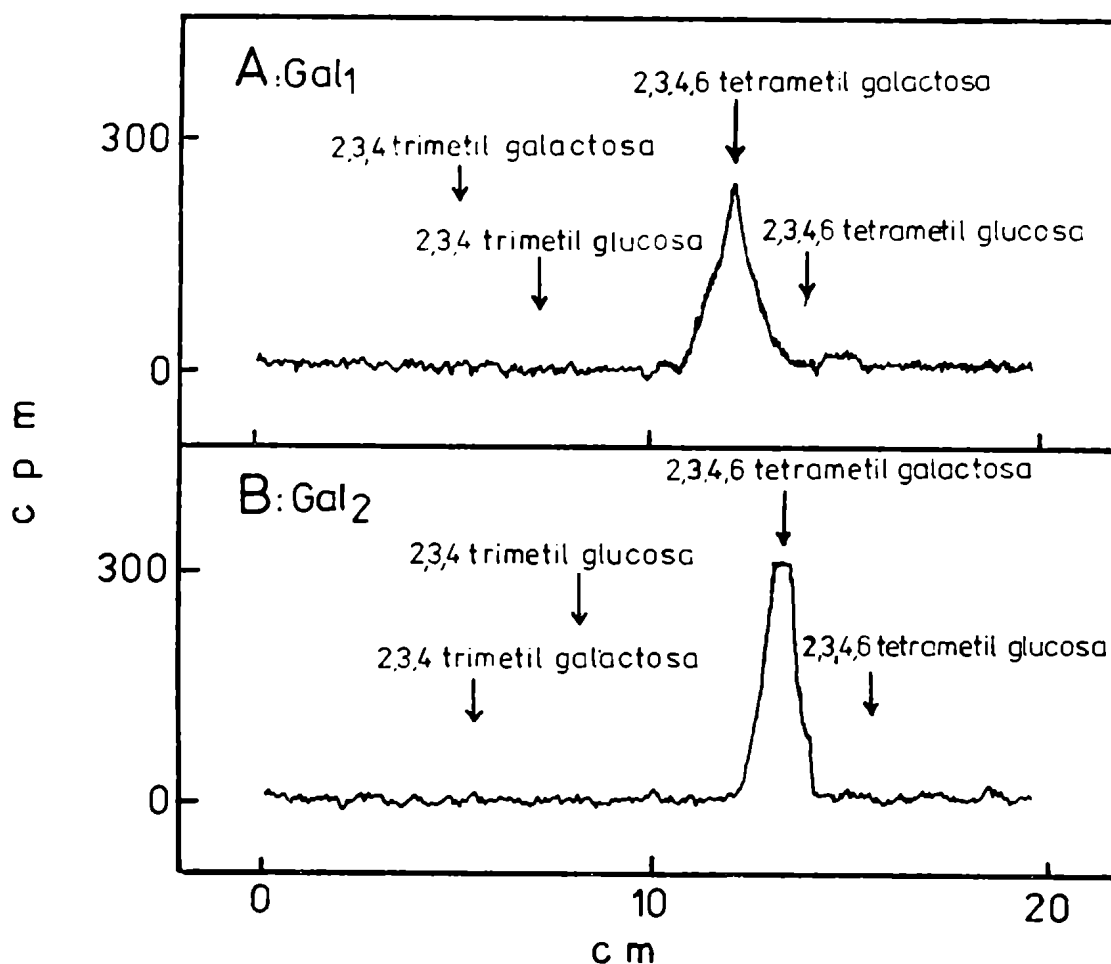


Fig. 41: Permetilación de oligosac-(¹⁴C)Gal₁ y oligosac-(¹⁴C)Gal₂.

oligosac-(¹⁴C)Gal₁ (3.300 cpm) (cuadro A), y oligosac-(¹⁴C)Gal₂ (10.000 cpm) (cuadro B), se permitilaron según el método descrito en 3.6.6. El material permitilado se hidrolizó con ClH 1 N durante 4 horas. Se evaporó con N₂ varias veces, llevándolo a seco para quitarle el exceso de ClH y se sembró en banda de 3 cm en una placa de Kieselgel 60, desarrollándolo con el solvente F. Las flechas indican la posición de los estándares de 2,3,4,6-tetrametil-galactosa, 2,3,4-trimetil-galactosa, 2,3,4-trimetil-glucosa y 2,3,4,6-tetrametil-glucosa.

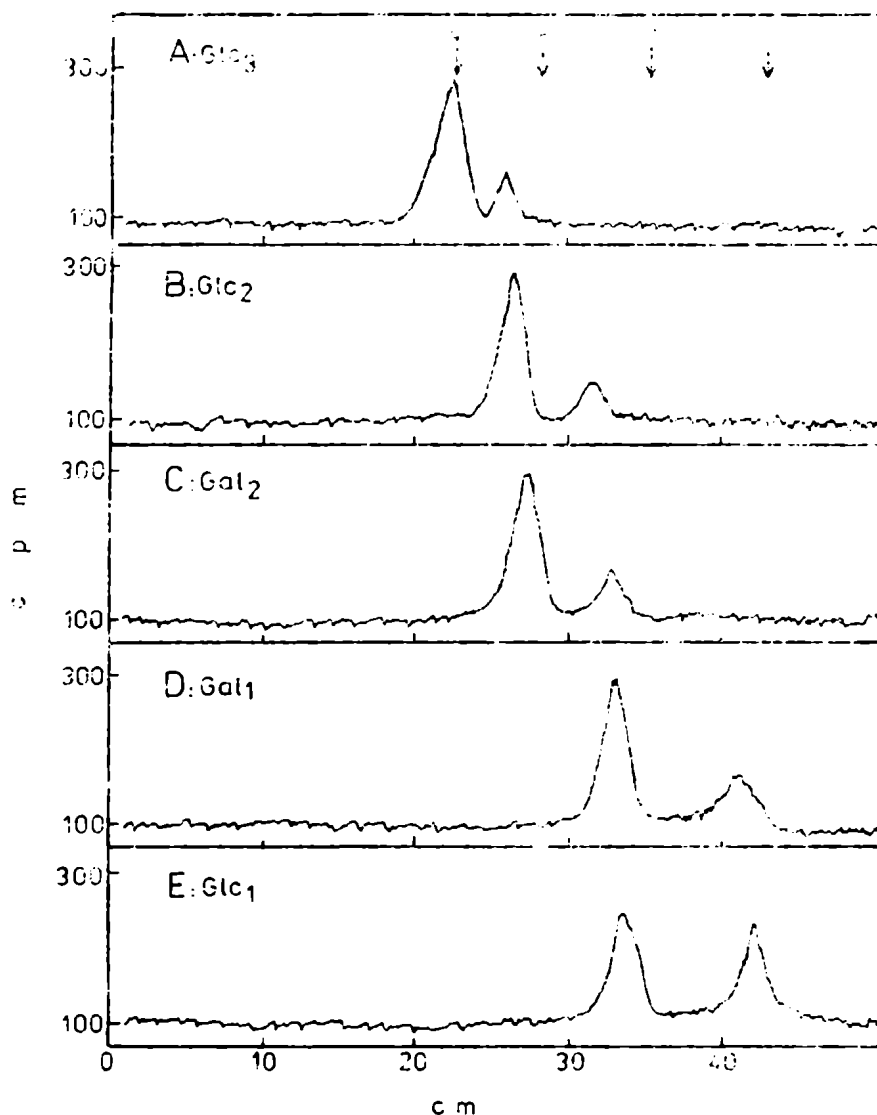


Fig. 42: Tratamiento con α manosidasa de oligosacáridos de glucosa y de galactosa marcados con (^{14}C).

Se incubaron 5.000 a 8.000 cpm de cada una de las muestras con 0,5 mg de α manosidasa en buffer citrato 50 mM pH = 4,5, en un volumen final de 250 μl . Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 48 hs y bajo atmósfera de N_2 . Las reacciones se detuvieron por agregado de un volumen de etanol. Luego de centrifugar, los sobrenadantes se desalaron cromatografiándolos por columnas de Bio Gel P2 (sección 3.7.3.). En todos los casos, la radioactividad se recuperó en la zona de exclusión total. Esta fracción, para cada muestra, se cromatografió en papel en el solvente E durante 3 días.

A:oligosac-(^{14}C)Glc₃; B:oligosac-(^{14}C)Glc₂; C:oligosac-(^{14}C)Gal₂; D:oligosac-(^{14}C)Gal₁; E:oligosac-(^{14}C)Glc₁. Los números sobre las flechas indican el número de hexosas que contienen los maltooligosacáridos utilizados como estándar y las flechas la posición en que migran.

4.7.4. Acetolisis.

Para completar este estudio comparativo, se sometieron a una acetolisis parcial los siguientes compuestos: oligosac-(^{14}C)Gal₁, oligosac-(^{14}C)Gal₂, oligosac-(^{14}C)Glc₁, y oligosac-(^{14}C)Glc₂, y los productos se analizaron por cromatografía en solvente C. Como se puede ver en la fig. 43 (A y B), los perfiles obtenidos a partir de oligosac-(^{14}C)Gal₁ y oligosac-(^{14}C)Glc₁ son muy similares. Esto confirmaría que la posición que ocupa la galactosa en el oligosac-(^{14}C)Gal₁ es semejante a la que ocupa la glucosa en el oligosac-(^{14}C)Glc₁, es decir, unida a la última manosa de la rama α 1-3. En cuanto a los perfiles obtenidos a partir de oligosac-(^{14}C)Gal₂ y oligosac-(^{14}C)Glc₂, no son tan parecidos (fig. 43, C y D), sobre todo en la zona de los disacáridos y trisacáridos, ya que como era de esperar, el oligosac-(^{14}C)Glc₂, al tener las dos glucosas marcadas con (^{14}C), produjo un perfil más complejo en esta zona. Recordemos que en el oligosac-(^{14}C)Gal₂, la galactosa marcada es terminal; y que por analogía con el oligosac-(^{14}C)Glc₂, esta galactosa estaría unida en posición α 1-3 a la primera glucosa que en este caso no es radioactiva. Se puede ver también que, en todos los casos, el oligosacárido más grande obtenido fue el de 7 azúcares, ya que la acetólisis es un método en el cual la unión 1-6 se rompe con más probabilidad que las 1-2, 1-3, ó 1-4 también existentes en el oligosacárido (fig. 46).

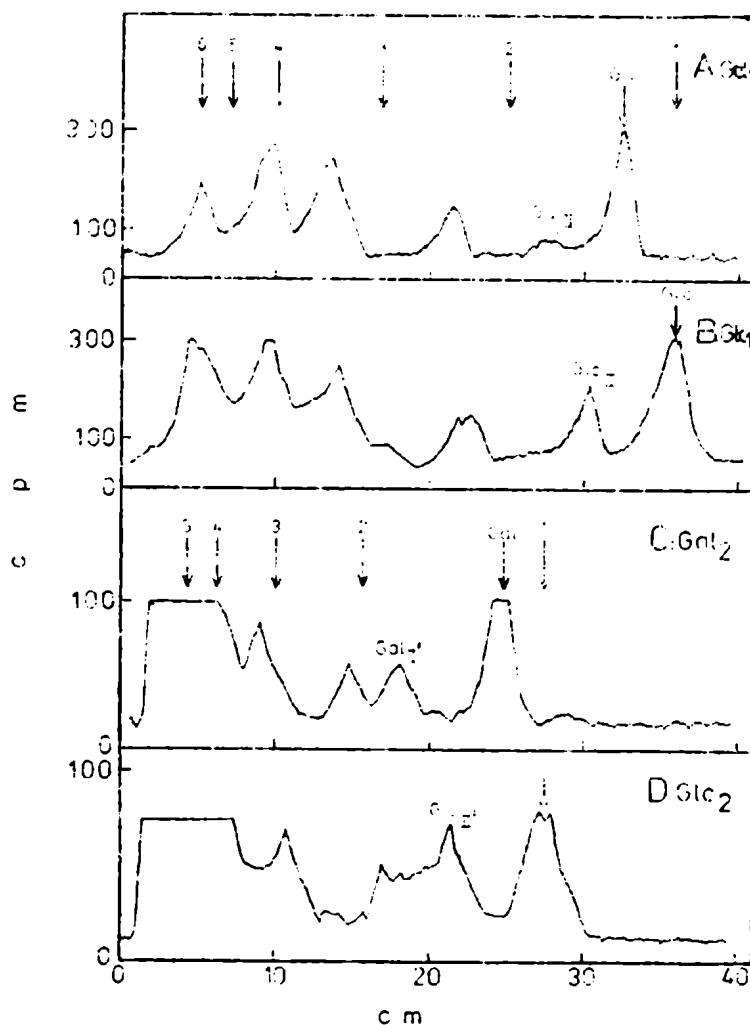


Fig. 43: Acetólisis parcial de oligosacáridos de glucosa y de galactosa marcados con ^{14}C .

Los oligosacáridos (40.000 cpm de cada uno) se acetolizaron según la técnica descrita en la sección 3.6.4. Las muestras se cromatografiaron luego con el solvente C durante 3 días.

A: oligosac- ^{14}C Gal₁; B: oligosac- ^{14}C Glc₁; C: oligosac- ^{14}C Gal₂; D: oligosac- ^{14}C Glc₂.

Los números sobre las flechas indican el número de hexosas que contienen los maltooligosacáridos utilizados como standard, y las flechas la posición a la que migran.

4.7.5. Caracterización de los disacáridos marcados con $(^{14}\text{C})\text{Gal}$.

Con el objeto de caracterizar el punto de unión entre la galactosa y el oligosacárido aceptor de los productos de acetólisis parcial de los oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_1$ y oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_2$, se eluyeron los compuestos de la zona donde presumiblemente migran los disacáridos (compuestos Gal_{II} y Gal_{II}' , fig. 43). Estos disacáridos fueron reducidos con borohidruro de sodio según la técnica descrita en la sección 3.6.7., obteniéndose los compuestos Gal_{II} y Gal_{II}' reducidos, y luego se sometieron a electroforesis en buffer G (fig. 44). En este buffer solo migran los polioles capaces de formar complejos con el molibdato. La glucosa libre y los 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 (261). Lo mismo sucede con la manosa, el manitol y sus derivados. La fig. 44 muestra que los disacáridos reducidos provenientes de la acetólisis parcial tanto del oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_1$ como del oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_2$ permanecieron en la zona neutra al igual que el obtenido del oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Glc}_1$ (compuesto Glc_{II} red.) que como ya se sabía era glucosa α 1-3 manitol.

Esto demostraría que la galactosa terminal tanto en el oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_1$ como en el oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_2$ está ligada en posición 1-3 al otro azúcar. Para corroborar esto, los disacáridos reducidos fueron eluidos del papel, desalados y sometidos a

cromatografía en el solvente C (fig. 45). Se puede ver que ambos compuestos migraron en forma diferente. El disacárido reducido proveniente de la acetólisis del oligosac-(^{14}C)Gal₁ (Gal_{II} red.) mostró un $R_{\text{Glc.01}} = 0,69$ y el proveniente de la acetólisis del oligosac-(^{14}C)Gal₂ (Gal_{II'} red) un $R_{\text{Glc.01}} = 0,64$. Estos datos llevaron a suponer que el disacárido reducido obtenido por acetilación parcial del oligosac-(^{14}C)Gal₁, es el galactosil 1-3 manitol, y el obtenido del oligosac-(^{14}C)Gal₂ es el galactosil 1-3 sorbitol (fig. 46) pues en este solvente el manitol migra más ($R_{\text{Glc.01}} = 1,2$) que el galactitol ($R_{\text{Glc.01}} = 1,05$).

De todos los estudios arriba mencionados (permetilación, oxidación con peridato, acetólisis parcial, tratamiento con α manosidasa y con endo N-acetilglucosaminidasa H, reductor alcalino, etc.) se concluyó que las estructuras del oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂ son las que se propusieron en la fig. 46.

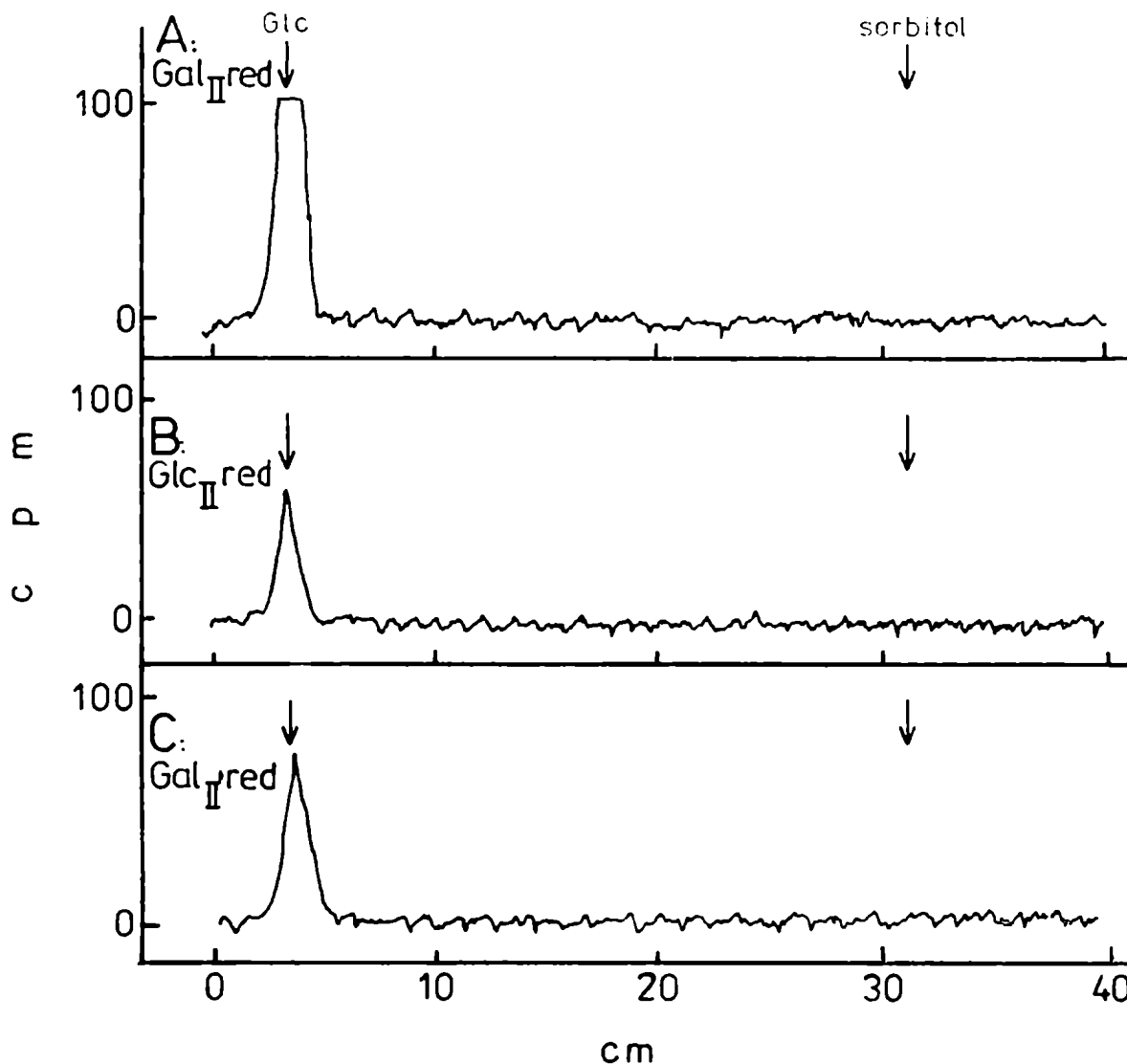


Fig. 44: Caracterización de los disacáridos reducidos marcados con $(^{14}\text{C})\text{Gal}$ y $(^{14}\text{C})\text{Glc}$.

El material de la zona de los disacáridos de los cromatogramas mostrados en la fig 43 A, B, y C se eluyó (compuestos Gal_{II}, Glc_{II} y Gal_{II}'). Estos disacáridos fueron reducidos con borohidruro de sodio como se señaló en la sección 3.6.7. Las muestras se sometieron a electroforesis en el buffer G durante 3 hs a 1.000 Volts.

A: Gal_{II} red.

B: Glc_{II} red.

C: Gal_{II}' red.

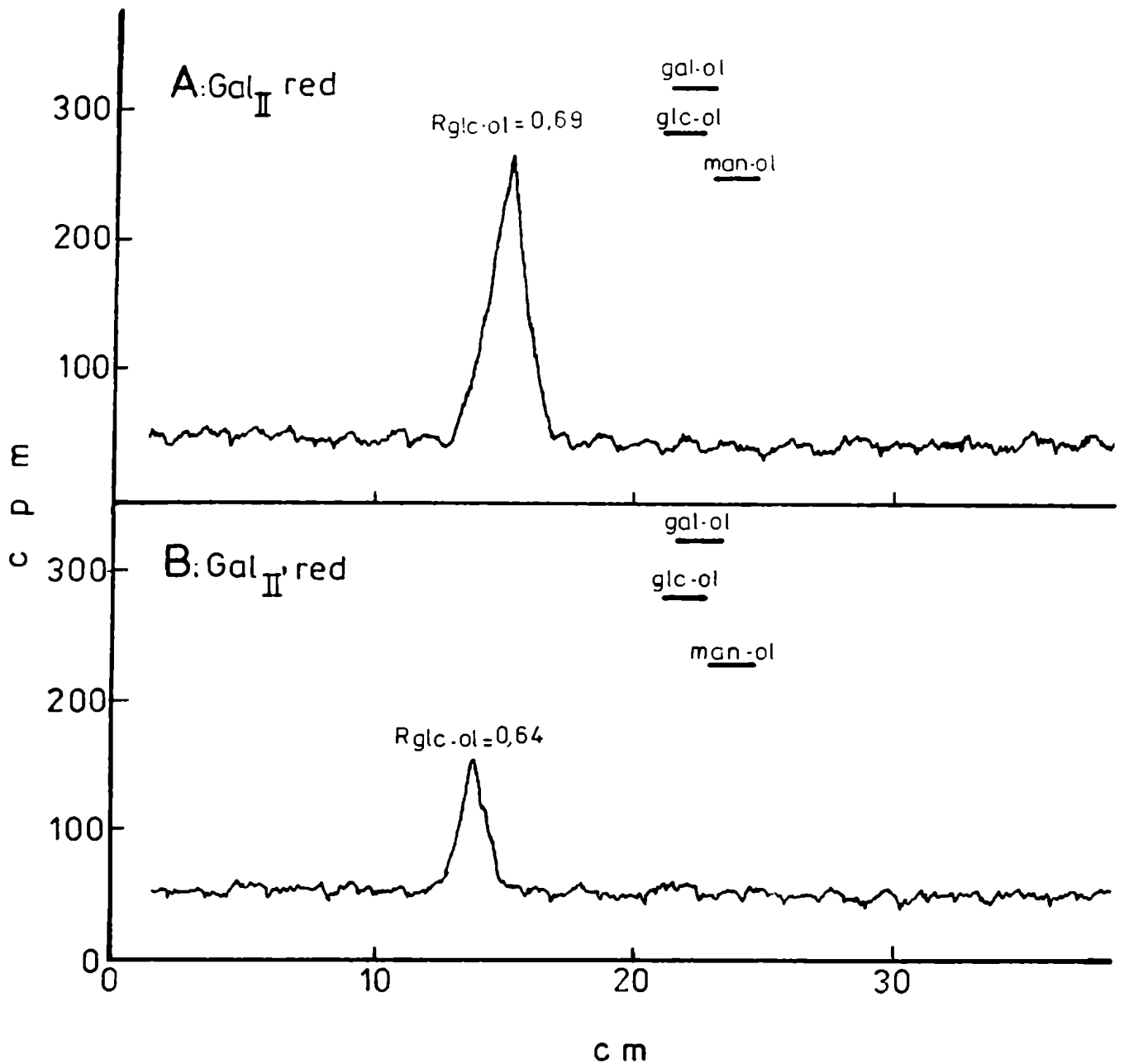


Fig. 45: Disacáridos reducidos marcados con (^{14}C) galactosa cromatografiados en el solvente C.

El material eluído de los picos de radioactividad mostrados en la fig. 44 A y C fue desalado por sucesivos tratamientos con resina Dowex 50X H^+ y AG 1-X4 Cl^- . Ambas muestras fueron cromatografiadas con el solvente C durante 3 días.

A: disacárido reducido obtenido por acetólisis parcial del oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_1$ (Gal_{II} red.)

B: disacárido reducido obtenido por acetólisis parcial del oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Gal}_2$ (Gal_{II} ' red.).

4.8. Transferencia de (¹⁴C)galactosa a material insoluble en TCA caliente a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal.

Como ya se mencionó en la sección 4.3., la galactosa era transferida de Dol-P-(¹⁴C)Gal a dos fracciones; una fracción soluble en 1103 que contenía el Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal, y la otra insoluble en TCA caliente. Quedaría por analizar si la radioactividad presente en esta última fracción era incorporada directamente a partir del Dol-P-(¹⁴C)Gal, o si como etapa previa, era transferida a lípido-oligosacáridos intermediarios presentes en el extracto 1103, como sucede en muchas glicoproteínas, y luego al producto final. Para estudiar esta posibilidad, debido a lo trabajoso que resulta obtener cantidades grandes de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal, y como primera aproximación, se buscaron los requerimientos y las condiciones óptimas para obtener, a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal, el máximo de incorporación de (¹⁴C)galactosa a la fracción insoluble en TCA caliente.

Por otra parte, era necesario descartar la posibilidad de que se forme UDP-(¹⁴C)Gal durante la incubación y la galactosa se transfiera directamente del nucleótido al material insoluble en TCA, reacción ya descrita en las etapas finales del procesamiento (sección 1.4.7.5.).

4.8.1. Efecto del UDP-Gal.

Como primera medida, se hizo entonces un estudio análogo al efectuado en la sección 4.4.; es decir, se trató de descartar la posibilidad de que la transferencia se efectuara por una conversión del Dol-P-(¹⁴C)Gal a UDP-(¹⁴C)Gal (reacción descrita en la sección 4.4.), y que de este último se transfiriera

(^{14}C)galactosa a proteína (sección 1.4.7.5.). Para ello se realizaron incubaciones usando distintos dadores (Tabla 11); en un caso se usó Dol-P-(^{14}C)Gal (A), en otro se usó Dol-P-(^{14}C)Gal con el agregado de un gran exceso de UDP-Gal (B), y en el otro UDP-(^{14}C)Gal (C). Comparando los resultados obtenidos en A y B (Tabla 11), se observó que el agregado de UDP-Gal en una relación molar de 1 a 1.600 no afectó mayormente la incorporación de (^{14}C)galactosa a material insoluble en TCA caliente. Este dato llevaría a pensar que el Dol-P-(^{14}C)Gal actuaría en principio directamente como dador de galactosa y no a través de la conversión de éste en UDP-(^{14}C)Gal. Esto fue confirmado por el experimento C, en el cual se usó directamente UDP-(^{14}C)Gal como dador. En este último caso, si bien la cantidad absoluta de azúcar transferido fue mayor, pues se partió de una cantidad más grande de dador, la eficiencia de transferencia fue menor (1,1% en el experimento C, y 5% en el experimento A). Además, si consideramos que en el experimento B el Dol-P-(^{14}C)Gal pudiera dar UDP-(^{14}C)Gal, este último bajaría su actividad específica por la presencia de un gran exceso de UDP-Gal sin marcar presente en la mezcla de incubación. En este caso, y suponiendo que la reacción fuera total, con lo cual la actividad específica sería la máxima posible, y haciendo los cálculos correspondientes, se deberían obtener por lo menos 2.200 pmoles de material insoluble en TCA caliente. Esto está en discrepancia con los 4,5 pmoles obtenidos en el experimento C. Por lo tanto, estos resultados confirmarían los hallados anteriormente (sección 4.4.) y descartarían la posibilidad de que la transferencia se efectúe por intermedio de UDP-

Gal.

4.8.2. Requerimiento de Mn⁺⁺.

Se estudió el efecto de cationes bivalentes en la transferencia de (¹⁴C)galactosa de Dol-P-(¹⁴C)Gal a material insoluble en TCA caliente (Tabla 12). De estos resultados se puede concluir que dicha transferencia requiere Mn⁺⁺ como catión bivalente. El Mg⁺⁺ no lo sustituye. El EDTA-Na₂ inhibe toda transferencia. Esto era de esperar, pues en el caso de la transferencia de la porción sacarídica de Dol-PP-oligosac-Glc₃ a proteína, el Mn⁺⁺ es un catión indispensable en la mezcla de incubación (109).

Tabla 11: Incorporación de (¹⁴C)galactosa a partir de diferentes dadores a material insoluble en TCA caliente (efecto del agregado de UDP-Glc).

Dador de galactosa	Material insoluble en TCA caliente (cpm) (pmoles)	
A: Dol-P-(¹⁴ C)Gal	531	1,5
B: Dol-P-(¹⁴ C)Gal + UDP-Gal	486	1,3 ó 2.200 ó más
C: UDP-(¹⁴ C)Gal	2.000	4,5

Las reacciones se hicieron usando la mezcla de incubación A descrita en la sección 3.3.1., a la cual se le añadió Cl₂Mn 7 mM.

Los sustratos usados fueron:

A: Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.480 cpm 30 pmoles)

B: Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.480 cpm 30 pmoles) y UDP-Gal (48.000 pmoles).

C: UDP-(¹⁴C)Gal (180.000 cpm de AE = 268 uCi/umol, 370 pmoles).

Se usó 5 mg de enzima y se incubó durante 30 min a 30°C. La reacción se detuvo por agregado de 1 ml de TCA y luego se procesó como se describió en la sección 3.3.1.3. (método C₁).

Se midió la radioactividad retenida en los filtros de fibra de vidrio, incorporada a material insoluble en TCA caliente utilizando tolueno-*o*-minifluor como líquido de centelleo (sección 3.8.1.).

Tabla 12: Requerimiento de Mn⁺⁺.

Condiciones de incubación	Material insoluble en TCA caliente
A: Sin adiciones	-----
B: Cl ₂ Mn	420
C: Cl ₂ Mg	6
D: EDTA-Na ₂	-----

Dol-(¹⁴C)Gal (10.520 cpm = 30 pmoles) se incubaron con 5 mg de microsomas de hígado utilizando la mezcla de incubación A descrita en la sección 3.3.1., a la cual se le hicieron los siguientes agregados:

- A: Sin adiciones.
- B: Cl₂Mn 10 mM.
- C: Cl₂Mg 10 mM.
- D: EDTA-Na₂ 3 mM.

Se incubó durante 30 min a 30°C. La reacción se detuvo con 1 ml de TCA , y luego se procesó como se describe en la sección 3.3.1.3. (método C₁). Se midió la radioactividad en los filtros de fibra de vidrio con el material insoluble en TCA caliente usando tolueno-*o*-minflúor como líquido de centelleo como se describe en la sección 3.8.1.

4.8.3. Efecto de la concentración de Mn^{++} .

Ya que el Mn^{++} es un catión requerido en la transferencia de galactosa de Dol-P- (^{14}C) Gal a proteína, se quiso estudiar como variaba dicha transferencia en función de la concentración del catión bivalente (fig. 47). La concentración óptima de Mn^{++} resultó ser de 7 a 10 mM.

4.8.4. Efecto del tiempo de incubación.

Se estudió la transferencia de (^{14}C) galactosa de Dol-P- (^{14}C) Gal a material insoluble en TCA caliente en función del tiempo de incubación (fig. 48). Se observó que la incorporación fue lineal hasta los 20 min iniciándose luego una meseta.

4.8.5. Efecto de diferentes detergentes.

Se analizó como variaba la incorporación de (^{14}C) galactosa a material insoluble en TCA caliente al usar diferentes detergentes en la mezcla de incubación (fig. 49). El Tritón X-100 pareció ser el detergente más adecuado para obtener una máxima incorporación de marca a dicho material. Es por esta razón que se usó Tritón X-100 para los estudios posteriores.

4.8.6. Efecto de la concentración de Tritón X-100.

Se investigó el efecto del detergente Tritón X-100 en la transferencia de (^{14}C) galactosa de Dol-P- (^{14}C) Gal a material insoluble en TCA caliente (fig. 50). Esta transferencia, al igual que la transferencia de (^{14}C) galactosa de Dol-P- (^{14}C) Gal al material soluble en 1103 (sección 4.5.), resultó ser totalmente dependiente de la concentración de detergente. Se obtuvo un máximo de incorporación a una concentración de detergente de 1,2%.

Este óptimo varió entre 1 y 1,2% para distintas preparaciones enzimáticas.

4.8.7. Efecto de la temperatura de incubación.

Otro de los parámetros investigados fue la temperatura de incubación (fig. 51). Se encontró un óptimo de incorporación a 30°C.

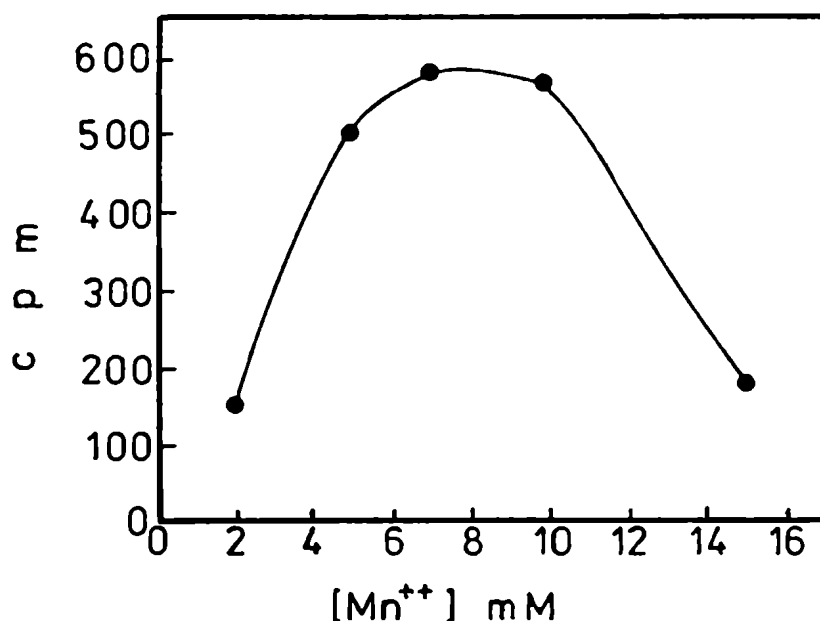


Fig. 47: Efecto de la concentración de Mn⁺⁺ en la transferencia de (¹⁴C)galactosa de Dol-P-(¹⁴C)Gal a material insoluble en TCA caliente.

Se empleó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.), a la que se le agregaron 30 pmoles de Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.480 cpm) y 5 mg de enzima. La concentración de Mn⁺⁺ es la indicada en cada caso. Luego de incubar durante 30 min a 30°C, la reacción se detuvo añadiendo 1 ml de TCA 5%, y luego se procesó por el método C₁ (sección 3.3.1.3.) en forma análoga a la indicada en la tabla 11.

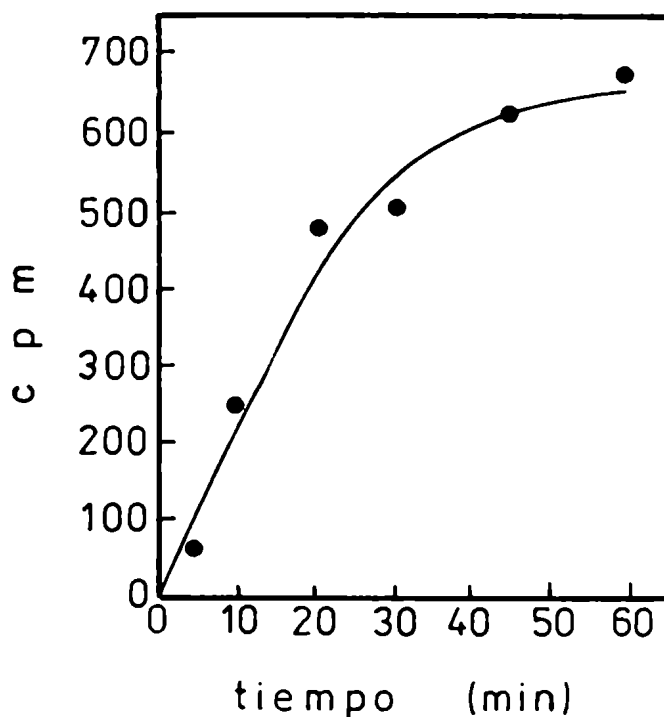


Fig. 48: Incorporación de (^{14}C) galactosa de Dol-P- (^{14}C) Gal a material insoluble en TCA caliente en función del tiempo.

Se empleó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.), a la que se le agregaron 30 pmoles de Dol-P- (^{14}C) Gal (10.480 cpm), Cl_2Mn 7 mM y 5 mg de enzima. Los tiempos de incubación fueron variando según se indica en cada punto del gráfico. Luego de incubar a 30°C , la reacción se detuvo por agregado de 1 ml de TCA 5%. Se procesó por el método C_1 (sección 3.3.1.3.).

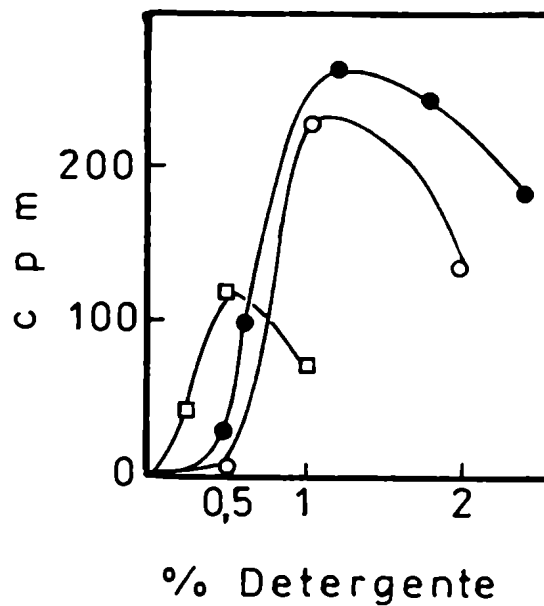


Fig. 49: Efecto de diferentes detergentes en la incorporación de (^{14}C) galactosa de Dol-P- (^{14}C) Gal a material insoluble en TCA caliente.

Se usó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.) a la que se le agregaron 30 pmoles de Dol-P- (^{14}C) Gal (10.480 cpm), Cl_2Mn 7 mM, 5 mg de enzima, y las concentraciones de detergente que se señalan en cada caso.

●—● Tritón X-100; ○—○ Nonidet P-40; □—□ Deoxicolato de sodio.

Se incubó 30 minutos a 30°C . Se procesó por el método C_1 (sección 3.3.1.3.).

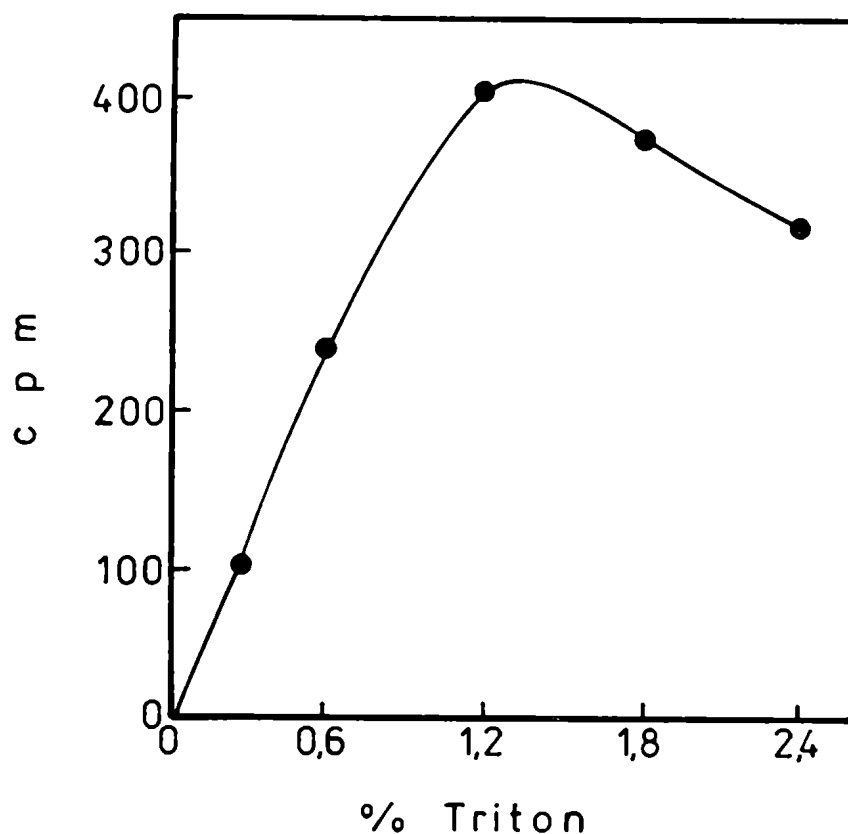


Fig. 50: Incorporación de (¹⁴C)galactosa de Dol-P-(¹⁴C)Gal a material insoluble en TCA caliente en función de la concentración de Tritón X-100.

Se usó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.), a la que se le agregaron 30 pmoles de Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.480 cpm), Cl₂Mn 7 mM, 5 mg de enzima, y las concentraciones de Tritón X-100 que se señalan en cada caso. Se incubó 30 min a 30°C. Se procesó por el método C₁ (sección 3.3.1.3.).

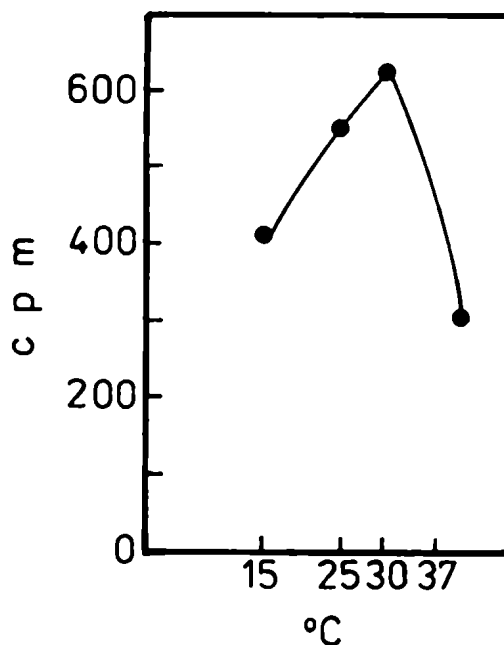


Fig. 51: Transferencia de (¹⁴C)galactosa de Dol-P-(¹⁴C)Gal a material insoluble en TCA caliente en función de la temperatura de incubación.

Se usó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.), a la que se le agregaron 30 pmoles de Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.480 cpm), Cl₂Mn 7 mM, y 5 mg de enzima. Se incubó durante 1 hora a las temperaturas indicadas en cada caso. Se procesó por el método C₁ (sección 3.3.1.3.).

4.9. Transferencia de (¹⁴C)galactosa de Dol-P-(¹⁴C)Gal a distintas fracciones en función del tiempo de incubación.

Como ya se señaló en la sección 4.3., la galactosa era transferida de Dol-P-(¹⁴C)Gal a distintas fracciones; una fracción soluble en 1103 (Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal), y otra insoluble en TCA caliente (glicoproteína). Un análisis más fino demostró que también se hallaba radioactividad en la fase acuosa (upper phase) al procesar la incubación por el método B (sección 3.3.1.2.). Se quiso estudiar como variaba la incorporación de radioactividad a cada una de estas fracciones en función del tiempo de incubación (fig. 52). Se observó una incorporación de (¹⁴C)galactosa en la fracción soluble en extracto 1103 que alcanzó su máximo a los 30 min - 60 min de incubación. La incorporación a proteína fue aumentando con el tiempo de incubación más lentamente que en el extracto 1103 hasta llegar a una meseta a los 60 min. En la fase acuosa o "upper phase", la incorporación de radioactividad fue aumentando hasta las 3 horas de incubación.

Un análisis grosero de la fase acuosa por cromatografía en una columna de Bio Gel P 2 (sección 3.7.3.) (los resultados no se muestran), reveló la existencia de dos picos de radioactividad; un pico que se excluyó y otro que se incluyó con una movilidad mayor que la de un estándar de (¹⁴C)sacarosa. Estos materiales no fueron posteriormente analizados. En ningún caso se obtuvo (¹⁴C)galactosa libre en la fase acuosa.

Estos resultados no descartarían la posibilidad que la galactosa fuera transferida a la proteína a partir del Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal encontrado en el extracto 1103.

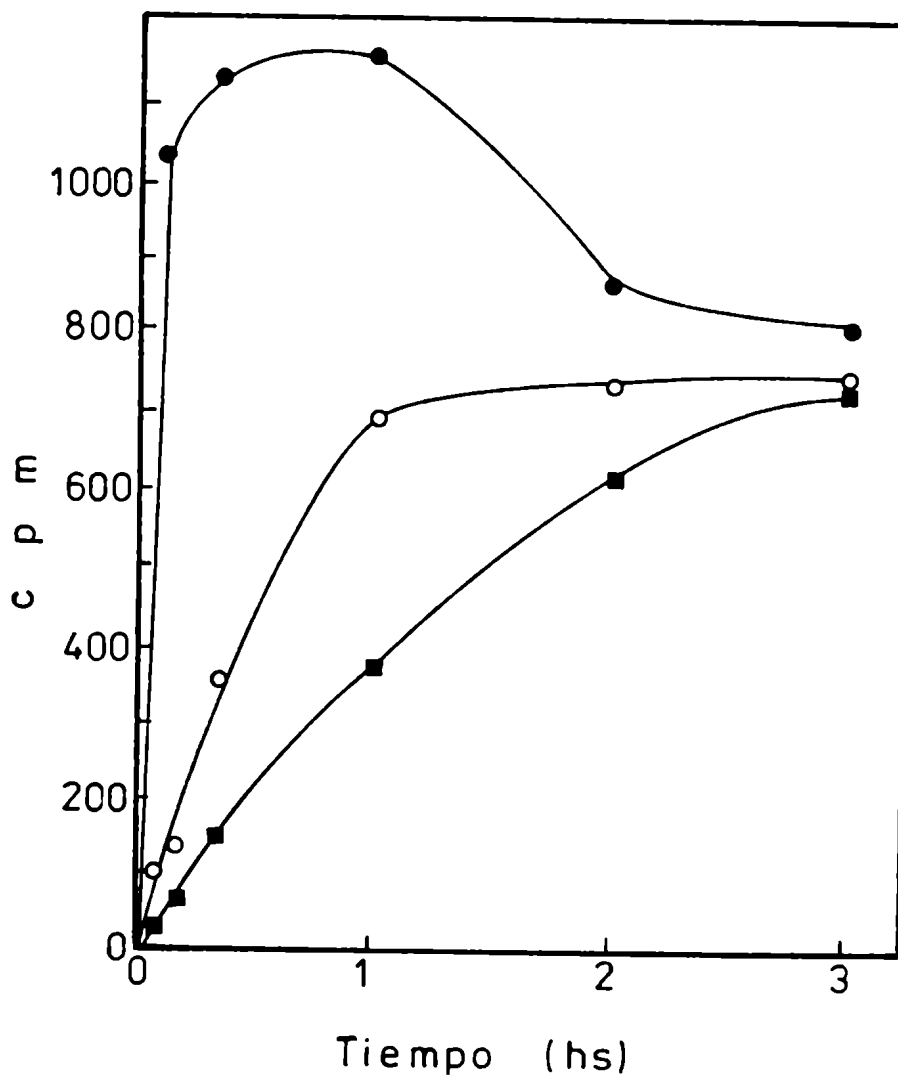


Fig. 52: Incorporación de (¹⁴C)galactosa de Dol-P-(¹⁴C)Gal a distintas fracciones en función del tiempo.

Se empleó la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.), a la que se añadieron 30 pmoles de Dol-P-(¹⁴C)Gal (10.480 cpm), Cl₂Mn 7 mM y 5 mg de enzima. Los tiempos de incubación se variaron como se indica en cada punto del gráfico. Se incubó a 30°C. Se procesó por el método B₁ (sección 3.3.1.2.).

- extracto 1103
- fase acuosa
- proteína

4.10. Transferencia a proteína de oligosacáridos marcados con (¹⁴C)glucosa o con (¹⁴C)galactosa a partir de sus respectivos Dol-PP-oligosacáridos.

En las secciones anteriores, se estudiaron las transferencias de (¹⁴C)galactosa a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal a Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal y a material insoluble en TCA caliente. Quedaba por probar ahora, por similitud al ya bien conocido ciclo del dolicol (sección 1.4.5.), que el Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal transfiere su porción sacarídica (oligosac-(¹⁴C)Gal) a proteína. Para optimizar las condiciones de transferencia y teniendo en cuenta que el Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc es un sustrato más fácil de preparar que el Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal, se buscaron las condiciones óptimas estudiando la transferencia a proteína del oligosac-(¹⁴C)Glc a partir de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc. Conviene aclarar que esta transferencia ya había sido estudiada en detalle por el grupo de Leloir y col. (109).

4.10.1. Transferencia a proteína del oligosac-(¹⁴C)Glc a partir de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc.

4.10.1.1. Efecto de la concentración de Tritón X-100.

Se sabía que la concentración de detergente era un parámetro crítico en la transferencia del oligosacárido del lípido oligosacárido a proteína y que la concentración óptima variaba de una preparación enzimática a otra.

Se estudió cual era esta concentración óptima para la preparación enzimática que se iba a usar posteriormente en la transferencia a proteína del oligosacárido marcado con (¹⁴C)galactosa (fig. 54). Resultó ser de 1 a 2% de Tritón X-100

en buena coincidencia con lo descrito en la sección 4.8.6. En estas condiciones se obtuvo un 43% de transferencia.

Conviene aclarar que se usaron tiempos cortos de incubación (5 min) para minimizar la acción de las glucosidasas que, como ya se sabe por los trabajos de Ugalde y col. (96), actuarían sobre el oligosacárido hidrolizando las glucosas y disminuyendo la radioactividad incorporada a proteína.

4.10.1.2. Efecto del tiempo de incubación.

Para ratificar que las glucosidasas actúan sobre el oligosac-(¹⁴C)Glc disminuyendo la radioactividad incorporada a proteína, se hicieron transferencias del oligosac-(¹⁴C)Glc a partir del Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc a proteína, usando tiempos mayores de incubación (fig. 55). La transferencia óptima se obtuvo a los 5 min y fue del 60% respecto del Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc usado. Conviene aclarar que usando otra preparación de enzima, se obtuvo un máximo de incorporación a los 10 min de incubación; esto posiblemente dependa de la actividad de glucosidasas endógenas existentes en cada preparación enzimática.

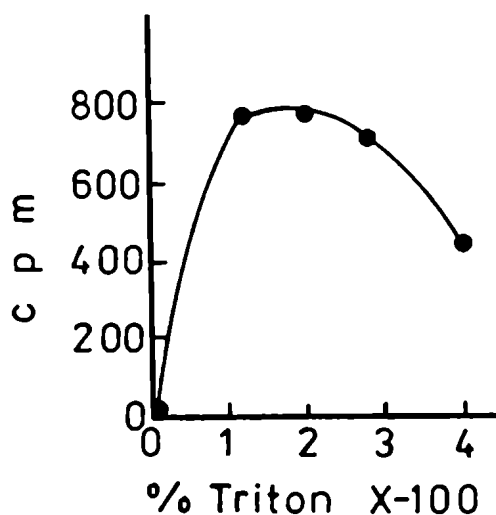


Fig. 54: Transferencia del oligosac-(^{14}C)Glc de Dol-PP-oligosac(^{14}C)Glc a proteína en función de la concentración de Tritón X-100.

Se usó la mezcla B de incubación descrita en la sección 3.3.1. La concentración de Tritón X-100 varió como se indica en el gráfico. Se usaron 1.800 cpm de Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc por tubo. Se incubaron 5 min a 30°C. Se procesaron según el método C₁ descrito en 3.3.1.3.

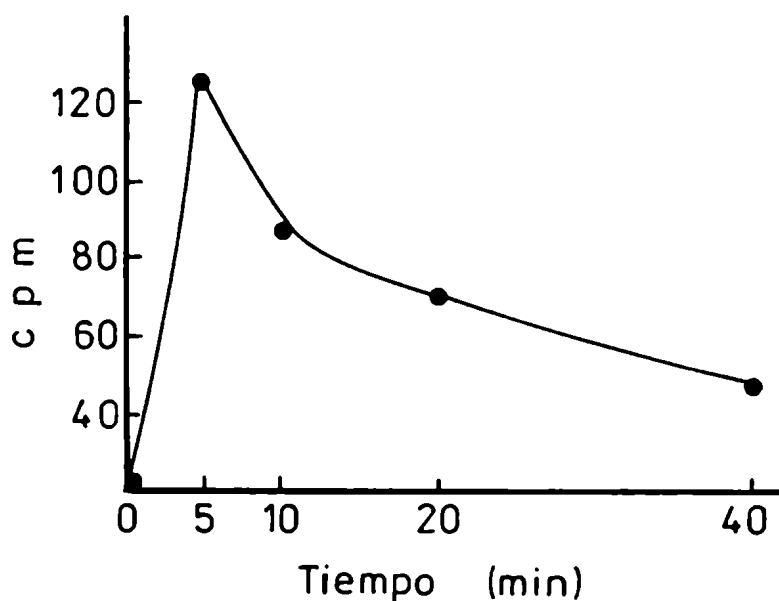


Fig. 55: Transferencia del oligosac-(¹⁴C)Glc de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc a proteína en función del tiempo.

Se usó la mezcla de incubación B (sección 3.3.1.). La concentración de Tritón X-100 fue de 1,8%. Para cada tiempo de incubación se usaron 2.000 cpm de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Glc. Los incubados se procesaron según el método C₁ (sección 3.3.1.3.).

4.10.2. Transferencia a proteína de oligosac-(¹⁴C)Gal a partir de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal.

Como ya se mencionó en las secciones 4.8. y 4.10., quedaba por probar que el Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal transfiere el oligosac-(¹⁴C)Gal a proteína. Con esta finalidad, se preparó Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal en gran escala, y se purificó por una columna de Sephadex LH (fig. 53).

4.10.2.1. Purificación de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal y transferencia de la marca a proteína.

Se preparó Dol-PP-oligosac(¹⁴C)Gal en gran escala. Se obtuvo un rendimiento de un 30% respecto del Dol-P-(¹⁴C)Gal usado (400.000 cpm).

El Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal se purificó por cromatografía en una columna de Sephadex LH 20 (fig. 53). El compuesto dio un único pico de radioactividad y se separó de un material amarillo de naturaleza no conocida que se incluyó más en la columna. Las fracciones radioactivas combinadas se concentraron bajo N₂, y la recuperación fue de un 85% respecto de la radioactividad introducida en la columna.

Con este Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal purificado se investigó si podía transferir su porción oligosacáridica a proteína. Como se muestra en la tabla 13, se obtuvo una transferencia que, si bien fue baja (3,4%), indicó que efectivamente la radioactividad presente en el Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal era transferida a proteína.

Se estudió entonces como afectaban distintas variables a esta transferencia.

4.10.2.2. Efecto del tiempo de incubación.

La primera variable estudiada fue el tiempo de incubación. Se midió la radioactividad incorporada a proteína en función de distintos tiempos de incubación (fig. 56). A diferencia de lo observado con el derivado glucosilado, la incorporación de oligosac-(^{14}C)Gal fue aumentando progresivamente con el tiempo de incubación hasta llegar a una meseta a los 30 min con una eficiencia de transferencia de 3,4%. Con tiempos de incubación mayores no se observó un decaimiento en la radioactividad incorporada, como en el caso de la transferencia del oligosac-(^{14}C)Glc a partir del Dol-PP-oligosac(^{14}C)Glc (fig. 55). Además de ser la forma de las curvas muy diferentes (comparar fig. 55 y 56), las eficiencias de transferencias máximas observadas también son muy distintas (más de 50% para el oligosac-(^{14}C)Glc respecto de 3,4% hasta 6% en algunos casos para el oligosac(^{14}C)Gal).

4.10.2.3. Efecto de la concentración de Tritón X-100.

Se estudió también como variaba la incorporación de oligosac-(^{14}C)Gal a proteína en función de la concentración de Tritón X-100 (fig. 57). Se observó que el rango de concentración de Tritón X-100 para obtener una máxima incorporación a proteína variaba de 0,6% a 1,2%. Hay que aclarar que, si bien siempre se obtenían curvas con la forma mostrada en la fig. 57, la concentración óptima de detergente puede variar con la preparación enzimática llegando a ser en algunos casos de 2% en Tritón X-100, como se obtuvo en el caso de transferir oligosac-(^{14}C)Glc (fig. 54).

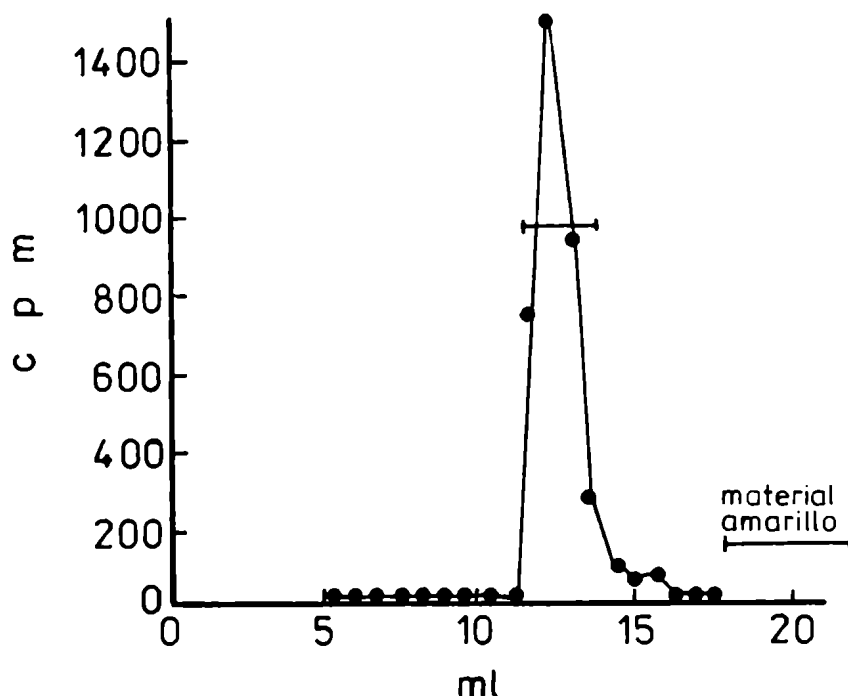


Fig. 53: Purificación del Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal por columna de Sephadex LH 20.

Se preparó Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal en gran cantidad. Se incubaron dos partidas de 6 tubos cada una en las cuales se quintuplicó la escala de la mezcla de incubación A (sección 3.3.1.). Se obtuvieron 400.000 cpm de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal a partir de 1.200.000 cpm de Dol-P-(¹⁴C)Gal. Este material se sembró en una columna de Sephadex LH 20 de 0,7 x 86 cm, equilibrada con cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3). La columna se desarrolló según la técnica descrita en la sección 3.7.2. Se midió la radioactividad en alícuotas de 5 ul de cada una de las fracciones. Se graficó la radioactividad encontrada en cada alícuota. Se combinaron las fracciones que contenían radioactividad.

Tabla 13: Transferencia a proteína de radioactividad a partir de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal.

Substrato	cpm	(¹⁴ C)galactosa en material insoluble en TCA caliente (cpm)	% transferencia
Dol-PP-oligosac (¹⁴ C)Gal	6.500	220	3,4

Usando la mezcla B se incubó Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal con microsomas de hígado (2 mg de proteína), durante 30 min (sección 3.3.1.). Se inactivó agregando TCA 5%, y se procesó por el método C₁ (sección 3.3.1.3.).

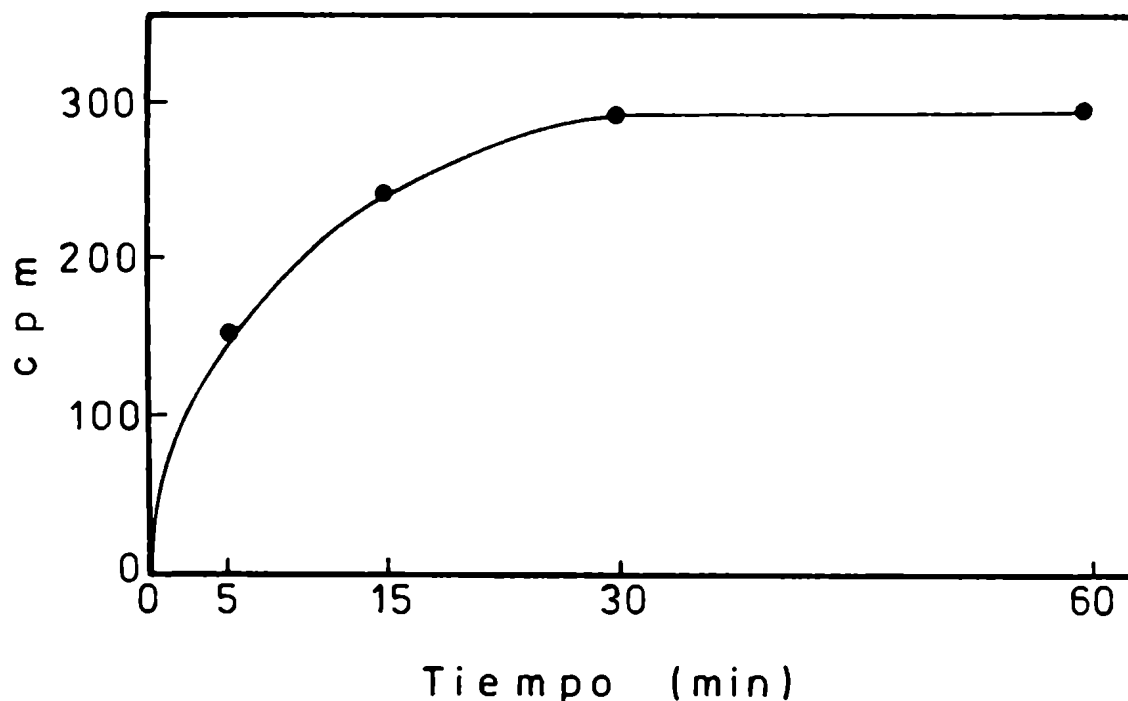


Fig. 56: Incorporación de oligosac-(^{14}C)Gal de Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal a proteína en función del tiempo.

Se empleó la mezcla de incubación B (sección 3.3.1.). La concentración de Tritón X-100 fue de 1,5% para cada tiempo de incubación. Se usaron 6.500 cpm de Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal purificado (sección 3.7.2.). Los incubados se procesaron según el método C_1 descrito en la sección 3.3.1.3.

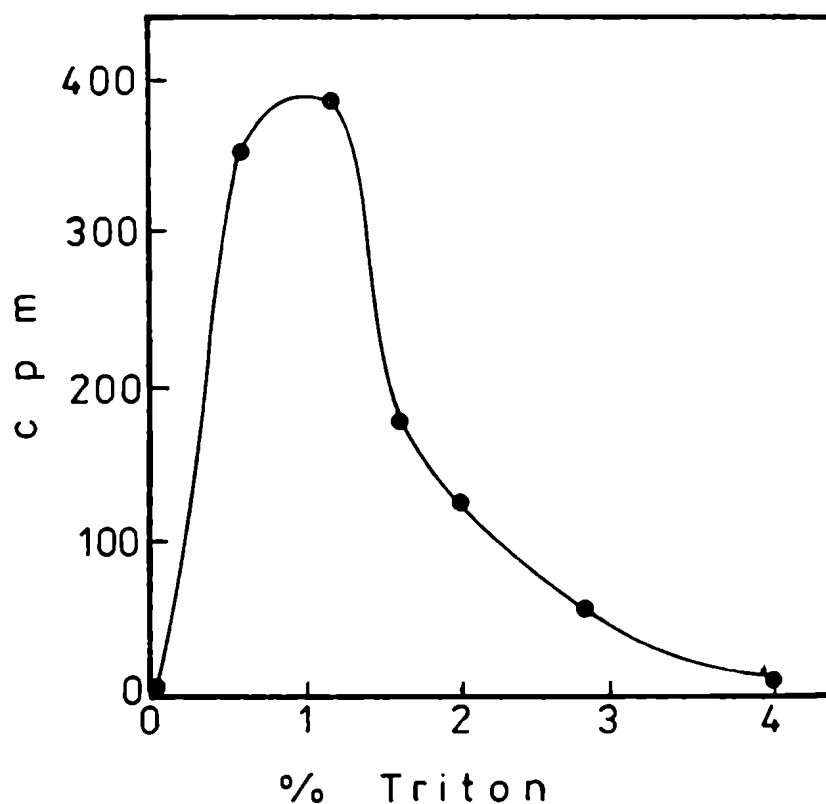


Fig. 57: Transferencia de oligosac-(¹⁴C)Gal de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal a proteína en función de la concentración de Tritón X-100.

Se usó la mezcla de incubación B (sección 3.3.1.), a la que se le añadieron 11.400 cpm de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal (AE = 268 uCi/umol). Las concentraciones de Tritón X-100 son las indicadas en cada caso. Se incubó 30 min a 30°C. Los incubados fueron procesados según el método C₁ (sección 3.3.1.3.)

4.10.2.4. Preparación en gran escala de proteína marcada con (¹⁴C)galactosa a partir de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal.

Una vez optimizadas las condiciones para la transferencia de oligosac-(¹⁴C)Gal de Dol-PP-oligosac(¹⁴C)Gal a proteína (secciones 4.10.2.1. y 4.10.2.2.), se hizo una incubación en gran escala con el objeto de acumular el producto de la incubación para caracterizarlo; para ello se siguió la técnica descrita en la sección 3.3.2. Se obtuvieron 16.000 cpm de proteína marcada con (¹⁴C)galactosa, a partir de 250.000 cpm de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal. Esto indicó que la eficiencia de transferencia respecto del Dol-PP-oligosac(¹⁴C)Gal usado fue del 6,4%. El precipitado lavado con metanol se llevó a seco en desecador para quitarle el exceso de metanol y caracterizarlo posteriormente.

4.11. Verificación de que el oligosac-(¹⁴C)Gal es transferido a una proteína.

Con el objeto de confirmar que el producto insoluble en TCA caliente obtenido por incubaciones de Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal con microsomas de hígado de rata era una glicoproteína, se trató a este material (preparado según se detalla en la sección 4.10.2.3.) con proteasa tipo VI de *Streptomyces grieseus* (sección 3.5.5.). Se observó que el material se solubilizó por la acción de la enzima proteolítica y que ya no era precipitable por TCA 5%. Este material solubilizado se cromatografió en una columna de Bio Gel P 6 (fig. 58). Se obtuvo un único pico de radioactividad con un máximo en la fracción N° 30 que permitió calcular un

$K_{AV} = 0,35$ (Nota), correspondiente por tablas a un peso molecular de 3.300. Ugalde (135) sometiendo proteína (^{14}C)glicosilada a análogo procedimiento, obtuvo glicopéptidos glucosilados que se eluyeron de una columna de Bio Gel P 6 con un $K_{AV} = 0,315$. Estos resultados concuerdan muy bien con el valor de $K_{AV} = 0,368$ obtenido para el oligosac-Glc₃ libre, preparado por hidrólisis ácida suave del difosfato derivado (135), e indican que las fracciones polipeptídicas asociadas a ambos oligosacáridos eran pequeñas después del tratamiento con proteasa.

Nota: K_{AV} se calculó aplicando la fórmula $K_{AV} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$

Donde K_{AV} es el coeficiente de partición entre la fase líquida y la fase gel; V_e es el volúmen de elución de la muestra; V_t es el volumen total, y V_o es el volumen muerto de la columna.

$V_e = 33$ ml (volumen en que eluyó el pico de radioactividad).

$V_t = 54$ ml (volumen en que eluyó el Cl_2CO).

$V_o = 20$ ml (volumen en que eluyó el dextrano azul).

Luego: $K_{AV} = \frac{30 - 20}{54 - 20} = 0,35$.

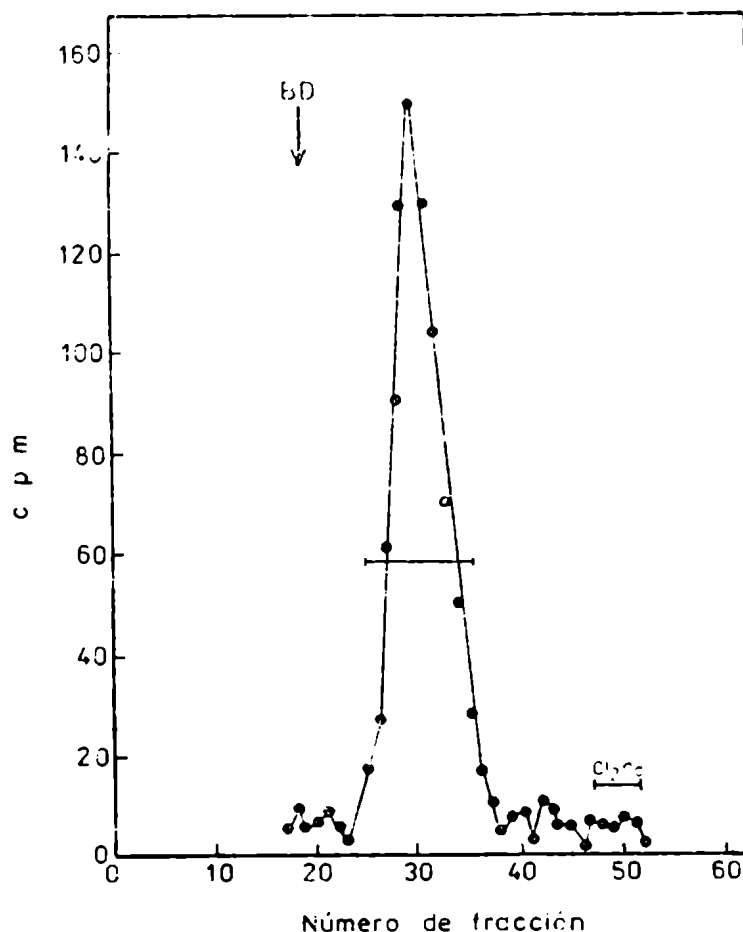


Fig. 58: Cromatografía en columna de Bio Gel P 6 del "digerido de proteasa" marcado con (¹⁴C)galactosa. 9.000 cpm del producto insoluble en TCA caliente marcado con (¹⁴C)galactosa obtenido como se detalla en la sección 4.10.2.3., se digirieron con proteasa tipo VI de *Streptomyces grieseus*. Este tratamiento se llevó a cabo durante 2 semanas con agregados sucesivos de enzima fresca cada 2 días, incubando a 37°C y bajo atmósfera de tolueno como se describió en la sección 3.5.5. El producto de la degradación se centrifugó en centrífuga clínica durante 5 min y el sobrenadante (8.500 cpm, aproximadamente) se cromatografió en una columna de Bio Gel P 6 siguiendo la técnica detallada en la sección 3.7.4. Se recogieron fracciones de 1,1 ml. El BD eluyó a los 20 ml; el Cl₂Co eluyó entre los 53 y 55 ml.

4.11.1. Verificación que el "digerido de proteasa" marcado con (¹⁴C)galactosa contiene glicopéptidos.

Una de las características de los glicopéptidos es su capacidad de poder comportarse como anfólitos. Basados en esta propiedad, quisimos estudiar si el "digerido de proteasa" marcado con (¹⁴C)galactosa contenía glicopéptidos. Para ello, el producto de la degradación proteolítica se sometió a electroforesis en un buffer ácido y en un buffer básico.

I) Electroforesis en buffer ácido fórmico 5%.

El "digerido de proteasa" marcado con (¹⁴C)galactosa obtenido como se señaló en la sección 4.11. fue electroforetizado en un buffer de pH ácido como lo es el ácido fórmico 5% (fig. 59). Se observaron dos picos; ambos se desplazaron hacia el polo negativo. El pico más rápido se llamó A y el más lento B.

Por experiencias realizadas con glicopeptidos marcados con (¹⁴C)glucosa obtenidos de la misma forma, se observó un perfil similar al mostrado en la fig. 59. Se vio también que si los glicopéptidos no eran degradados en forma exhaustiva con proteasa, sus movilidades eran pequeñas o nulas. Por esta razón el pico B se eluyó y se volvió a tratar con proteasa tipo VI (sección 3.5.5.). El digerido se filtró por una columna de Bio Gel P 6 obteniéndose nuevamente un único pico de radioactividad. Las fracciones correspondientes al pico se combinaron, se concentraron y se volvieron a electroforetizar en buffer ácido fórmico 5% en las mismas condiciones que se usaron anteriormente (fig. 60). Se observó un único pico que se llamó B' que como era de esperar se desplazó hacia el polo negativo con una movilidad

mayor que la observada en el piso

II) Electroforesis en buffer carbonato-bicarbonato de sodio.

El pico A (fig. 59) y el pico B' (fig. 60) fueron eluidos y vueltos a electroforetizar, pero esta vez en un buffer alcalino como lo es el buffer $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$ 0,25 M pH = 9,8 (fig. 61 A y 61 B). En ambos casos se observó un único pico que se desplazó hacia el polo positivo.

Estos resultados nos permitieron concluir que el "digerido de proteasa" marcado con (^{14}C)galactosa contenía glicopéptidos. A estos glicopéptidos los llamamos glicopéptido A (pico A, fig. 61 A) y glicopéptido B' (pico B', fig. 61 B).

Con esto quedaba confirmado que el Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal transfería la galactosa a proteína.

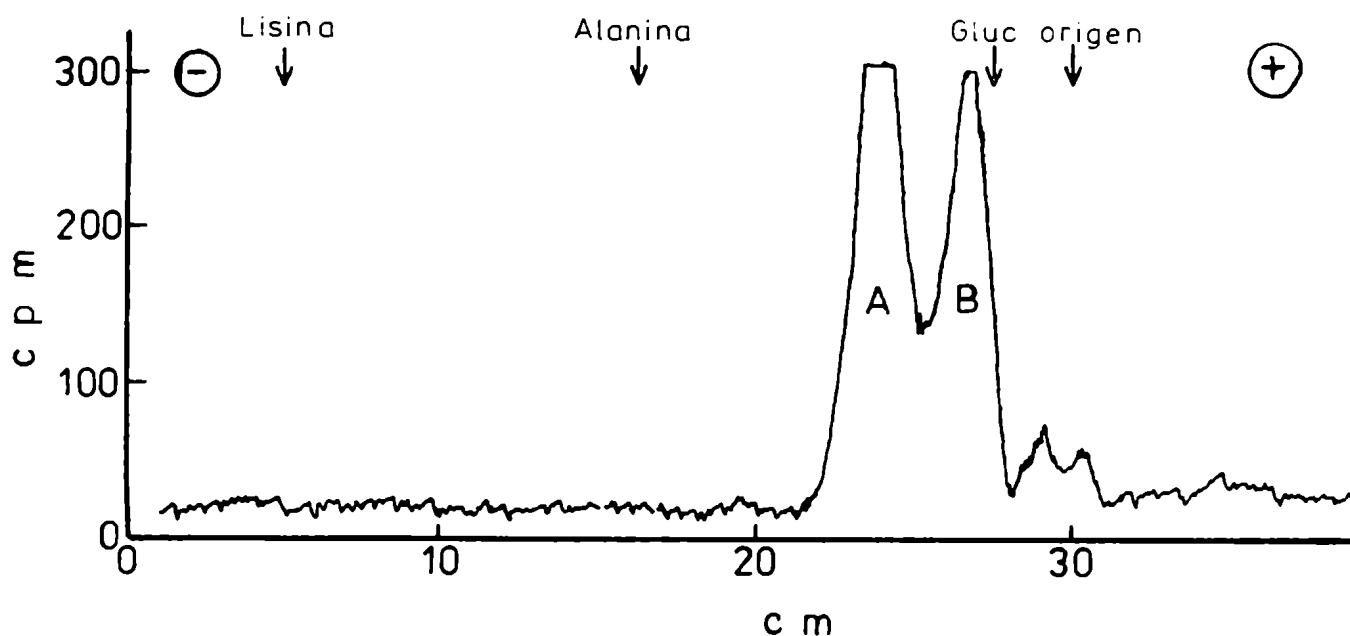


Fig. 59: Electroforesis en ácido fórmico 5% del "digerido de proteasa" marcado con (^{14}C)galactosa.

El material marcado con (^{14}C)galactosa obtenido según se detalla en la leyenda de la fig. 58 y eluído por la columna de Biogel P 6 (tubos 25 al 35, fig. 58), se electroforesizó en buffer ácido fórmico 5% durante 6 hs a 1.000 voltios. Las flechas indican la posición en que corren los estándares externos de lisina, alanina y glucosa. El pico A migró 3,8 cm del estándar de glucosa. El pico B migró 0,7 cm del estándar de glucosa.

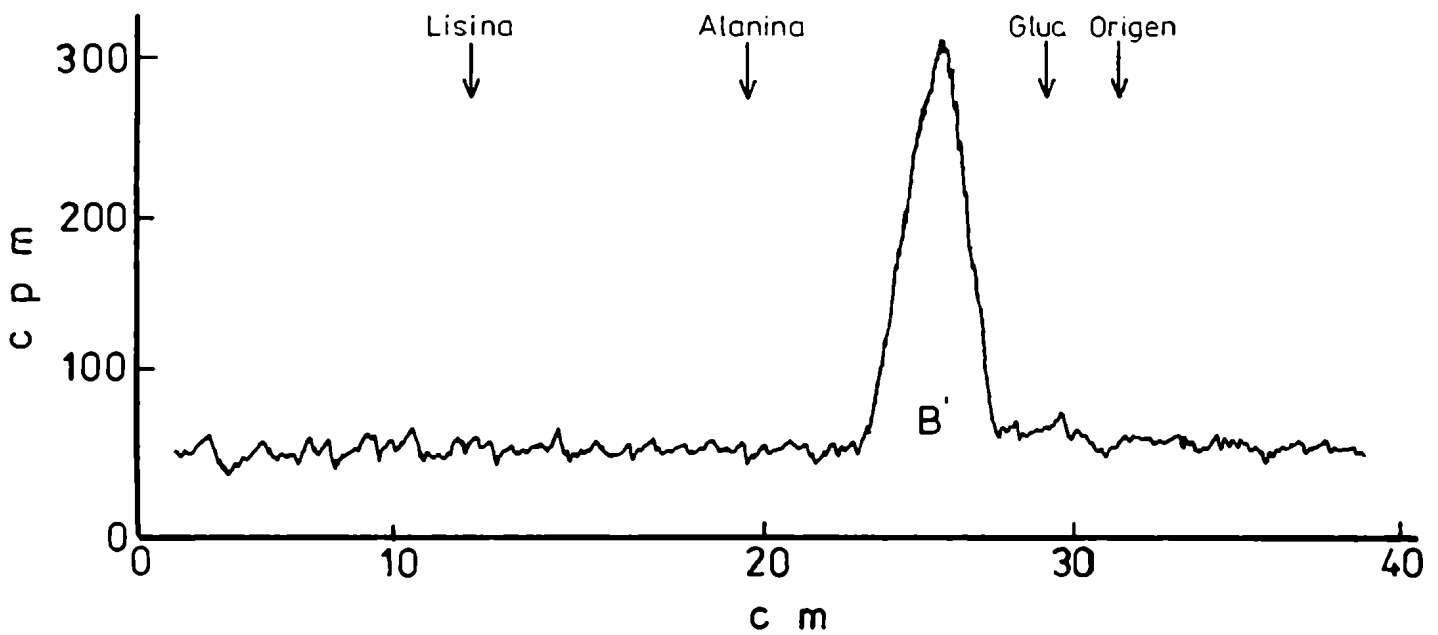


Fig. 60: Electroforesis en ácido fórmico 5% del material proveniente del tratamiento exhaustivo del pico B (fig. 59) con proteasa.

El pico B fue eluído de la electroforesis en ácido fórmico 5% (fig. 59) y tratado con proteasa como se describió en la sección 3.5.5. El producto de la degradación se electroforetizó en el buffer ácido fórmico 5% durante 6 hs a 1.000 voltios. Las flechas indican la posición en que corren los estándares externos de lisina, alanina y glucosa. El pico B' migró 2,7 cm del estándar de glucosa.

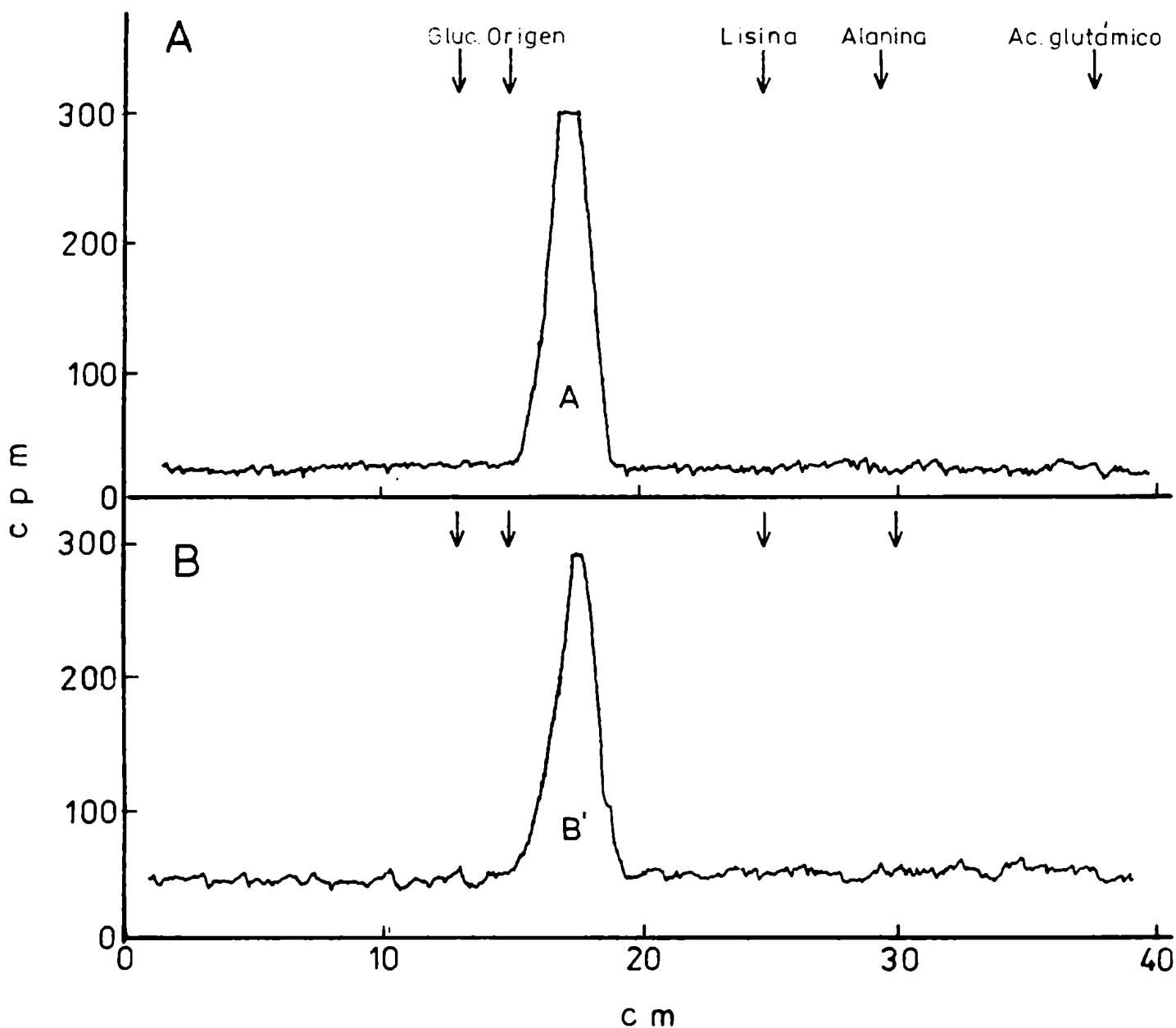


Fig. 61: Electroforesis en buffer $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$ de sodio del "digerido de proteasa" marcado con (^{14}C) galactosa.

El pico A y el pico B' de las electroforesis en ácido fórmico 5% mostradas en las figs. 59 y 60, respectivamente, fueron eluidos y vueltos a electroforetizar en buffer $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$ de $\text{Na} + 0,25 \text{ M}$, $\text{pH} = 9,8$ durante 4 horas a 600 voltios.

Cuadro A: pico A.

Cuadro B: pico B'.

4.11.2. Caracterización parcial del oligosacárido marcado con (¹⁴C)galactosa transferido a proteína.

Quedaban por aclarar dos puntos: 1°) si la galactosa era transferida sola o junto con el oligosacárido, 2°) en caso de suceder esto último, si el oligosacárido galactosilado transferido a la proteína no había sido modificado.

Para estudiar el 1° punto, se aprovechó la especificidad de la endo-N-acetilglucosaminidasa H que es capaz de hidrolizar la unión N, N'diacetilquitobiosa (sección 1.4.7.2.) presente en las glicoproteínas del tipo asparagina liberando los oligosacáridos.

Los glicopéptidos A y B' fueron eluidos de los electroforogramas en buffer $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$ de sodio (fig. 61) y filtrados por columnas de Bio Gel P 6 (sección 3.7.4.), para eliminarles las sales. Ambos glicopéptidos fueron tratados con endo-N-acetilglucosaminidasa H (sección 3.5.4.), y los productos se volvieron a someter a electroforesis en ácido fórmico 5% (fig. 62).

En los dos casos se obtuvo un único pico de radioactividad en la zona neutra (picos I y II, respectivamente, fig. 62), con la misma movilidad de un estándar de (¹⁴C)Glc₃-Man₉-GlcNAc (pico III, fig 62). Estos resultados indicaron que la endo-N-acetilglucosaminidasa H hidrolizó en forma completa a los glicopéptidos A y B', liberando sus respectivos oligosacáridos (picos I y II, fig. 62). Además la susceptibilidad a la endo-N-acetilglucosaminidasa H aseguró que los dos glicopéptidos tenían los dos residuos NAcGlc característicos de las

glicoproteínas tipo asparagina (sección 1.3.). Este comportamiento en un todo similar al del oligosac-(¹⁴C)Glc permitió concluir que se trataba de compuestos análogos. Para confirmar la presencia de un solo grupo hexosamina, ambos oligosacáridos galactosilados (picos I y II, fig. 62) y el estándar glucosilado (pico III, fig. 62) se sometieron al tratamiento alcalino reductor (sección 3.6.3.), ya aplicado a los oligosacáridos glucosilados y galactosilados obtenidos por hidrólisis ácida suave de sus respectivos extractos 1103 (sección 4.6.4.2.). Como ya se señaló por tratamiento alcalino reductor con borohidruro de sodio e hidróxido de sodio, el grupo hemiacetal de los oligosacáridos se reduce y los grupos acetilos unidos a sus residuos hexosamina se liberan, trayendo aparejado la aparición de compuestos cargados positivamente al someterlos a electroforesis en buffer J. La movilidad de estos compuestos depende del número de cargas adquiridas como consecuencia del número de residuos acetilo perdidos (sección 4.6.4.2.).

Cuando se sometieron a este tratamiento los oligosacáridos (picos I, II y III, fig. 62), en los tres casos se observaron dos picos: uno neutro y otro lento (los resultados no se muestran, pero fueron análogos a los de la figura 32 D), que correspondieron al compuesto no degradado y al que había perdido un solo grupo acetilo respectivamente. No se observó compuesto doblemente desacetilado. Esto confirmó la presencia de un solo grupo hexosamina en los oligosacáridos galactosilados y glucosilados. Estos resultados nos permitieron concluir que el Dol-PP-oligosac(¹⁴C)Gal transfirió no solo la (¹⁴C)galactosa sino todo el oligosacárido a

proteína y que este oligosacárido poseía dos residuos NAcGlc, además de la (^{14}C)galactosa. Nos quedaba por aclarar el 2° punto, es decir, si al igual que los oligosacáridos glucosilados, los oligosacáridos galactosilados sufrían modificaciones una vez transferidos a proteína (sección 1.4.7.). Una forma de verificar esto era estudiar el tamaño de los mismos. Para ello, el "digerido de proteasa" marcado con (^{14}C)galactosa (sección 4.11.) se trató con endo-N-acetilglucosaminidasa H para liberar los oligosacáridos galactosilados; una mezcla de oligosac-(^3H)Glc₁, oligosac-(^3H)Glc₂ y oligosac-(^3H)Glc₃ se trató en forma similar. Ambos productos de degradación se combinaron y se cromatografiaron en el solvente E (fig. 63). Al igual que en el caso de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida suave del Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal (fig. 33 A), se observó la presencia de dos picos con marca en (^{14}C)galactosa. Las movibilidades de estos dos picos respecto al estándar interno de oligosacáridos glucosilados marcados con (^3H) y degradados con endo-N-acetilglucosaminidasa H, indicó que se trataba de los oligosac-(^{14}C)Gal₁ y oligosac-(^{14}C)Gal₂ (fig. 33, A y B), en los cuales los grupos NAcGlc del extremo reductor se eliminaron al liberarlos de los glicopéptidos por degradación con la misma enzima. Se pudo concluir que en las condiciones de transferencia usadas, los oligosacáridos galactosilados se transfieren íntegramente y no son posteriormente modificados. Esto coincidió con lo ya observado en la sección 4.9., donde se estudió la transferencia de (^{14}C)galactosa de Dol-P-(^{14}C)Gal a distintas fracciones en función del tiempo y en ningún caso se obtuvo (^{14}C)galactosa

Libre en face dessus.

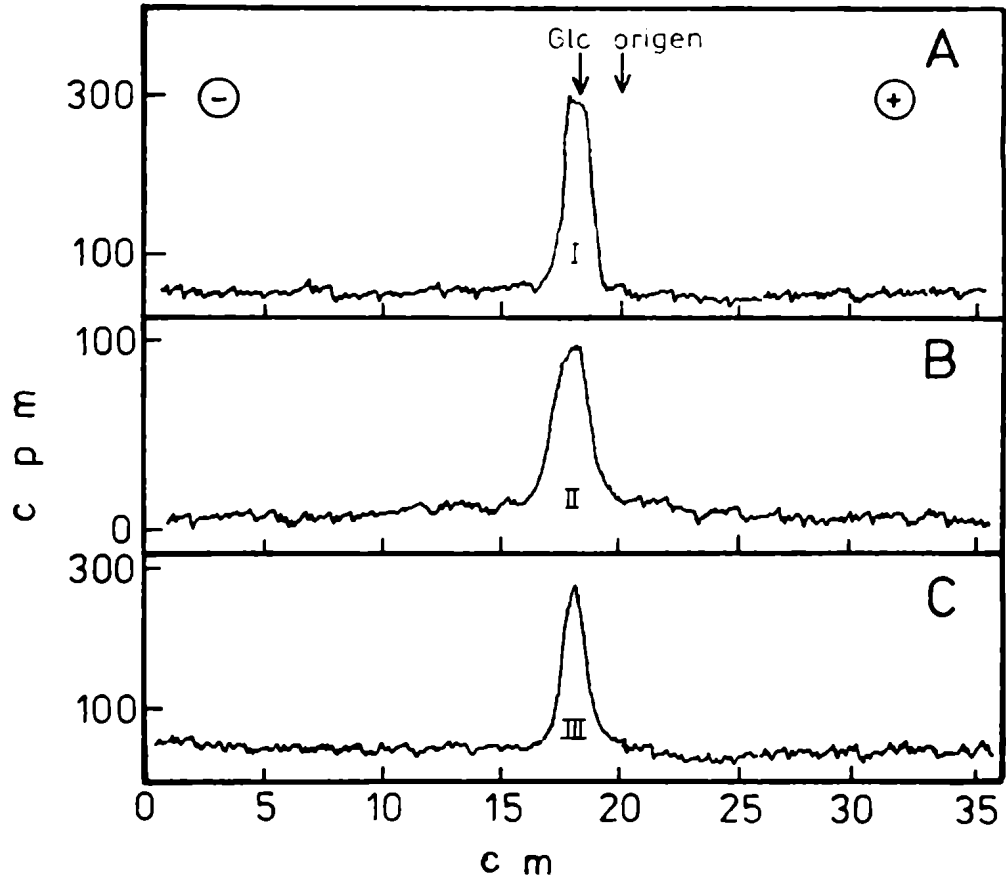


Fig. 62: Electroforesis en ácido fórmico 5% de los glicopéptidos A y B' tratados con endo-N-acetilglucosaminidasa H.

Los glicopéptidos A y B' eluidos de las electroforesis en buffer $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$ (fig. 61) se desalaron filtrándolos por columna de Bio Gel P 6 como se detalló en la sección 3.7.4. Ambos glicopéptidos fueron tratados con endo-N-acetilglucosaminidasa H según la técnica descrita en la sección 3.5.4. Los productos se electroforetizaron en buffer ácido fórmico 5% durante 6 hs a 1.000 voltios. Cuadro A: glicopeptido A tratado con endo-N-acetilglucosaminidasa H.

Cuadro B: glicopéptido B' tratado con endo-N-acetilglucosaminidasa H.

Cuadro C: estándar de $(^{14}\text{C})\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}$; se preparó por tratamiento del oligosac- $(^{14}\text{C})\text{Glc}_3$ con endo-N-acetilglucosaminidasa H.

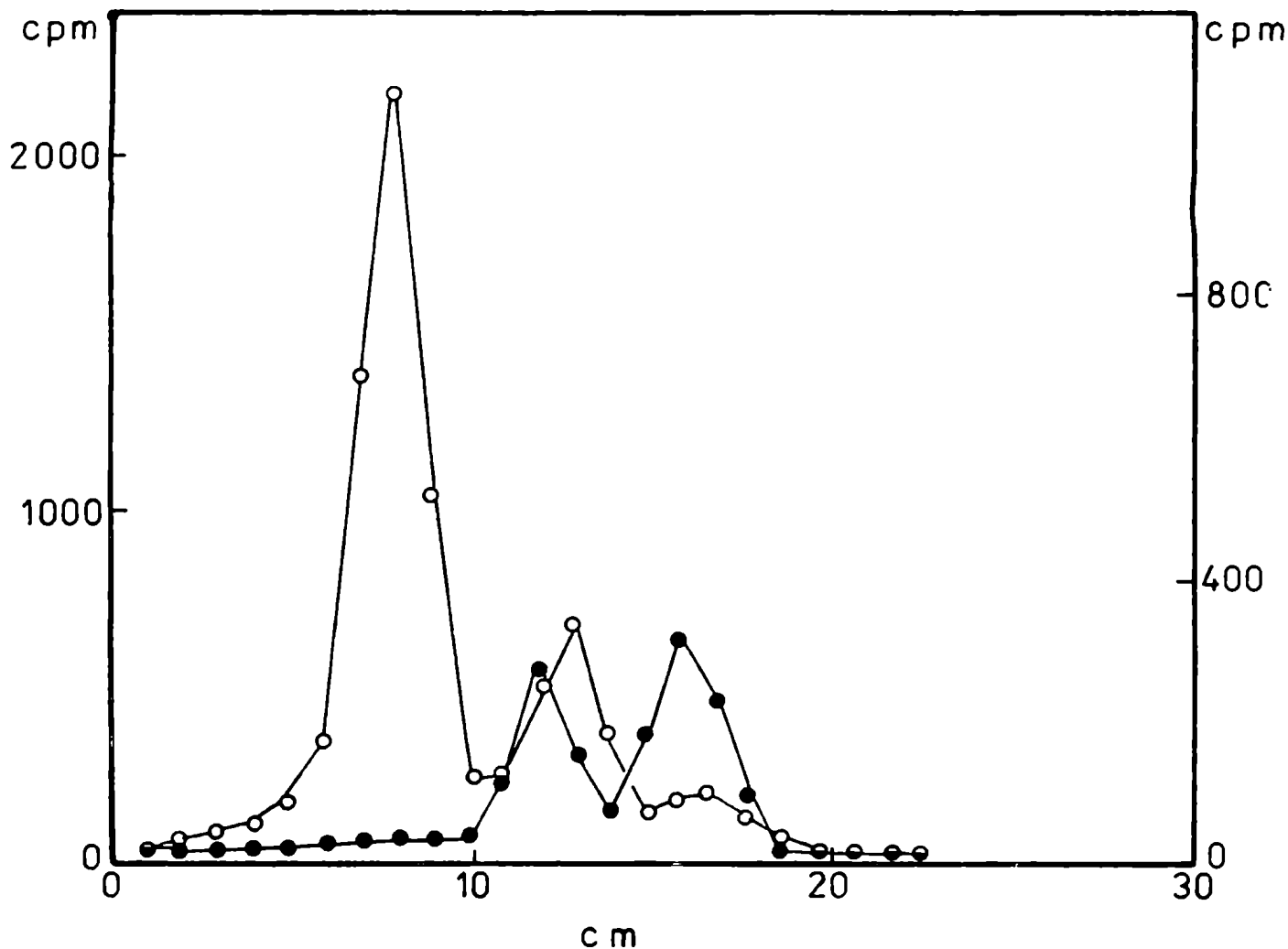


Fig. 63: Tamaño del oligosacárido galactosilados transferido a proteína.

El material "digerido de proteasa" marcado con (^{14}C)galactosa, obtenido como se describió en la sección 4.11. se trató con endo-N-acetilglucosaminidasa H siguiendo la técnica descrita en la sección 3.5.4. Una mezcla de oligosac-(^3H)Glc₁, oligosac-(^3H)Glc₂ y oligosac-(^3H)Glc₃ (sección 3.4.1.) se trató en forma similar. Ambos productos de degradación se combinaron y se cromatografiaron con el solvente E durante 6 días.

○—○ ^3H
●—● ^{14}C

4.12. Procesamiento de glucosil y galactosil oligosacáridos.

Como ya se señaló en la sección 1.4.7., el oligosac-Glc₃ una vez transferido a proteína sufre una serie de modificaciones que se conocen con el nombre de "procesamiento". Las mismas consisten en la remoción secuencial por parte de glicosidasas específicas de todos los residuos glucosa y de algunos residuos manosa. Los resultados mostrados en la sección 4.11.2. nos indicaron que en las condiciones "in vitro" usadas para transferir los oligosacáridos galactosilados, éstos no eran procesados. Nos pareció interesante estudiar un poco más en detalle esta diferencia de comportamiento entre los oligosacáridos glucosilados y los galactosilados. En primer término se trató de verificar si el oligosacárido glucosilado era procesado en las condiciones de transferencia usadas para transferir los oligosacáridos galactosilados. Para ello se preparó Dol-PP-oligosac-Glc marcado en las glucosas y en las manosas por síntesis "in vivo", incubando cortes de oviducto de gallina con (¹⁴C)glucosa (sección 3.2.8.), y se transfirió el oligosacárido a proteína en iguales condiciones que las usadas para transferir los oligosacáridos galactosilados. Los resultados, que no se muestran, indicaron que las glucosas eran procesadas, pero no las manosas, ya que en la fase superior acuosa del Folch (sección 3.3.1.2.) se verificó la presencia de (¹⁴C)glucosa, pero no de (¹⁴C)manosa (138); asimismo un análisis del tamaño del oligosacárido unido a proteína efectuada en forma similar a la empleada para estudiar el tamaño de los oligosacáridos galactosilados unidos a proteína (sección 4.11.2.), confirmó esta interpretación (no mostrado).

Estos resultados podían explicarse de dos maneras: o bien el preparado enzimático carecía de manosidasas, o las manosidasas se encontraban inhibidas en las condiciones de transferencia usadas. La primera suposición era poco probable, ya que el preparado enzimático usado para transferir el oligosacárido glucosilado a proteína (microsomas de hígado) es rico en la fracción de Golgi, que es donde se encuentran las manosidasas del procesamiento (sección 1.4.7.3.). Por este motivo, se optó por buscar en la bibliografía condiciones en las cuales las manosidasas de Golgi fueran activas y probar si los microsomas de hígado poseían dichas manosidasas.

Se encontró que el preparado microsomal tenía actividad de manosidasas; medida a pH = 6,5 utilizando p-nitro α -D-metilmanósido (buffer A, sección 3.5.6.), la actividad sobre el mismo sustrato medida a pH = 4,5 fue despreciable (buffer B, sección 3.5.6.). Esto descartó la presencia de manosidasas lisosomales, las cuales son activas a pH ácido (269), y confirmó la presencia de manosidasas de Golgi endógenas en el preparado microsomal utilizado a lo largo de todo este trabajo (138).

Una vez aclarado este punto, y teniendo en cuenta que todos los estudios de transferencia de azúcares se habían realizado a pH = 7,8, pareció interesante investigar el efecto que, a pH = 6,5, las glicosidasas presentes en este preparado microsomal (sección 3.1.2.) tenían sobre los oligosacáridos galactosilados y glucosilados en estudio (sección 3.5.6.). Los productos obtenidos se analizaron por cromatografía utilizando dos solventes: en primer lugar se usó el solvente C, que permite identificar los

monosacáridos, pero en el que los oligosacáridos prácticamente no migran; el solvente E permite resolver oligosacáridos del tamaño esperado.

Se comprobó que a pH = 6,5, las glicosidasas de Golgi no liberaban (^{14}C)galactosa de oligosac-(^{14}C)Gal₁ ni de oligosac-(^{14}C)Gal₂ (fig. 64, cuadros A y B); en ambos casos se obtuvo un único pico al cromatografiarlos en el solvente C, (picos I y II, respectivamente) que prácticamente no se movió del origen. Para estudiar la liberación de glucosa y de manosa se usaron como sustratos los oligosacáridos glucosilados totalmente marcados preparados "in vivo" a partir de (^{14}C)glucosa (sección 3.2.8.).

El oligosac-Glc₁ y el oligosac-Glc₂, totalmente marcados, se incubaron a pH = 6,5 con el preparado microsomal, y los productos se cromatografiaron en el solvente C (fig. 65); se observaron en el primer caso cuatro picos, dos que migraron cerca del origen, llamados picos III_a y III_b, y otros dos que migraron como los estándares de manosa y glucosa (fig. 65 A); en el segundo caso se observaron tres picos, uno que migró cerca del origen, llamado pico IV, y otros dos que migraron como los estándares de manosa y glucosa (fig. 65 B).

Estos resultados mostraron que en las condiciones de incubación usadas, el preparado microsomal tenía actividad de manosidasas y glicosidasas sobre el oligosac-Glc₁ y el oligosac-Glc₂. Este mismo preparado microsomal tenía actividad de galactosidasa sobre los oligosacáridos galactosilados (oligosac-(^{14}C)Gal₁ y oligosac-(^{14}C)Gal₂).

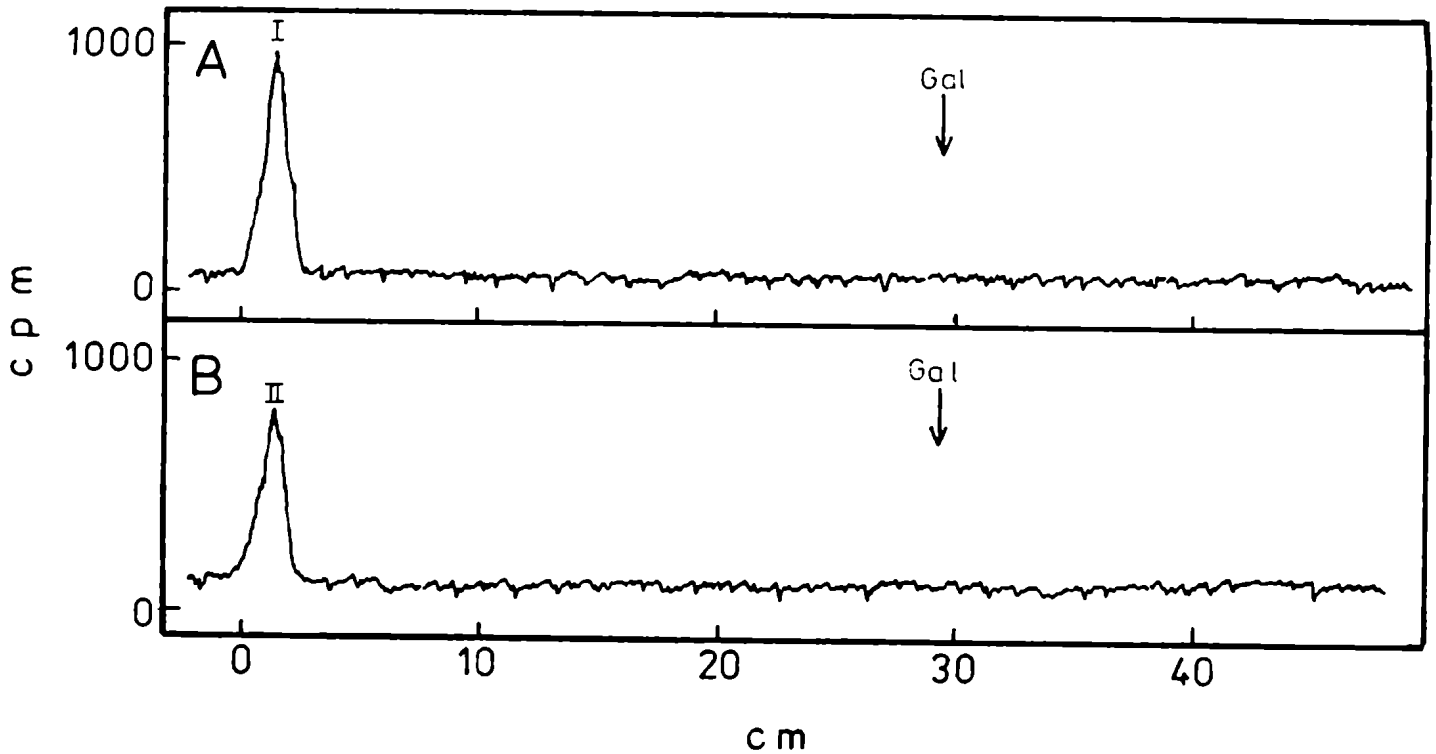


Fig. 64: Efecto de glicosidasas endógenas sobre oligosac-(¹⁴C)Gal₁ y oligosac-(¹⁴C)Gal₂.

Oligosac-(¹⁴C)Gal₁ (5.400 cpm) y oligosac-(¹⁴C)Gal₂ (5.000 cpm) se incubaron con una preparación de microsomas de hígado (4 mg de proteína), usando el buffer A descrito en la sección 3.5.6. durante 1 hora a 37°C. Se inactivó por agregado de un volumen de metanol. Se centrifugó y el sobrenadante se cromatografió con el solvente C durante 2 días.

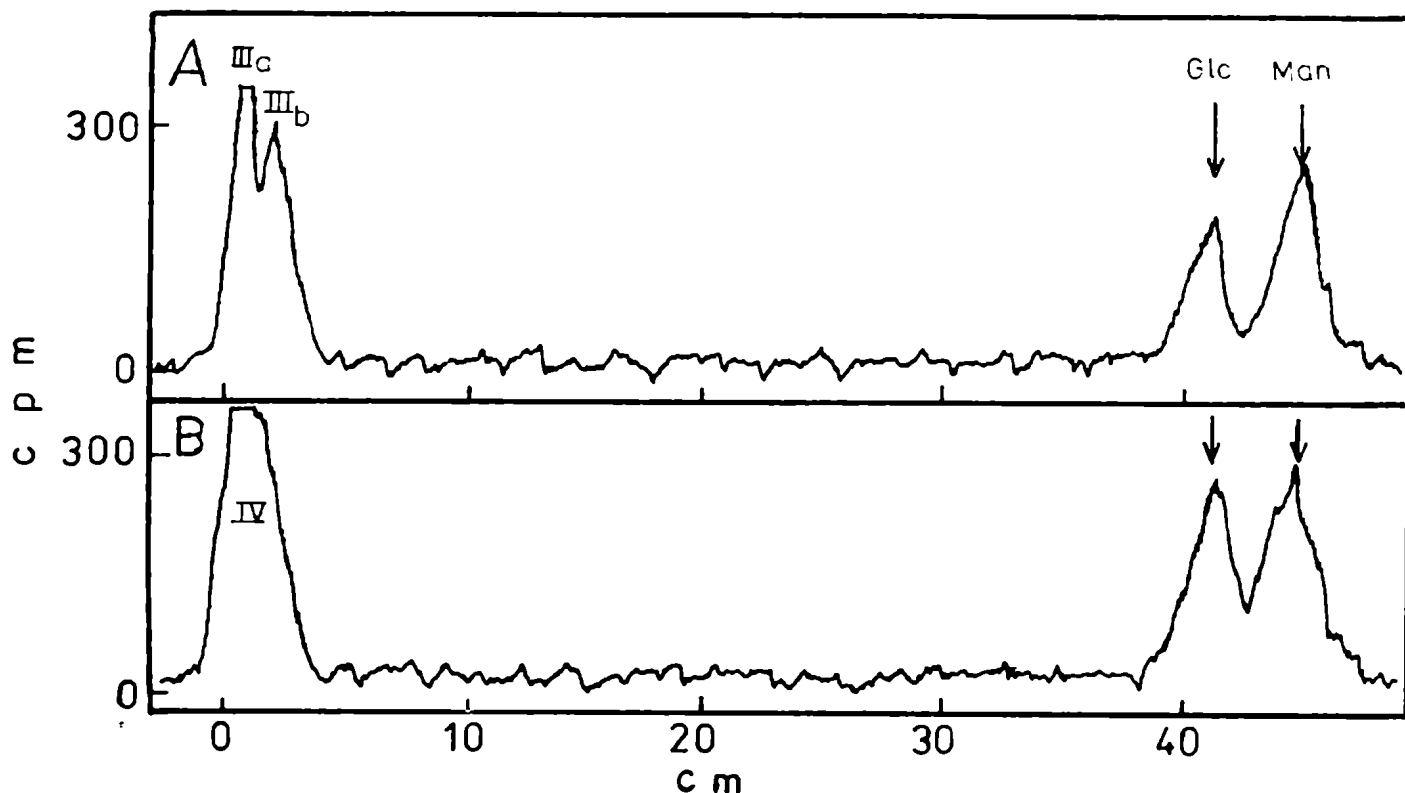


Fig. 65: Efecto de glicosidasas endógenas sobre oligosac-Glc₁ y oligosac-Glc₂ totalmente marcados con (¹⁴C).

Oligosac-Glc₁ y oligosac-Glc₂ (5.000 cpm aproximadamente de cada uno), marcados "in vivo" a partir de (¹⁴C)glucosa (sección 3.2.8.), se incubaron con 4 mg de una preparación de microsomas de hígado en buffer A (sección 3.5.6.). Se incubó durante 1 hora a 37°C. Se inactivó por agregado de un volumen de metanol y se centrifugó. El sobrenadante se cromatografió con el solvente C durante 2 días.

Para completar este estudio, quisimos averiguar si las manosidasas presentes en el preparado microsomal actuaban sobre los oligosacáridos galactosilados, ya que se sabía que en el caso de los oligosacáridos glucosilados, éstos eran procesados de un modo bastante ordenado y no perdían las manosas hasta no perder primero por lo menos dos de las tres glucosas (140 y sección 1.4.7.3.b). Para ello, los picos I y II provenientes de los oligosac-(^{14}C)Gal₁ y oligosac-(^{14}C)Gal₂ respectivamente (fig. 64), y los picos III_a y III_b correspondientes al oligosac-Glc₁ y el pico IV correspondiente al oligosac-Glc₂ (fig. 65) fueron eluidos y cromatografiados en el solvente E (fig. 66). El solvente E al ser un solvente más polar que el C, permite resolver los oligosacáridos de mayor tamaño. El pico I dio un perfil en el cual se distinguieron cinco componentes (fig. 66 I); el de menor movilidad (pico I₁) migró como un estándar de oligosac-Gal₁ sin tratar, el resto se comportó como una serie homóloga del mismo en el que cada componente posee una hexosa menos (271). Por esta razón y sabiendo que la marca está únicamente en la galactosa, a estos productos se les asignaron las siguientes composiciones: pico I₁ = oligosac-Gal₁ sin degradar, pico I₂ = Gal₁-Man₈-(GlcNAc)₂, pico I₃ = Gal₁-Man₇-(GlcNAc)₂, pico I₄ = Gal₁-Man₆-(GlcNAc)₂, y pico I₅ = Gal₁-Man₅(GlcNAc)₂. Las proporciones relativas de cada uno de ellos se dan en la tabla 14.

El pico II dio tres componentes; el de menor movilidad migró como un estándar de oligosac-Gal₂ sin degradar, y los otros dos se comportaron como miembros de una serie homóloga del mismo. Por

las mismas razones detalladas anteriormente, a estos productos se les asignaron las siguientes composiciones: pico II₁ = oligosac-Gal₂, pico II₂ = Gal-Glc-Man₈-(GlcNAc)₂, y pico II₃ = Gal-Glc-Man₇-(GlcNAc)₂.

El pico III_a, proveniente del oligosac-Glc₁ totalmente marcado en las glucosas y en las manosas, dio una serie homóloga de cuatro componentes, el de menor movilidad migró como un estándar de Man₉-(GlcNAc)₂, y a los otros tres designados M₈, M₇, y M₆ se les asignaron las siguientes composiciones: Man₈-(GlcNAc)₂, Man₇(GlcNAc)₂ y Man₆-(GlcNAc)₂. El pico III_b cromatografió como un solo compuesto con una movilidad tal, que en base a los datos obtenidos de la serie homóloga, podría corresponder al oligosacárido Man₅-(GlcNAc)₂, es decir, al producto final de la degradación (sección 1.4.7.3.b).

El pico IV proveniente del oligosac-Glc₂, totalmente marcado en las glucosas y en las manosas se resolvió en cinco componentes que también tuvieron movilidades aproximadamente correspondientes a las de una serie homóloga. El pico de menor movilidad migró como un estándar de oligosac-Glc₂ sin degradar. El siguiente pico, que no se resolvió muy bien, migró como un estándar de oligosac-Glc₁ y de Man₉-(GlcNAc)₂. Los tres picos restantes se comportaron como una serie homóloga de este último; por estas razones se designaron también M₈, M₇ y M₆, al igual que los componentes obtenidos a partir de III_a. En este caso los picos mayoritarios fueron el M₈ y M₇.

Las proporciones relativas de cada uno de los componentes mencionados en esta sección se detallan en la tabla 14.

Estos resultados nos indican que 1°) los oligosacáridos glucosilados y galactosilados se procesan en forma diferente, y 2°) si bien en ambos oligosacáridos galactosilados (oligosac-(¹⁴C)Gal₁ y oligosac-(¹⁴C)Gal₂) la galactosa no se elimina al incubarlos a pH = 6,5 con un preparado microrosmal, los dos reaccionan en forma diferente ante las manosidasas que posee dicho preparado. El oligosac-(¹⁴C)Gal₁ pudo llegar a perder hasta cuatro residuos manosa, mientras que el oligosac-(¹⁴C)Gal₂ resultó casi insensible, pudiendo perder con mucha dificultad una manosa o a lo sumo dos. Estos resultados coinciden en parte con el camino minoritario de procesamiento propuesto por Kornfeld y col. (140), estudiando "in vivo" células de hamster (CHO) transformadas por el virus de la estomatitis vesicular ya mencionado (sección 1.4.7.3.b).

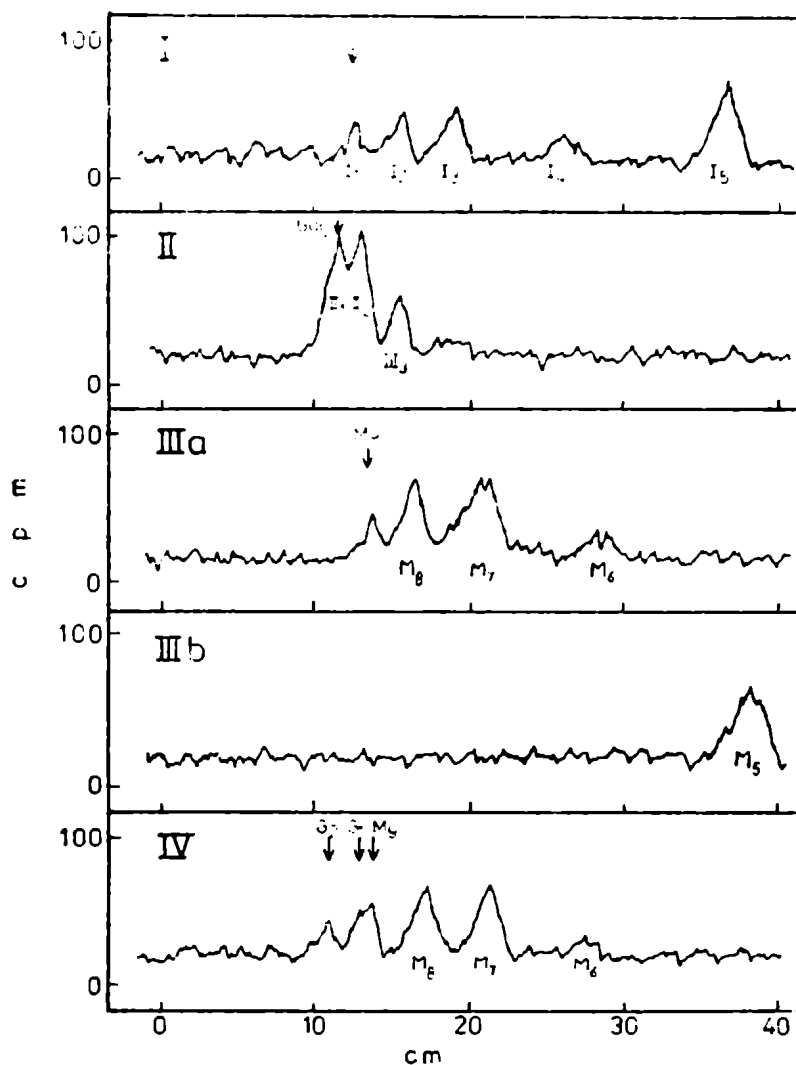


Fig. 66: Efecto de glicosidasas endógenas sobre los oligosacáridos glucosilados y galactosilados.

Los oligosacáridos correspondientes a los picos I, II, IIIa, IIIb y IV mostrados en las figuras 64 y 65 fueron eluidos y cromatografiados en el solvente E durante 4 días. Las flechas indican las posiciones en que migran los estándares de Gal₁, Gal₂, Glc₁, Glc₂ y M₉.
 G₁ = Glc₁-Man₉-(GlcNAc)₂,
 M₉ = Man₉-(GlcNAc)₂, G₂ = Glc₂-Man₉-(GlcNAc)₂.

Tabla 14: Porcentajes de los posibles oligosacáridos obtenidos por tratamiento de los oligosacáridos galactosilados y glucosilados con una preparación enzimática de microsomas de hígado.

oligosac-Gal ₁		oligosac-Gal ₂	
Gal-Man ₉ -(GlcNAc) ₂	17%	Gal-Glc-Man ₉ -(GlcNAc) ₂	41%
Gal-Man ₈ -(GlcNAc) ₂	20%	Gal-Glc-Man ₈ -(GlcNAc) ₂	38%
Gal-Man ₇ -(GlcNAc) ₂	20%	Gal-Glc-Man ₇ -(GlcNAc) ₂	20%
Gal-Man ₆ -(GlcNAc) ₂	10%	Gal-Glc-Man ₆ -(GlcNAc) ₂	1%
Gal-Man ₅ -(GlcNAc) ₂	33%		
oligosac-Glc ₂		oligosac-Glc ₁	
Glc-Glc-Man ₉ -(GlcNAc) ₂	12%	Man ₉ -(GlcNAc) ₂	10%
Glc-Man ₉ (GlcNAc) ₂	17%	Man ₈ -(GlcNAc) ₂	18%
Man ₉ -(GlcNAc) ₂		Man ₇ -(GlcNAc) ₂	18%
Man ₈ -(GlcNAc) ₂	22%	Man ₆ -(GlcNAc) ₂	6%
Man ₇ -(GlcNAc) ₂	13%	Man ₅ -(GlcNAc) ₂	20%
Man ₆ -(GlcNAc) ₂	1%	Glucosa	8%
Glucosa	17%	Manosa	20%
Manosa	18%		

Nota: Los porcentajes fueron calculados pesando las áreas de los picos mostrados en la fig. 66 corregidos por los porcentajes de glucosa y de manosa mostrados en la fig. 65.

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La biosíntesis de las glicoproteínas tipo asparagina se inicia a través del llamado ciclo del Dolicol (fig. 67). Como ya se mencionó en la sección 1.4.5., el primer paso consiste en la transferencia de N-acetilglucosamina-1-fosfato a partir de UDP-GlcNAc al dolicol monofosfato para dar Dol-PP-GlcNAc. El Dol-PP-GlcNAc es posteriormente elongado mediante la adición de otro grupo GlcNAc formándose el Dol-PP-(GlcNAc)₂; a continuación se añaden cinco residuos manosa desde el GDP-Man para dar Dol-PP-(GlcNAc)₂Man₅. Las cuatro manosas restantes se transfieren a través del Dol-P-Man, y los últimos tres residuos glucosa a partir de Dol-P-Glc (fig. 67 y sección 1.4.5.). Finalmente, el Dol-PP-(GlcNAc)₂Man₅Glc₃ transfiere en bloque el oligosacárido completo al péptido naciente para dar lugar a la formación de las glicoproteínas tipo asparagina (fig. 67).

Si bien la participación de doliquil derivados de manosa y glucosa en la síntesis de glicoproteínas en eucariotes está muy bien documentada (12), no ocurre lo mismo con el derivado de galactosa para el cual los datos son contradictorios. La posibilidad de sintetizar Dol-P-(¹⁴C)Gal usando un preparado enzimático de un organismo procarionte (*Acetobacter xylinum*) aprovechando la inespecificidad de una de las enzimas involucradas en el sistema de síntesis de lípidos azúcares, permitió estudiar su intervención en el ciclo del dolicol, y por lo tanto en la síntesis de glicoproteínas del tipo asparagina.

Todos los intentos realizados para tratar de preparar

Dol-P-(¹⁴C)Gal usando sistemas enzimáticos de eucariotes fueron infructuosos. Este comportamiento es semejante al del Dol-P-dGlc, el cual tampoco ha podido ser preparado usando sistemas de levaduras (277), algas (278), células de pollo (185) o de hamster (279). Parecería que la UDP-Glc-poliprenilfosfato D-glucosiltransferasa en eucariotes es una enzima sumamente específica y que el grupo hidroxilo en la posición 2 ó 4 sería crucial para la actividad de la misma.

Sin embargo, usando un sistema de oviducto de gallina, se ha podido sintetizar Dol-P-xilosa a partir de Dol-P y UDP-xilosa (72). Experimentos de competición con UDP-Glc y UDP-xilosa sugieren que la enzima involucrada es la UDP-Glc: poliprenilfosfato D-glucosiltransferasa (276). Esto parece probable ya que la D-xilosa difiere de la D-glucosa en que posee un H en vez de CH₂OH en la posición 6, e indica una cierta inespecificidad de la enzima en reconocer el sustituyente del C₆.

Conviene recordar que el Dol-P-dGlc se puede preparar a partir de GDP-dGlc (sección 1.5.2.1.) indicando que el grupo hidroxilo en posición 2 de la D-manosa en el GDP-Man no es fundamental para la actividad de la GDP-Man-poliprenilfosfato D-manosiltransferasa.

Resumiendo, si bien no se pudo sintetizar Dol-P-Gal en sistemas eucariotes, se estudió su metabolización en los mismos.

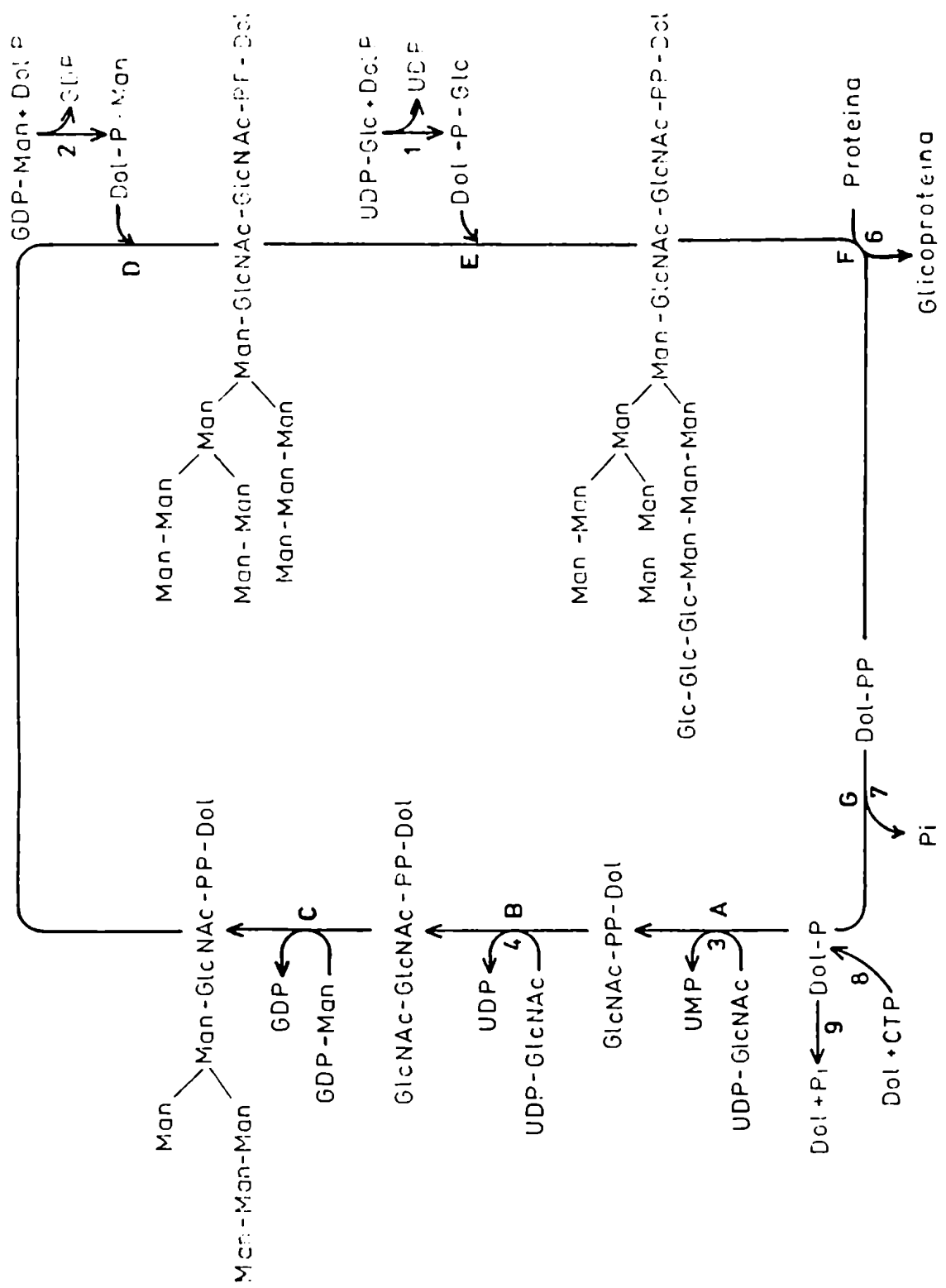


Fig. 67: Ciclo del Dolicol.

I) Transferencia de galactosa del Dol-P-Gal a Dol-PP-oligosac-Gal.

Esta reacción se demostró en diferentes tejidos (cerebro, hígado y timo) utilizando Dol-P-(^{14}C)Gal en presencia de Tritón X-100, y midiendo incorporación de radioactividad a extracto 1103 (tabla 7, líneas 1, 2, y 3). El tejido más activo fue el cerebro; sin embargo debido a la falta de reproducibilidad obtenida con el preparado enzimático de este tejido, todos los estudios posteriores se realizaron con el preparado de microsomas de hígado.

Se descartó la posibilidad que el dador de galactosa fuera el UDP-Gal. Incubaciones realizadas en presencia de UDP-Gal no radioactivo en la mezcla de incubación indicaron que este nucleótido azúcar no interfirió la transferencia de (^{14}C)galactosa al extracto 1103 a partir de Dol-P-(^{14}C)Gal (tabla 7, líneas 1 y 5). Esta transferencia de (^{14}C)galactosa no requirió la participación de cationes divalentes (tabla 8). La presencia de EDTA- Na_2 2 mM en la mezcla de incubación no influyó en la incorporación observada. La ligera estimulación obtenida con Cl_2Mg 6 mM no se la consideró significativa. El Cl_2Mn 8 mM produjo una fuerte inhibición (aproximadamente 50%). Este comportamiento resultó similar al observado en la transferencia de glucosa de Dol-P-Glc a Dol-PP-oligosac-Glc (249).

La movilidad del Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal en diferentes sistemas cromatográficos fue similar a la del Dol-PP-oligosac-Glc. Ambos compuestos migraron un poco más que la glucosa ($R_{\text{Glc}} = 1,15$). Ninguno de ellos migró con los solventes A, C y D.

La presencia de puente pirofosfato en el Dol-PP-oligosac-Gal

se dedujo por cromatografía en columna de DEAF-celulosa y comparación con la posición en que eluyó un estándar de Dol-PP-oligosac-Glc. Ambos compuestos eluyeron prácticamente a la misma concentración de formiato de amonio (fig. 27).

Se comprobó que la radioactividad en el extracto 1103 correspondía a (^{14}C)galactosa por análisis del producto de hidrólisis ácida total, indicando que no hubo epimerización ni otra alteración en el azúcar incorporado (fig. 21 A y 28).

Por hidrólisis ácida suave, el Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal liberó el oligosac-(^{14}C)Gal (fig. 21 C) cuya movilidad ($R_{\text{Glc}} = 0,09$) en el solvente B fue ligeramente mayor que al del oligosac-(^{14}C)Glc ($R_{\text{Glc}} = 0,07$) (fig. 29).

El estudio comparativo de las propiedades del oligosac-Glc y del oligosac-Gal indicó que este último posee manosas, dos grupos hexosaminas, y que los dos grupos hexosamina están unidos formando la N,N'-diacetilquitobiosa. La presencia de grupos manosa se determinó por tratamiento de ambos oligosacáridos con manosidasa. Al cromatografiar los productos de degradación, se observaron en ambos casos tres componentes cuyas movilidades permitieron estimar que correspondían a la pérdida de 3 a 5 residuos azúcar (fig. 31 A, B, C y D). En ningún caso se observó liberación de glucosa ni de galactosa.

La presencia de hexosamina se determinó por tratamiento alcalino reductor de los oligosacáridos glucosilados y galactosilados, y separación de los productos por electroforesis. En ambos casos, se observaron tres picos de radioactividad que correspondían a la eliminación de ninguno, uno y dos grupos ace-

tilo, respectivamente (fig. 32 B y C). El oligosac-Gal sin tratar se comportó como neutro (fig. 32 A), es decir, como el oligosac-Glc.

Además se verificó que los dos grupos hexosamina en el oligosac-Gal están unidos formando N,N'-diacetilquitobiosa, ya que la unión se pudo hidrolizar con la enzima endo-N-acetilglucosaminidasa H. Esto se comprobó sometiendo los productos de la hidrólisis enzimática al tratamiento alcalino reductor, y verificando por electroforesis que se obtenían solo dos compuestos, en vez de los tres observados anteriormente, uno neutro sin desacetilar y otro que perdió un grupo acetilo (pico lento, fig. 32 D). Nuevamente el compuesto sin tratar se comportó como neutro.

II) El oligosac-Gal está constituido por dos oligosacáridos principales: oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂.

Por cromatografía con el solvente E (fig. 33 A), se observó que el oligosac-Gal estaba constituido principalmente por dos compuestos a los que se llamó oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂ por su analogía con la posición en que migran el oligosac-Glc₁ y el oligosac-Glc₂, respectivamente (fig. 33 A y B). Cromatografiando mayores cantidades de material, se observaron, además de los dos compuestos arriba mencionados, una serie de picos minoritarios (fig. 34 y 35), los cuales no fueron analizados debido a su pequeña cantidad.

III) Estructura de los oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂.

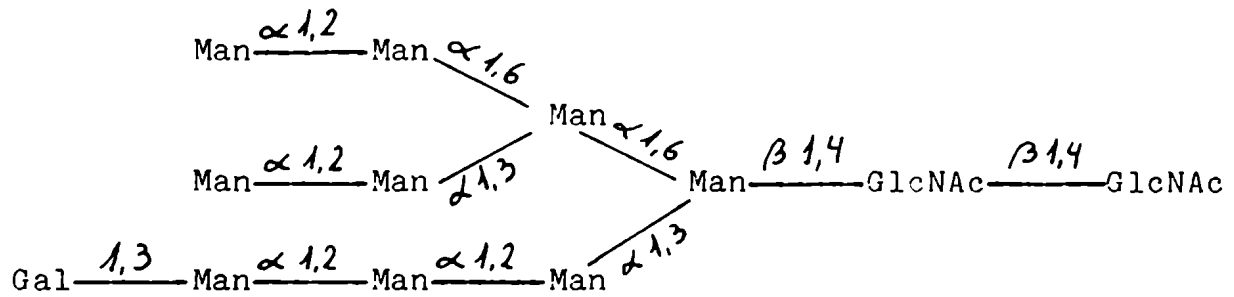
Las estructuras asignadas al oligosac-Gal₁ y al oligosac-

Gal₂ (fig. 68) se basan en los siguientes resultados:

Los porcentajes de ácido fórmico liberados por oxidación con periodato (fig. 40 y tabla 10) indicaron que las galactosas en el oligosac-Gal₁ y en el oligosac-Gal₂ eran terminales o que estaban O-glicosídicamente sustituidas en la posición 6. Esta ambigüedad desapareció al permetilar estos compuestos con meta-periodato de sodio, hidrolizarlos y cromatografiar los productos en capa delgada. En ambos casos, solo se obtuvo un único pico de radioactividad coincidente con el estándar de 2,3,4,6, tetrametil-galactosa (fig. 41 A y B). Con este resultado se concluyó que, tanto en el oligosac-Gal₁ como en el oligosac-Gal₂, la galactosa era terminal.

Para determinar a qué rama de las manosas del core (es decir, si 1,6 o 1,3) estaban unidas, las galactosas, se realizaron estudios comparativos entre los oligosacáridos galactosilados y glucosilados. Al tratar con α manosidasa los oligosac-(¹⁴C)Gal₁, oligosac-(¹⁴C)Gal₂, oligosac-(¹⁴C)Glc₁ y oligosac-(¹⁴C)Glc₂, se observó en todos los casos un cambio de movilidad respecto a los mismos oligosacáridos sin tratar, que se adjudicó a la pérdida de 4 a 5 residuos manosa (fig. 42 A, B, C y D). Como no se observó liberación de (¹⁴C)galactosa ni de (¹⁴C)glucosa, estos resultados sugirieron que las galactosas en ambos oligosacáridos galactosilados estaban en la misma rama que las glucosas en los oligosacáridos glucosilados, es decir en la rama α 1-3 del core (fig. 68).

A: oligosac-Gal₁



B: oligosac-Gal₂

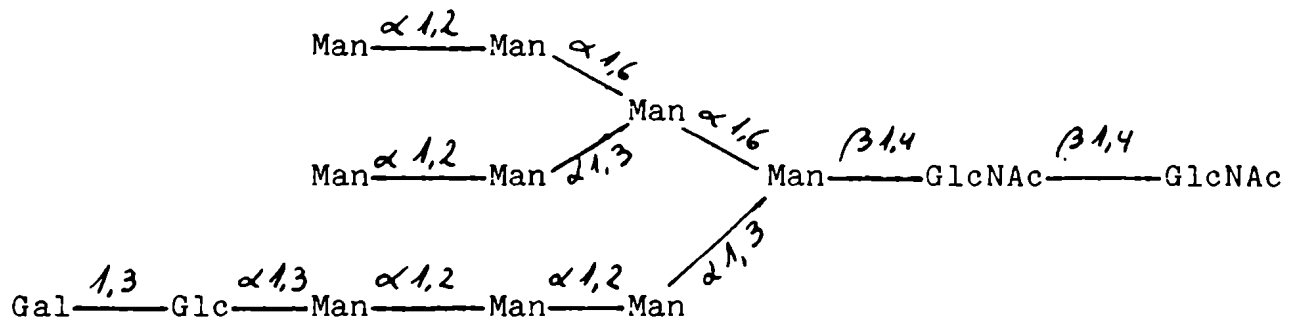


Fig. 68: Estructura de los oligosacáridos galactosilados.

Hasta aquí, todos los datos obtenidos llevaron a pensar que la posición que ocupaba la galactosa en el oligosac-Gal₁ era similar a la que tenía la glucosa en el oligosac-Glc₁, es decir, en unión 1-3 a la última manosa de la rama α 1-3, y la posición que ocupaba la galactosa en el oligosac-Gal₂ era similar a la que tenía la última glucosa en el oligosac-Glc₂, es decir unida en posición 1,3 a la primera glucosa (fig. 68).

Para confirmar esto, se sometieron a acetólisis parcial los oligosac-(¹⁴C)Gal₁, oligosac(¹⁴C)Gal₂, oligosac-(¹⁴C)Glc₁ y oligosac-(¹⁴C)Glc₂ y los productos se analizaron por cromatografía. Los perfiles obtenidos a partir de oligosac-(¹⁴C)Gal₁ y oligosac-(¹⁴C)Glc₁ fueron muy similares (fig. 43 A, B). En cuanto a los perfiles obtenidos a partir de oligosac-(¹⁴C)Gal₂ y oligosac-(¹⁴C)Glc₂ no fueron tan parecidos (fig. 43, C y D), sobre todo en la zona de los disacáridos y trisacáridos, ya que como era de esperar, el oligosac-(¹⁴C)Glc₂, al tener las dos gluosas marcadas con (¹⁴C), produjo un perfil más complejo en esta zona. Recordemos que en el oligosac-(¹⁴C)Gal₂, la galactosa marcada terminal estaría unida en posición 1-3 a la primera glucosa, que en este caso no era radioactiva.

De los productos de acetólisis parcial del oligosac-(¹⁴C)Gal₁ y del oligosac-(¹⁴C)Gal₂ se eluyeron las zonas correspondientes a los disacáridos. Estos disacáridos se redujeron con borohidruro de sodio y se cromatografiaron en el solvente G (fig. 44, A y C). Conviene recordar que en este buffer, los polioles reducidos que tienen el C₃ substituido no pueden formar complejos con molibdato y por lo tanto, no migran (261). En ambos casos, se obtuvo un

pico que no migró, indicando que en los dos oligosacáridos galactosilados las galactosas están unidas en unión 1-3 al oligosacárido respectivo.

Completando estos estudios, se comprobó que ambos disacáridos reducidos migraron en forma diferente ($R_{Glc-01} = 0,69$ y $R_{Glc-01} = 0,64$ para los disacáridos reducidos provenientes del oligosac-(^{14}C)Gal₁ y del oligosac-(^{14}C)Gal₂, respectivamente) al cromatografiarlos en el solvente C (fig. 45, A y B). Estos datos, junto con los mencionados antes, y el hecho de que en este sistema cromatográfico el manitol migra menos que el galactitol, llevaron a concluir que el disacárido reducido obtenido por acetólisis parcial del oligosac-(^{14}C)Gal₁ era el galactosil-1,3-manitol y el obtenido del oligosac-(^{14}C)Gal₂ era el galactosil-1,3-sorbitol (fig. 68), en coincidencia con las estructuras propuestas en la fig. 68.

Teniendo en cuenta que la cantidad relativa de los oligosac-Glc₁, oligosac-Glc₂ y oligosac-Glc₃ variaba notablemente al variar el tiempo de incubación (139), se estudió si las cantidades relativas de los oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂ también variaban con el tiempo de incubación empleado en la obtención del Dol-PP-oligosac-Gal a partir del Dol-P-Gal. Se encontró que el tiempo de incubación no modificaba la relación de oligosac-Gal₁ a oligosac-Gal₂ (fig 36, A y B). En cambio sí se observaron cambios al utilizar distintos preparados enzimáticos. Estas diferencias se atribuyeron a las variaciones en los lípido-oligosacáridos endógenos existentes en cada preparado enzimático.

Todos los intentos realizados para tratar de obtener un oli-

gosacárido galactosilado del tamaño del oligosac-Glc₃ fueron infructuosos. Se usaron como dadores Dol-P-(¹⁴C)Gal en presencia de UDP-Glc (fig. 38, A y B), Dol-P-(¹⁴C)Gal con un exceso de Dol-P-Glc no radioactivo (tabla 9), y Dol-P-(¹⁴C)Gal en presencia de Dol-P-Glc y de deoxicolato (fig. 39, B y C). En los tres casos se obtuvieron únicamente dos picos, correspondientes al oligosac-Gal₁ y al oligosac-Gal₂.

Estos resultados llevarían a pensar que existirían por lo menos dos glucosiltransferasas, una que transfiere los dos primeros residuos glucosa de Dol-P-Glc a Dol-PP-(GlcNAc)₂-Man₉ en posición 1-3, y la otra que transfiere el último residuo glucosa de Dol-P-Glc a Dol-PP-oligosac-(GlcNAc)₂-Man₉-Glc₂ en posición 1-2, y que esta última glucosiltransferasa sería la más específica pues distingue entre su substrato natural y el Dol-P-Gal.

Por otra parte, el hecho de que las galactosas fueran terminales indicaría que una vez que entra una galactosa en el oligosacárido, éste no puede ser posteriormente elongado por la adición de otro azúcar, es decir que la galactosa actuaría como terminador de cadena. Estos resultados recuerdan los obtenidos por Schwartz y col. (187), usando GDP-dGlc. Estos autores encontraron que el GDP-dGlc, nucleótido azúcar análogo del GDP-Man, inhibió la elongación del Dol-PP-(GlcNAc)₂ con manosas, acumulándose el Dol-PP-(GlcNAc)₂-dGlc, o el Dol-PP-(GlcNAc)₂-Man-dGlc los cuales no pudieron ser elongados posteriormente con residuos manosa o dGlc. El dGlc transferido actuó como terminador de cadena o punto final, pues una vez incorporado a un oligosacárido

se bloqueaba su metabolización. A diferencia de los oligosacáridos galactosilados obtenidos por incubación con Dol-P-Gal, los oligosacáridos que incorporaban dGlc en su extremo no reductor no fueron transferidos a proteína.

IV) El oligosac-Gal₁ y el oligosac-Gal₂ son transferidos a proteína.

Los primeros indicios positivos que sugirieron que el Dol-PP-oligosac-Gal transfería la porción oligosacarídica a proteína se obtuvieron por estudios indirectos. Usando Dol-P-(¹⁴C)Gal como sustrato, se encontró que se transfería marca radioactiva a proteína, y que esta transferencia requería Mn⁺⁺ como catión divalente; el Mg⁺⁺ no lo substituyó y el EDTA-Na₂ la inhibió completamente (tabla 7). Este comportamiento fue similar al descrito por Leloir y col. (109) para la transferencia a proteína del oligosac-Glc₃ a partir de Dol-PP-oligosac-Glc₃.

Por otra parte, utilizando distinta combinación de dadores, se descartó la posibilidad de que la transferencia se efectuara por conversión del Dol-P-(¹⁴C)Gal a UDP-(¹⁴C)Gal (reacción descrita en la sección 4.4.), y que este último se transfiriera (¹⁴C)galactosa a proteína (tabla 11). Estudios indirectos confirmaron que el Dol-PP-oligosac-Gal transfería la porción oligosacarídica a una proteína.

Usando Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal como sustrato se obtuvo incorporación de radioactividad a material insoluble en TCA caliente (tabla 13). El rendimiento, si bien fue bajo (3,4%), comparado con los obtenidos en iguales condiciones a partir de

Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc (50%), fue significativo. Por otra parte, investigando la incorporación de oligosac-(^{14}C)Gal a proteína en función de la concentración de Tritón X-100 (fig. 57), se observó un máximo a una concentración de 1,2%. Hay que aclarar que esta concentración óptima de detergente puede variar con la preparación enzimática, y que es en general similar a la obtenida en la transferencia de oligosac-(^{14}C)Glc a proteína (fig. 54).

Estudiando la incorporación de oligosac-(^{14}C)Gal a proteína a partir de Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal en función del tiempo (fig. 56), se observó que la incorporación fue aumentando progresivamente hasta llegar a una meseta a los 30 min. Con tiempos de incubación mayores no se observó un decaimiento en la radioactividad incorporada, como el observado en el caso de la transferencia del oligosac-(^{14}C)Glc a partir del Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Glc (fig. 55). Esta diferencia de comportamiento se debió a la presencia de glucosidasas endógenas en la mezcla de incubación, que hidrolizan el oligosacárido glucosilado una vez transferido a proteína (sección 1.4.7.3.), y a la ausencia de galactosidasas endógenas o a que no actúan en las condiciones del ensayo. Refuerza este hecho la imposibilidad de poder detectar galactosa libre en la fase superior acuosa luego de hacer una partición de Folch (sección 4.9.).

V) Verificación de que el oligosac-Gal₁ y el oligosac-Gal₂ son transferidos a una proteína.

Se verificó que el material insoluble en TCA caliente obtenido por incubaciones de Dol-PP-oligosac-(^{14}C)Gal con microsomas de hígado era una glicoproteína, ya que se solubilizó por

acción de una enzima proteolítica y el producto obtenido llamado "digerido de proteasa" ya no era precipitable por TCA 5%. Además este producto solubilizado cromatografiado en una columna de Bio Gel P 6 dio un único pico de radioactividad que permitió calcular un $K_{AV} = 0,35$ correspondiente por tablas a un $PM = 3.300$ (fig. 58). Este resultado concordó muy bien con el valor de $K_{AV} = 0,315$ presentado por Ugalde para los glicopéptidos glucosilados obtenidos en forma similar y con el valor de $K_{AV} = 0,368$ obtenido para el oligosac-Glc₃ libre preparado por hidrólisis ácida suave del difosfato derivado (135), e indicó que las fracciones polipeptídicas asociadas a ambos oligosacáridos después del tratamiento con proteasa eran pequeñas. Por otra parte, se comprobó por electroforesis en buffer de pH ácido y de pH alcalino que el "digerido de proteasa" contenía compuestos de naturaleza anfotérica, como era de esperar para un glicopéptido (figs. 59, 60 y 61).

Completando el estudio, se caracterizó parcialmente la porción oligosacarídica de los glicopéptidos galactosilados. Se demostró que los oligosacáridos podían ser liberados de los glicopéptidos por tratamiento con endo-N-acetilglucosaminidasa H (fig. 62). Comparando el tamaño de los oligosacáridos galactosilados así liberados con estandares internos de oligosacáridos glucosilados obtenidos por tratamiento con endo-N-acetilglucosaminidasa H de una mezcla de oligosac-Glc₁, Glc₂ y Glc₃ tritiados, se demostró la presencia tanto del oligosac-(¹⁴C)Gal₁ como del oligosac-(¹⁴C)Gal₂ (fig. 63). Esta observación indicó que ambos oligosacáridos galactosilados se transferían a proteína a partir

del Dol-PP-oligosac-(¹⁴C)Gal, y que una vez transferidos no eran modificados. Estos resultados fueron en todo concordantes con la curva obtenida graficando incorporación a proteína de oligosac-(¹⁴C)Gal a partir de Dol-P-(¹⁴C)Gal en función del tiempo (fig. 56), donde no se observó decaimiento en la radioactividad incorporada al incubar tiempos mayores de 30 min.

VI) Las enzimas microsomales actúan frente a los oligosacáridos glucosilados en forma diferente que con los oligosacáridos galactosilados.

Como ya se señaló en la sección 1.4.7., el oligosac-Glc₃, una vez transferido a proteína, sufre una serie de modificaciones que se conocen con el nombre de "procesamiento". Las mismas consisten, como ya se señaló anteriormente, en la remoción secuencial por parte de glicosidasas específicas de todos los residuos glucosa y de algunos residuos manosa. Los resultados mostrados en la sección 4.11.2 y discutidos en el punto V, indicaron que en las condiciones "in vitro" usadas para transferir los oligosacáridos galactosilados, éstos no eran procesados. Para justificar esta diferencia de comportamiento entre los oligosacáridos glucosilados y galactosilados frente al procesamiento, se trató de caracterizar mejor las glicosidasas presentes en el preparado microsomal. Se verificó, empleando las condiciones de transferencia usadas para transferir los oligosacáridos galactosilados a proteína, que el Dol-PP-oligosac-Glc (marcado en las manosas y en las glucosas por síntesis "in vivo") transfería el oligosacárido a proteína y que éste era procesado perdiendo glucosas pero no

manosas. Estos resultados indicaron que el preparado microsomal utilizado en todo este trabajo tenía glucosidasas pero carecía de manosidasas, o las mismas se encontraban inhibidas en las condiciones de transferencia usadas. Esta ambigüedad se eliminó midiendo la actividad manosidásica de preparado microsomal sobre p-nitro α D-metilmanosido en dos condiciones de incubación distintas; una de ellas a pH = 6,5, que es el óptimo para que actúen las manosidasas de Golgi (específicas del procesamiento) y la otra, a pH = 4,5, que es el óptimo para que actúen las manosidasas lisosomales (altamente inespecíficas). Se encontró que el preparado microsomal tenía actividad de α manosidasa medida a pH = 4,5. Esto descartó la presencia de manosidasas lisosomales, las cuales son activas a pH ácido, y confirmó la presencia de manosidasa II de Golgi, que como ya se señaló (sección 1.4.7.4.) actúa sobre p-nitro α D-metilmanosido, propiedad que la distingue de las manosidasas I_A y I_B que son inactivas frente al mismo sustrato.

Una vez aclarado este punto, y teniendo en cuenta que todos los estudios de transferencia de azúcares fueron realizados a pH = 7,8, se investigó el efecto que a pH = 6,5 las glicosidasas presentes en el preparado microsomal tenían sobre los oligosacáridos glucosilados y galactosilados. Se comprobó que, aún a pH = 6,5, las glicosidasas de Golgi no liberaron (¹⁴C)galactosa del oligosac-(¹⁴C)Gal₁ ni de oligosac-(¹⁴C)Gal₂ (fig. 64, cuadros A y B). En cambio, en estas mismas condiciones liberaron (¹⁴C)glucosa y (¹⁴C)manosa de oligosac-Glc₁ y de oligosac-Glc₂ totalmente marcados (fig. 65, cuadros A y B). Estos resultados

mostraron que, en las condiciones de incubación usadas, el preparado microsomal tenía actividad de manosidasas y glucosidasas sobre el oligosac-Glc₁ y sobre el oligosac-Glc₂. Este mismo preparado microsomal no tenía actividad de galactosilasa sobre los oligosacáridos galactosilados (oligosac-Gal₁ y oligosac-Gal₂).

VII) Las manosidasas microsomales degradan el oligosac-Gal₁ en forma diferente que el oligosac-Gal₂.

Completando los estudios discutidos en el punto VI, se demostró además que el oligosac-(¹⁴C)Gal₁ pudo llegar a perder hasta cuatro residuos manosa produciendo Gal-Man₅-(GlcNAc)₂, mientras que el oligosac-(¹⁴C)Gal₂ resultó casi insensible, pudiendo perder con mucha dificultad una manosa o a lo sumo dos, produciendo Gal-Glc₁-Man₈-(GlcNAc)₂ y Gal-Glc₁-Man₇-(GlcNAc)₂ (fig. 66, cuadros I y II). En la fig. 69, cuadros A y B, se muestran los posibles productos finales mayoritarios obtenidos en cada caso.

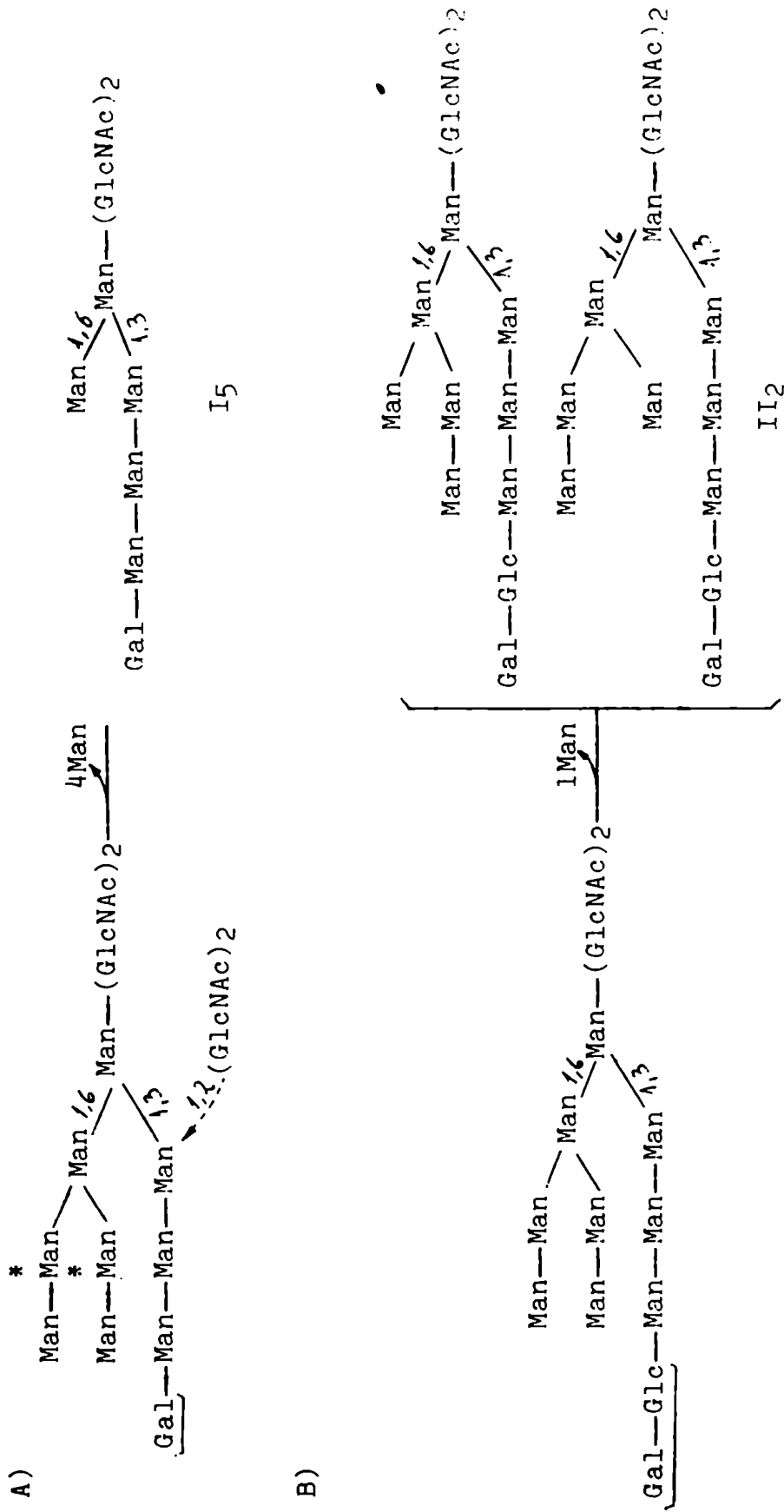


Fig. 69: Procesamiento propuesto para los oligosacáridos galactosilados.

Estos resultados son coincidentes con el camino de procesamiento minoritario ya mencionado (sección 1.4.7.3.b) por Kornfeld y col. (140). En este camino minoritario se describe la conversión de Glc-Man₉-(GlcNAc)₂ a Glc-Man₈-(GlcNAc)₂ y Glc-Man₇-(GlcNAc)₂, pero no se menciona ni Glc-Man₆-(GlcNAc)₂ ni Glc-Man₅-(GlcNAc)₂. Por otra parte, debe recordarse que el procesamiento de las manosas marcadas con asterisco (fig. 69) depende del agregado de un residuo GlcNAc en posición β 1-2 a la manosa 1-3 del core (sección 1.4.7.4.a). El hecho de que el oligosac-Gal pueda perder 4 residuos manosa de la rama α 1-6 (incluyendo los dos marcados con asterisco en la fig. 69), podría interpretarse de la siguiente manera: el trisacárido Gal-Man-Man unido en posición 1-2 a la primera manosa α 1-3 le otorgaría a todo el oligosacárido una conformación equivalente a la producida por el residuo GlcNAc unido en dicha posición, y por lo tanto la manosidasa II podría actuar sobre los residuos manosa marcados con asterisco (fig. 69). Es decir, que la entrada del grupo GlcNAc antes mencionado no sería una señal para que actúe la manosidasa II sino que le daría al oligosacárido la configuración adecuada para exponer los residuos manosa a dicha enzima. Distinto es el caso del oligosac-Gal₂ que resultó casi insensible a las manosidasas.

Generalizando, se podría resumir hasta aquí que la presencia de dos hexosas unidas a la tercera manosa de la rama 1-3 (fig. 69) impide que las manosidasas microsomales actúen sobre las manosas de la rama 1-6. Esta inhibición es mucho menos marcada si en lugar de dos hay una sola hexosa.

Por otra parte y con fines comparativos, los oligosacáridos

glucosilados (oligosac-Glc₁ y oligosac-Glc₂), marcados tanto en las glucosas como en las manosas, fueron sometidos a la acción de las glicosidasas microsomales presentes en el preparado enzimático. Si bien perdieron 4 ó 5 residuos hexosa (fig. 66, III_a, III_b, y IV), no se pudieron sacar conclusiones sobre los compuestos intermediarios obtenidos en cada caso, ya que no se hicieron estudios estructurales de los mismos; sin embargo, de acuerdo con el procesamiento mayoritario ya mencionado en la sección 1.4.7.3.b, es de suponer que el compuesto M₅ obtenido a partir de oligosac-Glc₁ era el intermediario V mostrado en la fig. 12, y por lo tanto con estructura totalmente diferente a la encontrada para el oligosac-Gal₁ sometido al mismo tratamiento (compuesto I₅, fig. 69 A) a pesar de tener una movilidad similar (fig. 66).

VIII) Inhibición del procesamiento de glicoproteínas.

Se han descripto varias formas de inhibir el procesamiento de glicoproteínas (sección 1.5.). Una de ellas es la utilización de antibióticos específicos o sustancias que actúan en distintas etapas del procesamiento inhibiendo las enzimas involucradas en el mismo como es el caso de la swainsonina (sección 1.5.2.2.), que inhibe la manosidasa II (272), la 1-deoxinojirimicina, que interfiere con el procesamiento de las glucosas porque inhibe las glicosidasas 2 y 3 (fig. 12) (273), o el bromoconduritol, que inhibe la hidrólisis de la glucosa más interna del oligosac-Glc₃, precursor de los oligosacáridos de alta manosa o complejos (274). En estos tres casos se observó inhibición de la formación de los

oligosacáridos complejos ligados N-glicosídicamente a proteína.

Otra de las formas de modificar el procesamiento es usando mutantes deficientes en alguna de las enzimas que intervienen en el mismo; por ejemplo, las mutantes de células de ovario de hamster deficientes en la actividad de la N-acetilglucosaminil-transferasa I (pHa^{R1}) ya mencionadas en la sección 1.4.7.4.a, o la mutante de células de linfoma de ratón hallada recientemente por Kornfeld (275), deficiente en la actividad de la glucosidasa 2 (PHA 2.7).

En esta tesis se encontró otra forma de inhibir el procesamiento. Esto se consiguió usando un sustrato modificado al cual las glucosidasas no reconocen. Consistió en reemplazar por una galactosa a la glucosa del oligosac-Glc₁ y a la última glucosa del oligosac-Glc₂ (fig. 68). Esta modificación impidió a las glucosidasas presentes en el preparado microsomal degradar a los oligosacáridos galactosilados y permitió usarlos como modelo para estudiar la acción de las manosidasas presentes en dicho preparado como se describió más arriba (punto VII). Debe destacarse que en este estudio se utilizaron oligosacáridos aislados. Teneiendo en cuenta que como también fue posible obtener glicoproteína galactosilada, se abre la posibilidad de estudiar con este nuevo análogo de las glicoproteínas glucosiladas "fisiológicas" el destino que las mismas sufren en una etapa posterior de su procesamiento.

Cora Quoy

M. Dan 6 T

BIBLIOGRAFIA

1. Neuberger, A. (1938) *Biochem.J.*, 32, 1.435.
2. Jchansen, P.G., Marshall, R.D., y Neuberger, A. (1961) *Biochem.J.*, 78, 518.
3. Fletcher, A.P., Marks, G.S., Marshall, R.D., y Neuberger, A., (1963), *Biochem.J.*, 87, 265.
4. Marks, G.S., Marshall, R.D., Neuberger, A., (1963), *Biochem.J.*, 87, 274.
5. Wagh, P.V., Borstein, I., Winzler, R.J., (1969), *Journal Biol.Chem.*, 244, 568.
6. Jourdian, G.W., y Distler, J.J., (1972), *Carbohydrates Res.*, 22, 369.
7. Mester, L., Schimpl, A., Senn, M., (1967), *Tetrahedron Lett.*, 18, 1697.
8. Mescher, N.F., (1981), *Trends in Biochem.Sciences*, 6, (97-99).
9. Sharon, N., y Lis, H., (1981), *Chemical and Engineering News*. Vol.59, Nº13, (21-28).
10. Tarlov, A.R., y Kennedy, E.P., (1965), *J.Biol.Chem.*, 240, (49-53).
11. Spiro, R.G., *Methods in Enzymology*, Vol. XXVIII, 31.
12. Parodi, A.J., y Leloir, L.F., (1979), *Biochem.Biophys. Acta*, 559, (1-39).
13. Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S., y Montreuil, J., (1975), *FEBS Lett.*, 50, 296.
14. Ito, S., Yamashita, K., Spiro, R.G., y Kobata, A., (1977), *Journal of Biochem.*, 81, 1621.
15. Kondo, T., Fukuda, M., Osawa, T., (1977), *Carb.Res.*, 58, 405.
16. Fournet, B., Strecker, G., Montreuil, J., Dorland, H., Haverkamp, J., Vliegthart, J.F.G., Schmid, K., y

- Binette, J.P., (1978), 17, (5206-5214).
17. Takasaki, S., Yamashita, K., Suzuki, K., Iwanaga, S., y Kobata, A., (1979), Journal Biol.Chem., 254, 8548.
 18. Schmid, K., Binette, J.P., Dorland, L., Vliegenghart, J. C., Fournet, B., y Montreuil, J., (1971), Biochim. Biophys. Acta, 581, (356-359).
 19. Nakajima, T., y Ballou, C.E., (1974), J.Biol.Chem., 249, (7685-7694).
 20. Nakajima, T., y Ballou, C.E., (1975), Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 72, (3912-3916).
 21. Lis, H., y Sharon, N., (1978), J.Biol.Chem., 253, (3468-3476).
 22. Liang, C.J., Yamashita, K., Muellemberg, C.G., Sichi, H., y Kobata, A., (1979), J.Biol.Chem., 254, (6414-6418).
 23. Tai, T., Yamashita, K., Ito, S., y Kobata, A., (1977), J.Biol.Chem., 252, (6687-6694).
 24. Tai, T., Yamashita, K., y Kobata, A., (1977), Biochem. Biophys.Res.Comm., 78, (434-441).
 25. Yamashita, K., Tachibana, Y., y Kobata, A., (1978), J.Biol.Chem., 253, (3862-3869).
 26. Chapman, A., y Kornfeld, S., (1979), 254, (824-828).
 27. Fukuda, M., Fukuda, M.N., y Hakomari, S., (1979), J.Biol.Chem., 254, (3700-3703).
 28. Montreuil, J., (1980), Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry, 37, 157.
 29. Johnston, I.R., McGuire, E.J., Jourdian, G.W., y Roseman, S., (1966), J.Biol.Chem., 241, 5735.
 30. Wright, A., Dankert, M.A., y Robins, P.W., (1965), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 54, 235.
 31. Anderson, J.S., Matsuhasi, M., Haskin, M.A., y Strominger, J.L., (1965), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 54, 881.

32. Weiner, I.W., Higuchi, M., Rothfield, L., Andrew, S., Osborn, M.J., y Horecken, E.L., (1965). Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 54, 228.
33. Wright, A., (1971), J.Bacteriol., 105, 927.
34. Tanner, W., (1969), Biochem.Biophys.Res.Communit., 35, 144-150.
35. Caccam, J.F., Jackson, J.J., y Eylar, E.H., (1969), Biochem.Biophys.Res.Communit., 35, (505-511).
36. Villemez, C.L., y Clark, A.F., (1969), Biochem.Biophys. Res.Communit., 36, (57-63).
37. Zatz, M., y Barondes, S.H., (1969), Biochem.Biophys.Res. Commun., 36, (511-517).
38. Kauss, H., (1969), FEBS. Lett., 5, (81-84).
39. Burgos, J., Hemming, F.W., Pennock, J.F., y Morton, R.A., (1963), Biochem., J., 88, 470-482.
40. Cramer, F., y Böhm, H.J., (1959), Angew.Chem., 71, 775.
41. Popjack, G., Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Ryhage, R., y Goodman, D.S., (1962), J.Biol.Chem., 237, 56.
42. Behrens, N.H., y Leloir, L.F., (1970), Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 66, 153.
43. Pont Lezica, R., Brett, Ch.T., Romero Martinez, P., y Dankert, M.A., (1975), Bioch.Bioph.Research.Communit., 66, (890-986).
44. Behrens, N., Parodi, J.A., Leloir, L.F., y Krisman, C. R., (1971), Arch.Biochem.Biophys., 143, 375.
45. Waechter, C.J., Lucas, J.J., y Lennarz, W.J., (1974), Biochem.Biophys.Res.Communit., 56, 343-350.
46. Romero, P., García, R.C., y Dankert, M.A., (1977), Mol.Cell.Biochem., 16, 205-212.
47. Tetas, M., Chao, H., y Molnar, J., (1970), Arch.Biochem. Biophys., 138, (135-146).
48. Molnar, J., Chao, H., y Ikehara, Y., (1971), Biochem. Biophys.Acta., 239, 401-410.
49. Palamarczyh, G., y Hemming, F.W., (1975), Biochem.J.,

- 148, (245-251).
50. Peterson, P.A., Rask, L., Helting, T., Ostberg, L., y Fernstedt, V., (1976), J.Biol.Chem., 251, 4986-4995.
 51. De Luca, L.M., Pangala, V.B., Wlodzimierz, S., y Adamo, S., (1979), Fed.Proc., 38, (2535-2539).
 52. Wolf, G., Kiorpes, T.C., Masushige, S., Schreiber, J.B., Smith, M.J., y Anderson, R.S., (1979), Fed.Proc, 38, (2540-2543).
 53. Hercovics, A., Bugge, B., y Jeanloz, R.W., (1977), 252, 2271.
 54. Jankowski, W., y Chojnacki, T., (1972), Biochim.Biophys. Acta., 260, 93-97.
 55. Robbins, P.W., Krag, S.S., y Liu, T., (1977), J.Biol. Chem., 252, 1780-1785.
 56. Parodi, A.J., y Martín Barrientos, J., (1977), Biochim. Biophys.Acta., 500, (80-88).
 57. Keenan, R.W., Matula, J.M., y Holloman, L., (1973), Biochim.Biophys.Acta., 326, (84-92).
 58. Quesada Allué, L.A., Marechal, L.R., y Belocopitow, E., (1976), FEBS. Lett., 67, 243-247.
 59. Palamaczyk, G., y Chojnaki, T., (1973), FEBS.Lett., 34, 201-203.
 60. Parodi, A.J., (1977), Eur.J.Biochem., 75, (171-180).
 61. Daleo, G.R., y Pont Lezica, R., (1977), FEBS Lett., 74, 247-250.
 62. Brett, C.T., y Leloir, L.F., (1977), Biochem.J., 161, (93-101).
 63. Dallner, G., Behrens, N.H., Parodi, A.J., y Leloir, L. F., (1972), FEBS Lett., 24, (315-317).
 64. Mankowski, T., Sasak, W., Janczura, E., y Chojnacki, T., (1977), Arch.Biochem.Biophys., 181, 393-401.
 65. Mankowski, T., Sasak, W., y Chojnacki, T., (1975), Biochem.Biophys.Res.Comm., 65, 1292.
 66. Warren, C.D., y Jeanloz, R.W., (1973), FEBS. Lett, 31, 332.

67. Warren, C.D., y Jeanloz, R.W., (1973), *Biochemistry*, 12, 5038.
68. Warren C.D., y Jeanloz, R.W., (1975), *Biochemistry*, 14, 412.
-
69. Hercovies, A., Warren, C.D., Jeanloz, R.W., Liu, I.Y., y Strominger, J.L., (1974), *FEBS. Lett.*, 45, 312.
70. Warren, C.D., Liu, I.Y., Hercovies, A., y Jeanloz, R.W., (1975), *Journal Biol.Chem.*, 250, 8069.
71. Hercovies, A., Warren, C.D., y Jeanloz, R.W., (1975), *Journal Biol.Chem.*, 250, 8079.
72. Waechter, C.J., Lucas, J.J., y Lennarz, W.J., (1974), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 56, (343-350).
73. Breckenridge, W.C., y Wolfe, L.S., (1973)., *FEBS Lett.*, 29, (66-68).
74. Wedgwood, J.F., Strominger, J.L., y Warren, C.D., (1974), *J.Biol.Chem.*, 249, (6316-6324).
75. McEvoy, F.A., Ellis, D.E., y Shall, S., (1977), *Biochem. J.*, 164, 273-275.
76. Ronzio, R.A., y Mohrlock, S.H., (1977), *Arch.Biochem. Biophys.*, 181, 128-136.
77. Takatsuki, A., Kohno, K., y Tamura, G., (1975), *Agric. Biol.Chem.*, 39, (2089-2091).
78. Tetas, M., Chao, H., y Molnar, J., (1970), *Arch.Biochem. Biophys*, 138, (135-146).
79. Zatta, P., Zakim, D., y Vessey, D.A., (1975), *Biochim. Biophys.Acta.*, 392, (361-365).
80. Spiro, M.J., Spiro, R.G., y Bhoyroo, V.D., (1976), *J. Biol.Chem.*, 251, (6400-6408).
81. Leloir, L.F., Staneloni, R.J., Carminatti, H., y Behrens, N.H., (1973), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 52, (1285-1292).
82. Warren, c.d., y Jeanloz, R.W., (1974), *Carb.Res.*, 37, 252.
83. Levy, J.A., Carminatti, H., Cantarella, A.I., Behrens, N.H., Leloir, L.F., y Tabora, E., (1974), *Biochem.*

- Biophys.Pes.Comm., 60, (118-125).
84. Behrens, N.H., Carminatti, H., Staneloni, R.J., Leloir, L.F., y Cantarella, A.I., (1973), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 70, 3390.
 85. Chamber, J., Forsee, W.T., y Elbein, A.D., (1977), J. Biol. Chem., 252, 2498.
 86. Spencer, J.P., y Elbein, A.D., (1980), Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 77, 2524.
 87. Schutzback, J.S., Springfield, J.D., y Jensen, J.W., (1980), J.Biol.Chem., 255, 4170.
 88. Chapman, A., Li, E., y Kornfeld, S., (1979), Journal Biol.Chem., 254, 10243.
 89. Behrens, N.H., Parodi, A.J., y Leloir, L.F., (1971), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 68, 2857.
 90. Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F., y Dankert, M., (1972), Biochim.Biophys.Acta., 270, 529.
 91. Parodi, A.J., Staneloni, R.J., Cantarella, A.I., Leloir, L.F., Behrens, N.H., Carminatti, H., y Levy, J.A., (1973), Carbohydr.Res., 26, 393.
 92. Spiro, M.J., Spiro, R.G., y Bhoyoo, V.D. (1976), J.Biol.Chem., 251, 6400.
 93. Spiro, R.G., Spiro, M.J., y Bhoyoo, V.D., (1976), J. Biol.Chem., 251, 6409.
 94. Li, E., Tabas, I., y Kornfeld, S., (1978), J.Biol. Chem., 253, 7762.
 95. Yamashita, I.S., Spiro, R.G., y Kobata, A., (1977), J.Biochem. (Tokyo), 81, (1621-1631).
 96. Ugalde, R.A., Staneloni, R.J., y Leloir, L.F., (1980), Eur.J.Biochem., 113, 97.
 97. Spiro, R.G., Spiro, M.J., y Bhoyroo, V.D., (1979), J.Biol.Chem., 254, 7659.
 98. Parodi, A.J., (1979), 254, 8343.
 99. Staneloni, R.J., Ugalde, R.A., y Leloir, L.F., (1980), Eur.J.Biochem., 105, 275.

100. Staneloni, R.J., Tolmasky, M.H., Petriella, C., Ugalde, R.A., y Leloir, L.F., (1980), *Biochem.J.*, 191, 257.
101. Staneloni, R.J., y Leloir, L.F., (1982), *Critical Review in Biochemistry*, Vol.12, Issue 4, (289-326).
102. Villemez, C.L., y Carlo, P.L., (1979), *J.Biol.Chem.*, 254, 4814-4819.
103. Heifetz, A., y Elbein, A.D., (1977), *J.Biol.Chem.*, 252, (3057-3063).
104. Carlo, P.L., y Villemez, C.L., (1979), *Arch.Biochem. Bioph.*, 198, (117-123).
105. Villemez, C.L., y Carlo, P.L., (1980), 255, (8174-8178).
106. Kennedy, Keller, R., Boon, D.Y., y Crum, F.C., (1979), 18, 3946.
107. Das, R.C., y Heath, E.C., (1980), *Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A.*, 77, (3811-3815).
108. Belocopitow, E., y Boscoboinik, D., (1982), *Eur.J. Biochem.*, 125, 167-173.
109. Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F., y Carminatti, H., (1972), *Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A.*, 68, 3268.
110. Behrens, N.H., Carminatti, H., Staneloni, R.J., y Leloir, L.F., (1973), 70, 3390.
111. Lucas, J.J., Waechter, C.J., y Lennarz, W.J., (1975), *J.Biol.Chem.*, 250, 1992.
112. Pless, D.D., y Lennarz, W.A., (1975), *J.Biol.Chem.*, 250, 7014.
113. Spiro, M.J., Spiro, R.G., y Bhoyroo, V.D., (1976), *J.Biol.Chem.*, 251, (6402-6425).
114. Turco, S.J., y Robbins, P.W., (1979), *J.Biol.Chem.*, 254, (4560-4567).
115. Turco, S.J., Stetson, B., y Robbins, P.W., (1977), *Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A.*, 74, (4411-4414).
116. Kornfeld, S., Georgy, W., y Chapman, A., (1979), *J.Biol.Chem.*, 254, 11649.

117. Eagon, P.K., Ksu, A.F., y Heath, H.C., (1975), Fed. Proc., 34, 678.
118. Pless, D.D., y Lennarz, W.J., (1977), Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 74, 134.
119. Marshall, R.D., (1974), Biochem.Soc.Symp., 40, 17.
- 118b. Hunt, L.T., y Dayhoff, M.O., (1970), Biochem.Biophys. Res.Comm., 39, (757-765).
120. Dayhoff, M.O., (1973), Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., Vol.5, Suppl.1.
- 120b. Liao, T.H., Salnikow, J., Moore, S., y Stein, W.H., (1973), J.Biol.Chem, 248, (1489-1495)
121. Robbins, P.W., Hubbard, S.C., Turco, S.J., y Wirth, D.F., (1977), Cell, 12, (893-900)
122. Sefton, B.W., (1977), Cell, 10, (659-668).
123. Hunt, L.A., Etchinson, J.R., y Summers, D.F., (1978), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 75, (754-758).
124. Tabas, I., Schlesinger, S., y Kornfeld, S., (1978), J.Biol.Chem., 253, (716-722).
125. Staneloni, R.J., y Leloir, L.F., (1978), Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 75, (1162-1166).
126. Eylar, E.H., y Murakami, M., (1966), Methods Enzimol., 8, (597-600).
127. Tarentino, A.L., (1972), Methods Enzimol., 28, (782-786).
128. Kohno, M., y Yamashita, I., (1972), Biochim.Biophys. Acta., 258, 600.
129. Takahashi, N., Biochem.Biophys.Res.Comm., (1977), 76, (1194-1201).
130. Tarentino, A.L., y Malcy, F., (1974), J.Biol.Chem., 249, 811.
131. Tarentino, A.L., y Maley, F.A., (1975), Biochem.Biophys. Res.Comm., 67, 455.
132. Arakawa, M., y Muramatsu, T., (1974), 76, 307.

133. Trimble, R.E., Tarentino, A.L., (1979), J.Biol.Chem., 254, 9702.
134. Ugalde, P., Staneloni, R.J., y Leloir, L.F., (1979), Biochem.Biophys.Res.Comm., 91, (1174-1181).
135. Ugalde, P., (1980), Tesis Doctoral presentada ante la Fac. de C.E. y N. (U.B.A.).
136. Grinna, L.S., y Robbins, P.W., (1979), J.Biol.Chem., 254, 8814.
137. Michael, J.M., y Kornfeld, S., (1979), Arch.Biochem. Biophys., 199, 249.
138. Tabas, I., y Kornfeld, S., (1979), J.Biol.Chem., 254, (11655-11663).
139. Tulsiani, D.R.P., Hubbard, S.C., Robbins, P.W., y Touster, O., (1982), J.Biol.Chem., 257, (3660-3668).
140. Kornfeld, S., Li, E., y Tabas, I., (1978), J.Biol. Chem., 253, (7771-7778).
141. Ugalde, P., Staneloni, R.J., y Leloir, L.F., (1978), FEBS. Lett., 91, (209-212).
142. Tabas, I., y Kornfeld, S., (1979), Fed.Proc., 38, 291.
143. Hertz, A., Katona, E., Curtz, E., Wilson, J.R., y Barton, M., (1978), Science, 201, (1229-1232).
144. Schachter, H., (1981), Lysosomes and lysosomal storage diseases. Ed.by John W. Callahan and Alexander Lowden. Raven Press, New York, (73-93)
145. Tabas, I., y Kornfeld, S., (1978), J.Biol.Chem., 253, (7779-7786).
146. Harpaz, N., y Schachter, H., (1980), J.Biol.Chem., 255, (4885-4893); (4894-4902).
147. Hubbart, S.C., y Robbins, P.W., (1979), J.Biol.Chem., 254, (4568-4576).
148. Narasimhan, S., Stanley, P., y Schachter, H., (1977), J.Biol.Chem., 252, (3926-3933).
149. Li, E., y Kornfeld, S., (1978), J.Biol.Chem., 253,

- (6426-6431).
150. Wilson, J.B., Williams, D., y Schachter, H., (1976), Biochem.Biophys.Res.Comm., 72, (909-916).
 151. Harpaz, N., y Schachter, H., (1980), 255, 4885.
 152. Sando, G.M., y Neufeld, E.F., (1977), Cell, 12, 619-627.
 153. Ullrich, K., Mersmann, G., Weber, E., y von Figura, K., (1978), Biochem.J., 170, (643-650).
 154. Natowicz, M.R., Chi, M.M.Y., Lowry, O.H., y Sly, W.S., (1979), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 76, (4322-4326).
 155. Hasilik, A., Rome, L.H., y Neufeld, E.F., (1979), Fed. Proc., 38, 467.
 156. Tabas, I., y Kornfeld, S., (1980), J.Biol.Chem., 255, (6633-6639).
 157. Hasilik, A., Waheed, A., y von Figura, K., (1981), Bioch.Biophys.Res.Comm., 98, (761-767).
 158. Hickman, S., y Neufeld, E.F., (1972), Bioch.Biophys.Res. Commun., 49, (992-999).
 159. Hasilik, A., y Neufeld, E.F., (1980), J.Biol.Chem., 255 (4946-4950).
 160. Varki, A., y Kornfeld, S., (1980), J.Biol.Chem., 255, (8398-8401).
 161. Waheed, A., Haheed, A., Hasilik, A., y von Figura, K., (1981), J.Biol.Chem., 256, (5717-5721).
 162. Varki, A., y Kornfeld, S., (1981), J.Biol.Chem., 256, 9937-9943.
 163. Varki, A., y Kornfeld, S., (1980), J.Biol.Chem., 255, (10847-10858).
 164. Goldber, D.E., y Kornfeld, S., (1981), J.Biol.Chem., 256, 13060.
 165. Baker, R., Olsen, K.W., Shape, J.H., y Hill, R.L., (1972), J.Biol.Chem., 247, 7135-7147.
 166. Paulson, J.C., Bernack, W.E., y Hill, R.L., (1977), J.Biol.Chem., 252, (2356-2362).

167. Paulson, J.C., Rearick, J.I., y Hill, F.L., (1977), J.Biol.Chem., 252, (2363-2371).
168. Van den Bijnden, D.H., y Schiphorst, W.H.C.M., (1979), Proc.Fifth.Inter.Symp. on Glycoconjugates. Ed.by R. Schaver, (250-251).
169. Scholtissck, C., (1975), Curr.Top.Microbiol.Immunol., 70, (101-119).
170. Schwarz, R.T., Schmidt, M.F.G., y Datema, R., (1979), Biochem.Soc.Trans., 7, (322-326).
171. Mc Portland, R.C., Wang, M.C., Bloch, A., y Weinfeld, H., (1974), Cancer Res., 34, (3107-3111).
172. Endo, A., Kuroda, M., y Tanzawa, K., (1976), FEBS.Lett., 72, (323-326).
173. Kandutsch, A.A., y Chen, H.W., (1974), J.Biol.Chem., 249, (6507-6601).
174. Sirvert, G., y Strominger, J.L., (1967), Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 57, (767-773).
175. Stone, K.J., y Strominger, J.L., (1971), Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A., 68, (3223-3227).
176. Mescher, M.F., y Strominger, J.L., (1978), FEBS.Lett., 89, (37-41).
177. Wedgwood, J.F., y Strominger, J.L., (1980), J.Biol.Chem., 255, (1120-1123).
178. Spencer, J.C., Kang, M.S., y Elbein, A.D., (1978), Arch.Biochem.Biophys., 190, (829-837).
179. Schwarz, R.T., y Klenk, H.D., (1974), J.Virol., 14, (1023-1034).
180. Datema, R., y Schwarz, R.T., (1979), Biochem.J., 184 (113-123).
181. Kaluza, G., Schmidt, M.F.G., y Scholtissek, (1973), Virology., 54, (179-189).
182. Schmidt, M.F.G., Schwarz, R.T., y Ludwig, H., (1976), J.Virol., 18, 819.
183. Schmidt, M.F.G., y Schwarz, R.T., y Scholittissck, C.,

183. Schmidt, M.F.G., Schwarz, R.T., y Scholtissck, C., (1978), *Eur.J.Biochem*, 70, (55-62).
184. Schwarz, R.T., y Datema, D., (1980), *Tends Biochem.Sci.*, 5, 65-67.
185. Schwarz, R.T., Schmidt, M.F.G., y Lehle, L., (1978), *Eur.J.Biochem.*, 85, 163-172.
186. Datema, R., Pont Lezica, R., Robbins, P.W., y Schwarz, R.T., (1980), *Arch.Biochem.Biophys.*, en prensa.
187. Datema, R., y Schwarz, R.T., (1978), *Eur.J.Biochem.*, 90, (505-516).
188. Schmidt, M.F.G., Biely. P., Kratky, Z., y Schwarz, R. T., (1978), *Eur.J.Biochem.*, 87, (55-68).
189. Datema, R., Schwarz, R.T., y Jankowski, A.W., (1980), *Eur.J.Biochem.*, 109, 331-341.
190. Datema, R., y Schwarz, R.T., observaciones no publicadas.
191. Koch, H.U., Schwarz, R.T., y Scholtissck., (1979), *Eur. J.Biochem.*, 94, (512-522).
192. Friedman, S.J., y Skehan, P., (1980), *Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A.*, 77, (1172-1176).
193. Takatsuki, A., Arima, K., y Tamura, G., *J.Antibiotics.*, 24, (1971), (215-233).
194. Tkacz, J.S., y Lampen, J.O., (1975), *Biochem.Biophys. Res.Commun.*, 65, (248-257).
195. Takatsuki, A., Kohno, K., y Tamura, G., (1975), *Arg. Biol.Chem.*, 39, (2089-2091).
196. Keller, R.K., Boon, D.Y., y Crum, F.C., (1979), *Biochemistry*, 18, (3946-3952).
197. Elbein, A.D., Gafford, J., y Kang, M.S., (1979), *Arch. Biochem.Biophys.*, 196, (311-318).
198. Kang, M.S., Spencer, J.P., Elbein, A.D., (1978), *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 82, 568.
199. Bodanszky, M., Sigler, G.F., Bodanszky, A., (1973), *J.American.Chem.Soc.*, 95, 2352.
200. Elbein, A.D., Solf, R., Dorling, P.R., y Vosbeck, K.,

- (1981), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 78,
(7393-7397).
201. Dorling, P.R., Huxtable, C.R., y Colegate, S.M.,
(1980), Biochem.J., 191, (649-651).
202. Tulsiani, D.R.P., Harris, T.M., y Touster, O., (1982),
J.Biol.Chem., 257, (7936-
203. Elbein, A.D., Dorling, P.R., Vosbeck, K., y Horisberger,
M., (1982), J.Biol.Chem., 257, (1573-1576).
204. Kaluza, G., (1975), J.Virol., 16, (602-612).
205. Shiu, R.P.C., Pouyssegur, J., y Pastan, I., (1977),
Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 74, (3840-3844).
206. Pouyssegur, J., y Yamada, K.M., (1978), Cell, 13,
(139-150).
207. Stark, N.J., y Heath, E.C., (1979), Arch.Biochem.
Biophys., 192, (599-609).
208. Turco, S.J., (1981), Arch.Biochem.Biophys., en prensa.
209. Schwarz, R., y Datema, R., (1981), Adv.Carbohyd.Chem.
Biochem., en prensa.
210. Eylar, H., (1965), J.Theoret.Biol., 10, (89-113).
211. Tarentino, A.L., Plummer, T.H., y Maley, F., (1974),
J.Biol.Chem., 249, (818-824).
212. Trimble, R.B., y Maley, F., (1977), Biochem.Biophys.Res.
Commun., 78, (935-944).
213. Hubbard, S.C., y Ivatt, R.J., (1981), Ann.Rev.Biochem.,
50, 555.
214. Ashwell, G.A., y Morell, A., (1977), Trends.Biochem.Sci.,
2, (76-78).
215. Morell, A.G., Greogoriadis, G., Scheinberg, H., Hickman,
J., y Ashwell, G., (1971), Journal Biol.Chem., 246,
1461.
216. Van den Hamer, C.J.A., Morell, A.G., Scheinberg, I.H.,
Hickman, J., y Ashwell, G., (1970), J.Biol.Chem., 245,
(4397-4402).
217. Price, W.E., y Ashwell, G., (1971), Journal Biol.Chem.,

- 246, 4285.
218. Morell, A., Scheinberg, I.H., (1972), Biochem.Biophys. Res.Comm., 48, 808.
219. Hudgin, R.L., Pircer, W.H., Ashwell, G., Stockert, R.J., Morell, A.G., (1974), J.Biol.Chem., 249, 5536.
220. Kawasaki, T., y Ashwell, G., (1976), J.Biol.Chem., 251, 1296.
221. Kawasaki, T., Ashwell, G., (1976), J.Biol.Chem., 251, 5292.
222. Lunney, J., y Ashwell, G., (1976), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 73, 341.
223. Warren, L., Buck, C.A., y Tuszynski, (1978), Biochim. Biophys.Acta., 516, 97-127.
224. Gibson, R., Schlesinger, S., y Kornfeld, S., (1979), J.Biol.Chem., 254, (3600-3607).
225. Schwarz, R., Rohrschneider, J., y Schmidt, M., (1976), J.Virol., 19, 782.
226. Garoff, H., y Schwarz, R., (1978), Nature, 274, 487.
227. Sahagian, G.G., Dister, J., y Jourdan, G.W., (1981), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 78, (4289-4293).
228. Stoll, J., Robbins, A.R., y Krag, S.S., (1982), Proc. Natl.Acad.Sci., U.S.A., 79, 2296-2300.
229. Stahl, P., Schlesinger, P.H., Rodman, S.J., Doebber, T., (1976), Nature, 264, 86.
230. Baynes, J.W., Wald, F., (1977), J.Biol.Chem., 252, 4402.
231. Achord, D.T., Brot, F.E., Sly, W., (1977), Biochem. Biophys.Res.Comm., 77, 409.
232. Kaplan, A., Achord, D.T., y Sly, W., (1977), Proc.Natl. Acad.Sci., U.S.A., 74, 2026.
233. Higher, R.C., (1977), Nature 269, 288.
234. Day, J.F., Thornburg, R.W., Thorpe, S.R., y Baynes, J. W., (1980), J.Biol.Chem, 255, 2360.
235. Melcher, F., (1973), Biochemistry, 12, 1471.

236. Hickman, S., Kulczichi, A., Lynch, R., y Kornfeld, S., (1977), J.Biol.Chem., 252, 4402.
237. Vasalli, P., Tedghi, P., Bernstein, L.B., Tartakoff, A., y Jatou, J.C., (1979), Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 76, 5515.
238. García, R.C., Recondo, E., y Dankert, M.A., (1974), Eur.J.Biochem., 43, (93-105).
239. Staneloni, R.J., y Leloir, L.F., (1979), Trends Biochem. Sci., 4, (65-67).
240. Waechter, C.J., y Penaraz, W.J., (1976), Ann.Rev.Biochem. 45, (95-112).
241. Behrens, N.H., (1974), Biology and chemistry of eucaryotic cell surface, Lee, E.Y.C. y Smith., Eds. Academic, Press. New York., 159.
242. Mellor, R.B., y Lord, J.M., (1979), Planta, 147, (89-86).
243. Hersting, S., y Schram, M., (1954), Biochem.J., 58, 345-352.
244. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J., (1951), J.Biol.Chem., 193, (265-275).
245. Rugar, A., y Carroll, K.K., (1976), Chemistry and Physics of Lipids, 17, (193-206).
246. Tung, K.K., y Nordin, J.H., (1968), Biochim.Biophys.Acta., 158, (154-156).
247. Paladini, A.C., y Leloir, L.F., (1952), Biochem.J., 51, (426-430).
248. Jeanes, A., Wise, C.S., y Dimler, R.J., (1951), Anal. Chem., 23, (415-420).
249. Behrens, N., y Tabora, E., (1978), Methods in Enzymology, Vol.L., Ed.by Ginsburg, V., Acad Press., New York, (402-435).
250. Thomas, J.A., Schlender, K.K., y Larner, J., (1968), Anal.Biochem., 25, (486-499).

251. Folch, J., Lees, M., y Sloane-Stanley, G.H., (1957), J.Biol.Chem, 226, 497.
252. Parodi, A.J., (1979), J.Biol.Chem., 254, (10051-10060).
253. Li, Y.T., y Li, S.C., (1972), Methods in Enzymology, Ed.Colowick, S.P., y Kaplan, N.O., Vol.28, (702-713), Academic Press., New York.
254. Bahl, Om.P., y Agrawal, K.M.L., (1969), 244, (2970-2978)
255. Kocourek, J., y Ballou, C.E., (1969), J.Bacteriol., 100, (1175-1181).
256. Fales, F.W., (1959), Anal.Chem., 31, (1898-1900).
257. Hakomori, S., (1964), J.Biochem., 55, 205-208.
258. Sandford, P.A., y Conrad, H.E., (1966), Biochem., 5, (1508-1516).
259. Dankert, M.A., Wright, A., Kelley, W.S., y Robbins, P.W., (1966), Arch.Biochem.Biophys., 116, (425-435).
260. Leloir, L.F., Parodi, A.J., y Behrens, N.H., (1971), Rev.Soc.Arg.Biol., 47, (108-116).
261. Bourne, J., Hutson, D.H., y Weigel, H., (1961), J.Chem. Soc., Part.1, (35-38).
262. Recondo, E., Goncalves, I.R.J., y Dankert, M., (1964), 16, 415.
263. Markham, R., y Smith, V.D., (1952), Biochem.J., 52, (552-557).
264. Trevelyan, W.E., Procter, D.P., y Harrison, J.S., (1950), Nature(Lond.), 166, (444-445).
265. Williams, R.J., y Kirby, H., Science, (1948), 107, 481.
266. Bray, G.A., (1960), Anal.Biochem., 1, (279-285).
267. Schwartz, N.B. y Rodén, L. (1974), Carbohydr. Res., 37, (167-180).

268. Cottieb, C., Skinner, A.M. y Kornfeld, S (1974), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 71, (1073-1082).
269. Opheim, D.J. y Touster, O., (1977), J. Biol. Chem. 253, (1017-1023).
270. Couso, R., (1980), Tesis doctoral presentada ante la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.).
271. Parodi, A.J. y Cazzulo, J.J., (1982), J. Biol. Chem. 257, (7641-7645).
272. Tulsiani, D.R.P., Harris, T.M. y Touster, O. (1982) J. Biol. Chem. 257, (7936-7939).
273. Saunier, B., Kilker, R.D., Jr., Tkacz, J.S., Quaroni, A. y Herscovies, A., (1982), J. Biol. Chem., 257, (14155-14161).
274. Datema, R., Romero, P.A., Legler, G. y Schwarz, R.T. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79 (6787-6791).
275. Reitman, M.L., Trowbridge, I.S. y Kornfeld, S., (1982), J. Biol. Chem., 257, (10357-10363).
276. Faltynek, C.P., Silbert, J.E. y Hof. L., (1982), J. Biol. Chem., 257, (5490-5495).
277. Lehle, L. y Schwarz, R.T. (1976), Eur. J. Biochem. 67, (239-245).
278. Datema, R., Pont Lezica, R. y Schwarz, R.T., (some-
tidos para publicación).
279. Datema. R y Schwarz, R.T., (resultados no publica-
dos).