

Tesis de Posgrado

Biosíntesis del manano de pared celular de levadura

Behrens, Nicolás H.

1967

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:

Behrens, Nicolás H.. (1967). Biosíntesis del manano de pared celular de levadura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1301_Behrens.pdf

Cita tipo Chicago:

Behrens, Nicolás H.. "Biosíntesis del manano de pared celular de levadura". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1967.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1301_Behrens.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DEL MANANO DE PARED CELULAR DE LEVADURA

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química

Autor: Nicolás H. Behrens

Director: Dr. Enrique Cabib

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar", 1967.

1301 4
ej. 2

1301

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DEL MANANO DE PARED CELULAR DE LEVADURA

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química

Autor: Nicolás H. Behrens

Director: Dr. Enrique Cabib

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar", 1967.

1301 1
R

RESUMEN

En esta tesis se estudia la biosíntesis del manano, uno de los principales componentes de la pared celular de la levadura.

Se desarrolla una técnica de obtención de la enzima a partir de la descrita por Algranati, Carminatti y Cabib (1). La enzima se prepara reproduciblemente en forma particulada. Este resultado es coherente con el hecho que debe sintetizar un componente estructural de la célula como es el manano en la pared celular.

Dos métodos rápidos de dosaje que se desarrollan, permiten acelerar la obtención de los resultados. Empleando GDP-manosa ^{14}C en la manosa, en el primero se separa el exceso de GDP-manosa ^{14}C del manano ^{14}C formado sometiendo la mezcla de reacción a una electroforesis, mientras que en el segundo se separan por precipitación del manano con etanol 66%.

Mediante gradientes de sacarosa se intenta fraccionar e identificar a la partícula subcelular a la cual se encuentra unida la enzima.

Se estudiaron varias propiedades de la enzima. Se determinó que requiere específicamente Mn^{++} para su actividad. No se pudo detectar un requerimiento de aceptor, de manera que la enzima tendría un aceptor endógeno asociado.

Se estudió la estructura del producto, comparándola con la estructura del manano natural. Se determina que posee las mismas uniones químicas y que la enzima une por lo menos tres manosas en forma consecutiva. Con estos resultados se demuestra que lo que se sintetiza es efectivamente manano.

Como el manano posee tres tipos de uniones químicas en su estructura, $\alpha 1 \rightarrow 6$, $\alpha 1 \rightarrow 2$ y $\alpha 1 \rightarrow 3$, es posible que exista más de una enzima responsable de su síntesis. Se determinó que en la reacción la guanosina aparece

temente se libera como una mezcla de GDP y GMP. Este resultado podría ser explicado por la acción de dos enzimas distintas.

Se estudia algunas propiedades de la unión que mantiene al manano formado por la enzima unido a una partícula subcelular sedimentable, a diferencia del manano purificado, que es perfectamente soluble. Se determina que la unión es muy sensible a cambios del pH y es posible destruirla por acción de enzimas específicas.

El conocimiento del mecanismo de la biosíntesis del manano, junto con los estudios que deberán efectuarse sobre la formación de los demás componentes de la pared celular, podrá servir para llegar finalmente a sintetizar una pared celular in vitro.

A mis padres

A Isabel

Agradecimientos:

Al Dr. Enrique Cabib, por haberme guiado en mis primeros pasos en la investigación bioquímica y haberme transmitido constante y generosamente su experiencia y conocimientos.

Al Dr. Luis Federico Leloir, por haberme permitido realizar esta tesis en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, y en especial a los Drs. Algranati y Carminatti, por su colaboración y críticas.

A la Fundación Rockefeller y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme concedido becas durante el período de esta tesis.

RESUMEN

En esta tesis se estudia la biosíntesis del manano, uno de los principales componentes de la pared celular de la levadura.

Se desarrolla una técnica de obtención de la enzima a partir de la descrita por Algranati, Carminatti y Cabib (1). La enzima se prepara reproduciblemente en forma particulada. Este resultado es coherente con el hecho que debe sintetizar un componente estructural de la célula como es el manano en la pared celular.

Dos métodos rápidos de dosaje que se desarrollan, permiten acelerar la obtención de los resultados. Empleando GDP-manosa ^{14}C en la manosa, en el primero se separa el exceso de GDP-manosa ^{14}C del manano ^{14}C formado sometiendo la mezcla de reacción a una electroforesis, mientras que en el segundo se separan por precipitación del manano con etanol 66%.

Mediante gradientes de sacarosa se intenta fraccionar e identificar a la partícula subcelular a la cual se encuentra unida la enzima.

Se estudiaron varias propiedades de la enzima. Se determinó que requiere específicamente Mn^{++} para su actividad. No se pudo detectar un requerimiento de aceptor, de manera que la enzima tendría un aceptor endógeno asociado.

Se estudió la estructura del producto, comparándola con la estructura del manano natural. Se determina que posee las mismas uniones químicas y que la enzima une por lo menos tres manosas en forma consecutiva. Con estos resultados se demuestra que lo que se sintetiza es efectivamente manano.

Como el manano posee tres tipos de uniones químicas en su estructura, $\alpha 1 \rightarrow 6$, $\alpha 1 \rightarrow 2$ y $\alpha 1 \rightarrow 3$, es posible que exista más de una enzima responsable de su síntesis. Se determinó que en la reacción la guanosina aparen

II

temente se libera como una mezcla de GDP y GMP. Este resultado podría ser explicado por la acción de dos enzimas distintas.

Se estudia algunas propiedades de la unión que mantiene al manano formado por la enzima unido a una partícula subcelular sedimentable, a diferencia del manano purificado, que es perfectamente soluble. Se determinó que la unión es muy sensible a cambios del pH y es posible destruirla por acción de enzimas específicas.

El conocimiento del mecanismo de la biosíntesis del manano, junto con los estudios que deberán efectuarse sobre la formación de los demás componentes de la pared celular, podrá servir para llegar finalmente a sintetizar una pared celular in vitro.

III

I N D I C E

Abreviaturas	1
I. INTRODUCCION	
La célula de <u>Saccharomyces carlsbergensis</u>	2
Composición química de la pared celular de <u>S.Carlsbergensis</u>	4
Estructura del manano	7
Estructura del glucano	10
Ubicación de los componentes de la pared celular	10
Función del manano	17
Biosíntesis de polisacáridos	20
II. METODOS	
Compuestos usados	29
Cultivo y mantenimiento de <u>S.carlsbergensis</u> 74	36
Preparación de la manano sintetasa	36
Dosaje de la manano sintetasa	39
Cromatografía y electroforesis	42
Reducción e hidrólisis de oligosacáridos de manano	43
Separación de manosa de manitol	43
Métodos analíticos	45
III. RESULTADOS	
Preparación de la enzima	48
Localización de la partícula a la cual está asociada la manano sintetasa	62
Propiedades de la enzima	65
Estructura del manano biosintetizado	79
Nucleótido que se libera en la reacción	88
Unión del manano enzimático a partículas	94

IV. DISCUSION	100
V. BIBLIOGRAFIA	115

A B R E V I A T U R A S

GMP	guanosina 5'-mono-fosfato
GDP	guanosina 5'-di-fosfato
ADP-manosa	adenosina di-fosfato D-manosa
P ₁	fosfato inorgánico
PP ₁	pirofosfato
manosa-1-P	manosa α -1-fosfato
EDTA	sal del ácido etilen di-amino tetraacético
Tris	tris hidroximetil amino metano
μ C	micro Curie
μ moles	micro moles
mM	milimolar
UTP	uridina tri-fosfato
GTP	guanosina tri-fosfato
CMP	citidina mono-fosfato
ATP	adenosina tri-fosfato
UDP	uridina di-fosfato
E.C.	extracto calentado
Å	angstrom
cpm	cuentas/minuto
PPO	2,5 - di-feniloxazol
di-metil POPOP	1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno

INTRODUCCION

LA CELULA DE SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS

En la figura 1 se ha dibujado una célula de S.carlsbergensis, basándose en las fotografías al microscopio electrónico de Vitols, North y Linnae (2).

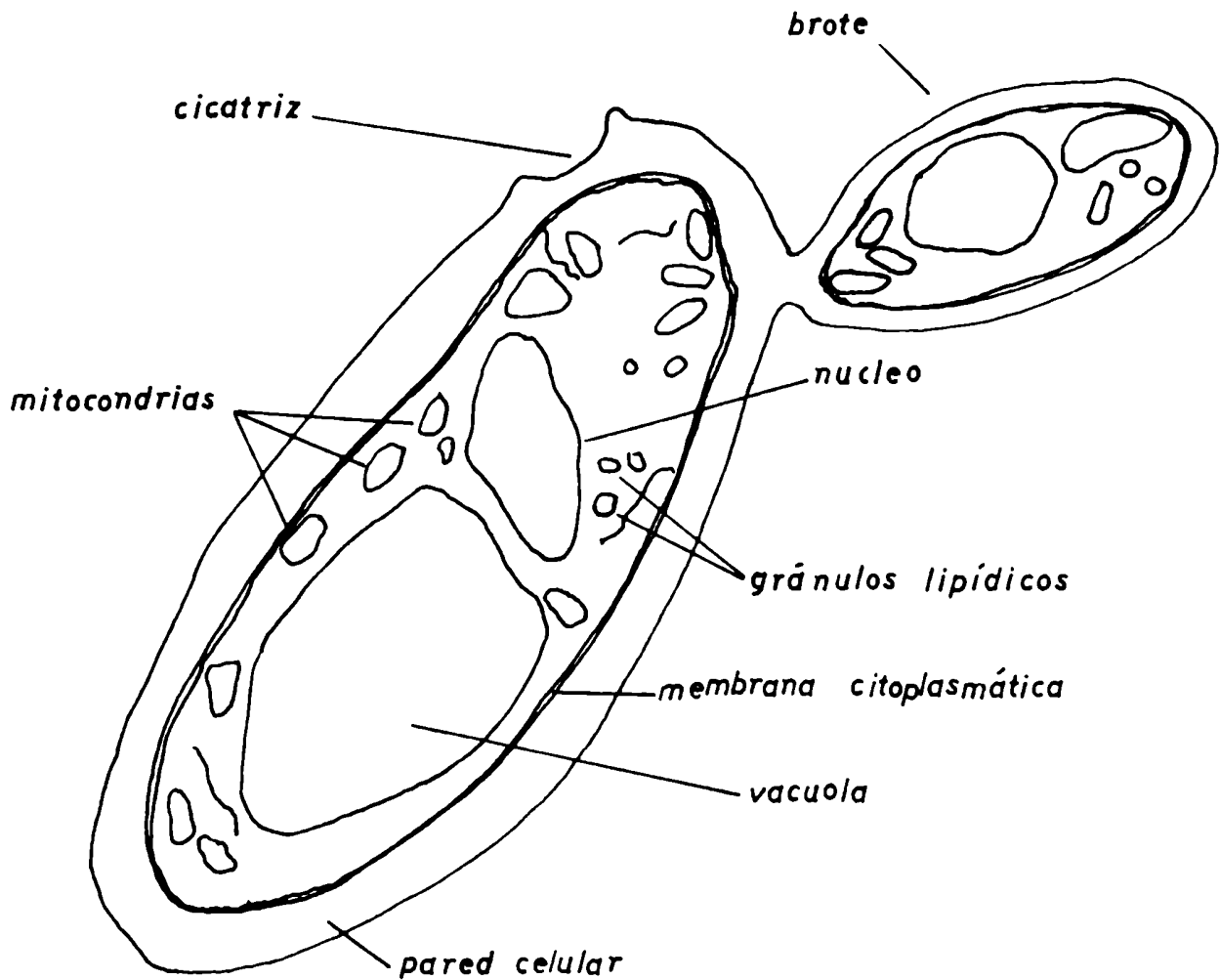


Figura 1: Célula de Saccharomyces carlsbergensis con un brote.

La forma alargada corresponde a la cepa 74 de Saccharomyces carlsbergensis utilizada en esta tesis. Se ha representado con un brote en crecimiento.

Sobre las partículas subcelulares se conoce muy poco. Se han aislado por centrifugación fraccionada mitocondrias (3), paredes celulares (4) y partículas no identificadas (5). Las vacuolas son las organelas de mayor tamaño de las levaduras. Se observan perfectamente al microscopio óptico o con dispositivo de contraste de fases. El núcleo es fácil confundirlo con una vacuola, ya que tiene aproximadamente el mismo tamaño y aspecto. Al microscopio electrónico se lo distingue ya que es electrónicamente más denso que la vacuola.

La membrana citoplasmática parecería ser una membrana unitaria como la define Robertson (6). En ciertas zonas, Moor y Mühlethaler (7) observan dos tipos de formaciones, invaginaciones de la membrana y partículas ordenadas en forma hexagonal. Sugieren que podrían jugar un papel en la biosíntesis de material de la pared.

Se menciona más adelante en esta introducción una hipótesis sobre el mecanismo de formación del brote. Inicialmente ambos citoplasmas estarían conectados, pero al crecer la célula hija, se forma una pared que las separa. Esta zona de unión constituye la cicatriz que en la célula hija se llama cicatriz de nacimiento y en la célula madre cicatriz del brote. En el dibujo se observa que la cicatriz del brote tiene la forma de un cráter. Algunas células llegan a tener hasta 35 de estas formaciones (8). Bacon (9) ha determinado que la cicatriz está constituida en un 50% por quitina.

Además de las cicatrices, la pared celular no presenta ninguna característica morfológica detectable al microscopio electrónico. En células en fase logarítmica tiene un ancho aproximado de 1000 Å. Las células aisladas en fase estacionaria, poseen paredes más gruesas, hecho que se refleja como se verá en los resultados, en una mayor resistencia al ataque enzimático.

COMPOSICION QUIMICA DE LA PARED CELULAR DE SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS

Se han ideado varios métodos para fraccionar químicamente levaduras (10, 11, 12, 13 y 14). Se va a delinear el debido a Trevelyn y Harrison (14), que levemente modificado es uno de los que se aplicó también al estudio de los componentes de la pared celular.

Se tratan las células con ácido tricloroacético 0,5M a 0°C y se extrae así la trehalosa. Luego se tratan con ácido perclórico a 38° y se extrae el RNA (hidrolizado). Un tratamiento con $\text{CO}_3\text{Na}_2\text{O}$, 25M a 100°C extrae el manano y parte del glucógeno. Estos se separarán posteriormente por precipitación específica del manano con Cu^{++} tartrato en medio alcalino (reactivo de Fehling). El resto del glucógeno se extrae con ClO_4H 0,5M a 100°C. Finalmente el residuo que contiene glucano y quitina, se suspende con HONa (queda una suspensión estable, posiblemente parte del glucano se solubilizó (9)). Para la determinación de la composición en paredes ~~de~~ de levaduras, se omite la extracción de trehalosa y de RNA.

Homogeneizando levaduras con un método mecánico y obteniendo las pa redes celulares libres de contaminantes por centrifugación fraccionada, Northcote encontró que la pared celular constituye aproximadamente el 15 por ciento del peso seco de la célula de levadura. Seguramente este dato es un límite inferior, ya que para obtener mayor pureza descartó fraccio nes con trozos de paredes más pequeños. Métodos similares han empleado los demás autores de los datos de composición química de la pared de le vaduras de la tabla I.

Se notan diferencias entre los distintos autores que generalmente no sobrepasan el 20% y que se explican posiblemente porque han usado distin tas cepas.

La mayor parte de la pared está constituida por polisacáridos, exis tiendo cantidades aproximadamente iguales de manano y glucano.

La formación de agregados de células de levaduras que previamente formaban una suspensión homogénea, se denomina floculación. Este fenómeno no está genéticamente controlado y generalmente ocurre acompañado de cambios específicos en la composición del medio de crecimiento (15). Los datos de Mill (12) señalan que en las cepas floculantes y no floculantes que él analiza no hay variación de la relación manano a glucano, cuando se compara paredes de las que no floculan con las que floculan. Sin embargo, Masschelein (16) encuentra que la relación varía entre 1,6 y 5,3 en paredes que no floculan y paredes que floculan. En base a este resultado sugieren que el manano interviene en el proceso de floculación.

El 20% de la N-acetil glucosamina que se determina en la célula entera, se encuentra como quitina en la pared celular. Como se mencionó, interviene en la formación del brote (9).

En ciertas condiciones el porcentaje de N-acetilglucosamina se puede hacer aumentar hasta 30 veces. Eddy cultiva en medio isotónico, protoplastos obtenidos con celulasa de caracol (17). Encuentra que aunque no regeneran células normales, forman paredes débiles que él llama aberrantes y cuyo contenido en N-acetilglucosamina aumenta de 1% en la pared original a 27-33%. El fósforo varía mucho con la especie y la cepa. Eddy (11) demuestra que por lo menos 60% del fosfato se encuentra asociado al manano de tal forma que el álcali que separa el manano de la proteína - no separa al fosfato.

Es interesante el gran número de estructuras diferentes que se obtienen solamente variando la relación manosa a fosfato en el manano. Mientras que en cepas primitivas de *Hansenula* la relación manosa/fosfato baja a 2,5 (18), en *Saccharomyces cerevisiae* la relación oscila entre 13 y 19 (12).

Los lípidos son aparentemente triglicéridos, ya que su contenido en fosfato es muy bajo. No se detectan esteroides.

Tabla I - Composición química de la pared celular de levaduras.

Microorganismo	Hidratos de carbono totales.	manano	glucano	Hexosamina.	Proteínas.	Fosfato	lípidos.	ácidos nucleicos.	glucano soluble
<u>S.cerevisiae</u> (13)	68	34	34	1	6	-	-	-	10
<u>S.cerevisiae</u> (10)	60	31	29	-	13	0,8	8,5	-	-
<u>S.cerevisiae</u> flocculantes (12)	89	43	46	1,1	5	1,0	-	-	-
<u>S.cerevisiae</u> no flocculantes (12)	91	44	47	1,2	6	0,75	-	-	-
<u>S.carlsbergensis</u> 74 (11)	80	22	40	0,9	7	0,5	4	0,3	10

Los datos se expresan en porcentaje de peso seco de pared aislada. Los datos de Nitrógeno que no es debido a glucosamina, se transformaron en proteínas multiplicando por 6,25. El dato de ácido nucleico está determinado por absorción a 260 m μ usando como coeficiente de extinción 9000.

El dato de purinas más pirimidinas es tentativo y en ese orden no se pueden excluir contaminaciones del citoplasma. Su existencia puede ser muy importante ya que podría estar relacionada con síntesis de las proteínas de la pared.

Las proteínas de la pared contienen varios amino ácidos, sobre todo acídicos. En S. carlsbergensis 74 se encontró aspártico, glutámico, serina, glicina, lisina, alanina, treonina, arginina, histidina, prolina, valina, metionina, tirosina, leucina e isoleucina. Aproximadamente el 50 % de la proteína de la pared está asociada al manano (11).

Hay que mencionar la existencia de un glucano soluble. Este se aísla aún con tratamientos muy suaves, como por ejemplo con papaína cristalina (11).

ESTRUCTURA DEL MANANO

Nos referiremos al manano de S. cerevisiae. Varios investigadores estudiaron la estructura del manano por metilación y encontraron que es un polisacárido muy ramificado que contiene uniones $\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$ y $\alpha 1 \rightarrow 6$.

En base a sus resultados de metilación, Haworth y colaboradores propusieron como posibles, estructuras con una cadena fundamental de uniones $\alpha 1 \rightarrow 2$ con cadenas laterales unidas en forma $\alpha 1 \rightarrow 6$ (19 y 20). Una de estas estructuras se esquematizó en la figura 2.

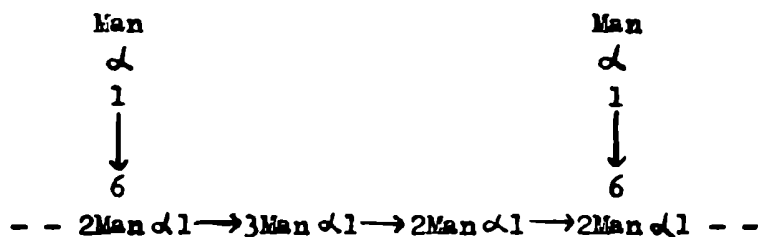


Figura 2. Estructura posible del manano según Haworth et al. (20).

Peat y colaboradores aislaron oligomananos por hidrólisis ácida parcial del manano, que contenían principalmente uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ (21). En conjunto con sus resultados de metilación y de acetólisis del manano, propusieron la siguiente estructura (figura 3):

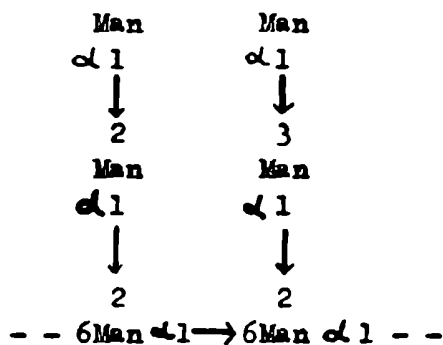


Figura 3: Estructura del manano propuesta por Peat et al. (22)

donde la cadena fundamental está formada ahora por uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ y las cadenas laterales por uniones $\alpha 1 \rightarrow 2$ y $\alpha 1 \rightarrow 3$. Encuentra que las uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ son las más estables al ácido.

Recientemente Lee y Ballou (23) obtuvieron por un método de acetólisis del manano una mezcla de oligosacáridos con un rendimiento del 60 %. Determinan que se trata del disacárido $O-\alpha-D\text{-manopiranosil-(1}\rightarrow 2)\text{-D-manopiranososa}$, del trisacárido $O-\alpha-D\text{-manopiranosil-(1}\rightarrow 2)\text{-O-}\alpha\text{-D-manopiranosil-(1}\rightarrow 2)\text{-D-manopiranososa}$ y además de un tetrasacárido $O-\alpha-D\text{-manopiranosil-(1}\rightarrow 3)\text{-O-}\alpha\text{-D-manopiranosil-(1}\rightarrow 2)\text{-O-}\alpha\text{-D-manopiranosil-(1}\rightarrow 2)\text{-D-manopiranososa}$. Tanto el disacárido como el trisacárido habían sido encontrados por Peat y colaboradores (22) pero no el tetrasacárido. La estructura propuesta por Peat (figura 3) no explicaría la formación de ese tetrasacárido, de manera que Lee y Ballou proponen que la unión $\alpha 1 \rightarrow 3$ se encuentra en una rama lateral de tres manosas, como se muestra en la figura 4.

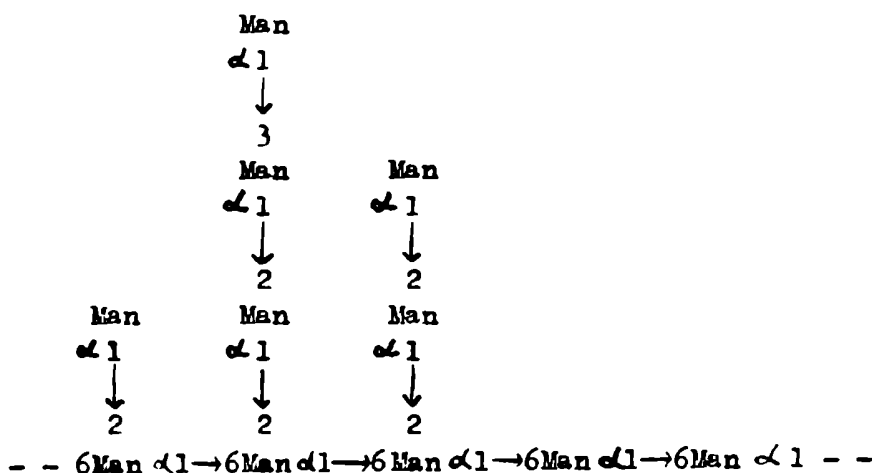


Figura 4 : Estructura del manano según Ballou et al. (23 y 24).

La acetólisis destruye preferentemente las uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ y también algunas de las uniones $\alpha 1 \rightarrow 3$. De esta forma vemos que de izquierda a derecha la primera rama lateral daría el disacárido, la segunda el tetra o el trisacárido según si resistió al ataque la unión $\alpha 1 \rightarrow 3$, y la tercera daría trisacárido. Manosa libre se obtiene de las cadenas fundamentales que no tienen una ramificación, de las uniones $\alpha 1 \rightarrow 3$ que se degradan y de la destrucción que inevitablemente debe producirse de algunas uniones $\alpha 1 \rightarrow 2$. Aplicando una acetólisis en condiciones más suaves (24) encuentran una manopentosa y una mano-hexosa con una unión $\alpha 1 \rightarrow 6$ que someten luego a una segunda acetólisis para determinar los largos de rama de cada lado de las manosas unidas por $\alpha 1 \rightarrow 6$. La acetólisis en estas condiciones no produce ningún tetrasacárido con una unión $\alpha 1 \rightarrow 6$. Estos resultados imponen ciertas restricciones en el tipo de rama lateral que pueden existir y que fueron consideradas en la figura 4.

ESTRUCTURA DEL GLUCANO

El glucano es insoluble en casi cualquier disolvente (Peat, Whelan y Edwards (21) lo disuelven en caliente con ácido fórmico 90%), de tal forma que los métodos usuales de análisis de estructuras se ven seriamente dificultados.

Según Peat, Whelan y Edwards un 10 a 20% serían uniones $\beta 1 \rightarrow 6$ y el resto $\beta 1 \rightarrow 3$. Bell y Northcote (25) habían encontrado también uniones $\beta 1 \rightarrow 2$. Una de las estructuras posibles que surge de los resultados de Peat y colaboradores es la que se representó en la figura 5.

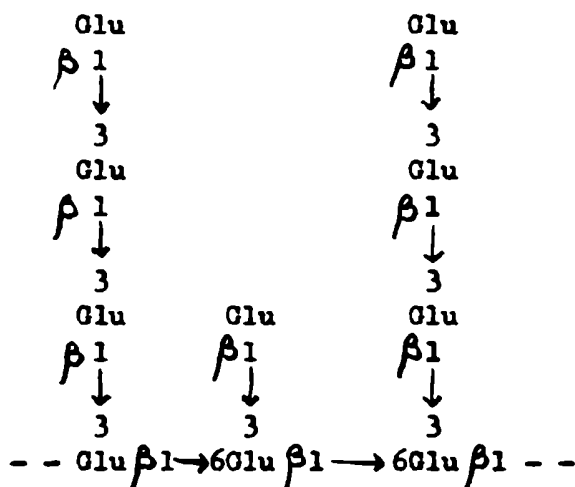


Figura 5: Estructura posible del glucano de levaduras según Peat, Whelan y Edwards. (21)

Bacon y colaboradores describieron recientemente un método relativamente suave de solubilizar al glucano (9). Este resultado facilitará seguramente la determinación de la estructura del glucano con mayor certeza.

UBICACION DE LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

Para determinar la posición del glucano, manano, quitina y proteína

en la pared celular, se ha empleado microscopía de cortes de células, métodos degradativos con enzimas que digieren uno o más componentes de la pared y movilidad electroforética de la pared. Cuando se estudiaron paredes aisladas, se las preparó por métodos mecánicos, generalmente por agitación violenta con perlas de vidrio (10).

Microscopía electrónica de paredes y de cortes de células.

La microscopía de paredes no ha dado resultados concluyentes en cuanto a estructura y posible ubicación de los componentes.

Northcote (10) y Nickerson (26) observan paredes enteras sometidas a diversos tratamientos. Si trata previamente con metanol y éter etílico, Northcote observa dos membranas. La pérdida de lípidos de alguna forma dejaría un espacio libre, y se puede distinguir así dos capas. Si hace lo mismo pero habiendo previamente pretratado con álcali que separa el manano proteína y también los lípidos, sólo observa una membrana. Una modificación similar es observada por Agar y Douglas con un tratamiento con tolueno (27).

Autores que utilizaron OsO_4 para fijar (27, 28 y 29) o que tiñen con periodato-leucofucsina cortes liofilizados (30), observan estructura laminar en la pared. Sin embargo cortes de aparentemente mucho mejor calidad se obtuvieron utilizando permanganato solo o seguido de nitrato de uranio (2 y 31), sin que se observaran láminas o capas en la pared. Con las células fijadas con permanganato se observa frecuentemente una zona límite exterior e interior de las paredes electrónicamente más densa. Esto puede ser debido a la presencia de proteína. El permanganato parece fijarse a la proteína (32). También podría ser que ataque en esa zona a productos de degradación de los polisacáridos de la pared.

Métodos degradativos con enzimas y de movilidad electroforética.

Este enfoque es el que ha dado resultados más interesantes. Los diferentes autores han tratado directamente células enteras o paredes previamente aisladas, con enzimas de distinto grado de pureza.

Eddy realizó un estudio sobre la posible ubicación del manano en la pared. Antes de emplear enzimas degradativas, estudió la carga iónica de las paredes (33). Trabajando con distintas especies de levaduras, encontró que la movilidad electroforética de éstas a distintos pH pueden clasificarse fundamentalmente en dos tipos. En el primero, las levaduras sometidas a un campo eléctrico, migran hacia el ánodo y la movilidad es prácticamente independiente del pH. Este comportamiento lo relaciona a la presencia de grupos fosfato en la pared. En el segundo, la movilidad varía mucho con el pH (aumenta de valores que para algunas especies pueden ser mayores que cero a pH muy ácido, a valores negativos similares al primer caso). Este segundo tipo de movilidad lo relaciona a la presencia de proteína en la superficie. Entre otras estudia también la cepa S. carlsbergensis 74 y encuentra que pertenece al primer tipo, es decir, tiene carga negativa y ésta no varía mayormente con el pH.

Si se crece estas mismas levaduras en medio deficiente en fosfato, la movilidad de las levaduras del tipo primero disminuye mucho. Con cepas de características similares a S. carlsbergensis 74 y crecidas en medio deficiente en fosfato, se encuentra que la curva de movilidad en función del pH se parece más bien a las del segundo tipo. Con las hipótesis propuestas sobre qué le confiere la movilidad, esto querría decir que inicialmente tenía fosfato en la superficie, pero luego de crecer en medio con fosfato limitante, la superficie adquiere características de movilidad del segundo tipo y quedaría entonces con proteína en la superficie. Como es probable que el fosfato forme en mayor o menor grado parte de la estructura del manano (11 y 12), estos resultados indicarían también que el manano se encuentra en la superficie exterior de la pared ce

lular. El hecho que pueda transformarse en una pared con posiblemente una proteína en su superficie, como mencionamos, no contradice lo dicho respecto al manano. Según Nickerson (26) el manano se encuentra en forma de complejo manano-proteína.

El comportamiento que Eddy encuentra para experimentos con paredes aisladas, es exactamente igual al encontrado con células enteras. Supone entonces que la superficie interior de la pared en contacto con la membrana citoplasmática tiene la misma estructura que la exterior. El mismo resultado experimental se obtendría sin embargo, si el compuesto que forma la superficie interior de la pared no tiene carga iónica.

Con tratamientos de paredes aisladas mecánicamente con enzimas cristalinas Eddy confirma los resultados deducidos del comportamiento electroforético. Al tratar con papaína cristalina se libera casi inmediatamente un elevado porcentaje del manano, junto con proteína y con la mayor parte del fósforo que contiene la pared. Este fósforo permanece asociado al manano después de diálisis y aún después de tratar con álcali de manera de separar la proteína del manano. Del tratamiento con papaína queda un residuo que por hidrólisis libera casi exclusivamente glucosa y sería glucano. Al microscopio conserva la forma original de la pared. El glucano formaría entonces la estructura fundamental que le otorga rigidez mecánica a la pared celular. Una parte del glucano se disuelve al tratar con papaína, de manera que éste podría tener otra función en la pared, diferente a la del que es resistente a la enzima.

Bacon y colaboradores (34), describen una enzima de mixobacterias de actividad β -glucanasa que se libera al medio de cultivo cuando éstas crecen con levaduras como única fuente de carbono. A una suspensión de levaduras o de paredes aisladas de levaduras, y sometidas a diversos tratamientos la tratan con esta enzima de mixobacteria. Luego centrifugan y determinan en sobrenadante y sedimento material que de reacción positiva al re

activo de la antrona (reacción de hidratos de carbono). Complementa esta determinación con una observación al microscopio. Tanto las paredes aisladas como las células enteras permanecen sin atacar a menos que previamente hayan sido calentadas en autoclave. También se produce ataque en el caso de las paredes si previamente se las trata con un reactivo de tioles, p.e., el mercaptoetanol. Este tratamiento no tiene efecto en las células enteras. Otra manera de sensibilizar al ataque enzimático es antes de tratar con el reactivo de tioles, pretratar con tolueno u otro solvente orgánico.

Estos resultados le sugieren a Bacon un esquema de la estructura de la pared celular. La pared consistiría en tres capas o membranas:

- 1) la primera estaría constituida por una manano-proteína. Esta proteína tiene grupos di-sulfuro. La manano-proteína es la que impide que la enzima de mixobacterias actúe sobre el glucano. Esta protección se pierde en el caso del reactivo de tioles, porque los puentes di-sulfuro de la proteína se reducen; en el caso del calentamiento en autoclave, porque la proteína se desnaturaliza.
- 2) Las células enteras, aún libradas de esta capa de manano-proteína, tienen una adicional. Esta es la que se destruye por la acción del tolueno o metanol más éter etílico. Descarta que puede ser una capa de quitina porque la enzima de mixobacterias contiene además de la β -glucanasa, una quitinasa activa. Hay dos trabajos (10 y 35) de microscopía electrónica, en los cuales se observan dos capas en paredes enteras; después de tratar con solventes orgánicos, esta separación en dos capas desaparece pudiéndose observar luego sólo una.
- 3) Por último, tendríamos la red de glucano. Cuando el pretratamiento le permite, la enzima de mixobacterias actuaría sobre este polisacárido.

El hecho de que son necesarios pretratamientos para llegar a atacar el glucano, indicaría que éste se encuentra en una zona interior de la pared. Wickerham (18) propone que la unión de la invertasa al manano, a pe-

gar de ser tan fuerte que aun la enzima purificada sigue conteniendo manano, es casual. Al ser excretada la enzima del citoplasma, quedaría atrapada en la primer zona de la pared por el manano. Piensa que otras proteínas también se unirían fácilmente al manano, pero no con una unión tan estable como la invertasa. Si esta hipótesis fuese correcta, las enzimas de mixobacterias podrían quedar atrapadas, por el manano, pero del lado exterior de la pared de la célula entera. Cuando se trata de paredes aisladas, vimos que se proponía una cierta simetría en la estructura de la pared en el sentido que el manano proteína estaría por igual en la superficie exterior como en la interior. Estaría así también protegido el glucano de la acción degradativa en las paredes aisladas.

Recientemente Lampen y colaboradores (36) purificaron de B. subtilis un factor no dializable que podría ser una enzima. Tiene un efecto muy interesante sobre células de levaduras viables. Lampen utiliza en su trabajo además el jugo intestinal del caracol que usamos nosotros para preparar la manano sintetasa. Lo utiliza sin embargo en una concentración mucho menor. En esas condiciones afirma que el jugo de caracol solo, no disuelve la pared. Un pretratamiento con el factor de B. subtilis, permite sin embargo a esa concentración baja de jugo de caracol disolver la pared. Encuentra que el efecto de este factor es similar al del β -mercaptoetanol que mencionamos anteriormente, en cuanto a que ambos liberan manano e invertasa de las levaduras. Además ambos permiten que se lisen las levaduras con concentraciones bajas de jugo intestinal de caracol. El factor posee una propiedad adicional. Es capaz de lisar células pretratadas con mercaptoetanol. Lo inverso, es decir que el mercaptoetanol después de un pretratamiento con el factor lise, no ocurre. Este resultado es interesante ya que en condiciones en que no se libera glucosa del glucano, se puede producir lisis de las células. Este resultado contradice la hipótesis aceptada por muchos de que el glucano sólo podría mantener la estructura de la pared. Hay que mencionar que Lampen no parece haber

hecho observaciones al microscopio; mide la lisis por la disminución de la turbidez de la suspensión en espectrocolorímetro. Un resultado tan importante tendrá entonces que ser confirmado, ya que una rotura en un solo punto de la membrana citoplasmática con la pérdida del material intracelular produciría una disminución similar de la turbidez sin modificación apreciable de la pared celular.

Además estos resultados parecerían indicar que existen dos mananos. Uno es atacado por el factor de Rsubtilis solamente, en cambio el otro es sensible al factor pero también al mercaptoetanol.

En otro trabajo, Bacon y colaboradores (9) encuentran que el glucano modifica radicalmente sus propiedades de solubilidad, si es pretratado con acetato de Na a pH 5 a 75°C. Tratando así células de levadura liberadas previamente de la manano-proteína con tratamiento alcalino, obtiene un residuo con mucho menos glucano. Este residuo contiene un 50% de quitina y observado al microscopio electrónico tiene el aspecto de cicatrices de brotes unidas por una fina membrana. Esta membrana que une las cicatrices se hace aun más delgada, si trata el residuo posteriormente con la β -glucanasa de mixobacterias que mencionamos anteriormente. La quitina formaría entonces la cicatriz del brote. Hay que mencionar que no se ha descrito la enzima que biosintetice a la quitina en pared de levaduras. Como esta debe formarse a medida que crece el brote, una curva de actividad de la quitina sintetasa (en un cultivo sincrónico) deberá ser de la misma forma que la que se obtiene de representar número de células brotando. No se conoce qué función tiene la acetil-glucosamina fácilmente extraíble por álcali, en la pared. A la quitina misma, corresponde un 10-20% de la acetil glucosamina de la pared (33).

A pesar que el número de compuestos que se han descrito en la pared de levadura es menor que en bacterias, surge de estos primeros resultados que se conoce mucho menos de la ubicación y función de cada componente en la levadura.

FUNCION DEL MANANO

En su revista de los últimos progresos en el campo de los polisacáridos, Sharon (37) menciona que los polisacáridos simples o compuestos - pueden servir como: 1) material estructural y de protección, 2) compuestos de reserva energética, 3) sustancias lubricantes y 4) sustancias que actúan en el control del transporte de agua y metabolitos en fluidos extracelulares.

El manano de pared celular de levaduras, como también los otros mananos conocidos, son polisacáridos de los cuales poco se sabe, de manera que resulta difícil encasillarlos en una o varias de las funciones mencionadas.

Si se considera los distintos mananos existentes en la naturaleza, es posible que cumplan funciones distintas, ya que difieren apreciablemente en sus estructuras químicas (como también en su ubicación en la célula o fuera de ella).

Al manano de pared celular de levaduras, varios autores le asignan carácter estructural. Sin embargo el hecho de ser fácilmente extraíble en forma soluble, indica que, o es una estructura muy delicada o cumple una función asociada a otro componente estructural (posiblemente el glucano).

La prueba de Bacny y colaboradores (34) de la inaccesibilidad del glucano debido a la posible presencia de una manano proteína, indicaría que el manano forma una membrana de la pared. Muchos autores parecen asignarle carácter estructural simplemente porque se encuentra en la pared. Sus propiedades de formar una goma cuando se lo aísla, indujo a pensar que podría actuar físicamente a manera de un cemento.

Debido a que no está resuelto el problema de la función, incluimos algunas postuladas para mananos en otros microorganismos. Algunas de estas podría resultar la clave de la función del manano en S. carlsbergensis -

sis y géneros relacionados de la familia Saccharomyces.

El carácter estructural del manano se ha mencionado al estudiarse la ubicación de los diferentes componentes en la pared celular y no se va a mencionar aquí.

Componente esencial del mecanismo de división celular.

Nickerson y Falcone (38) describen en Candida albicans una enzima mitocondrial con actividad "puente di-sulfuro" reductasa. Demuestran además que mutantes que crecen casi indefinidamente ("divisionless mutants"), no tienen esta enzima. Un manano-proteína que contiene puentes di-sulfuro (39) es sustrato para esta enzima. Por otro lado, microfotografías, tomadas en forma secuencial del proceso de formación de un brote (26) parecen mostrar que súbitamente es expelido una parte del protoplasto debido a un debilitamiento localizado de la pared. Se observa seguidamente que comienza a formarse alrededor del protoplasto que había quedado desnudo, una nueva pared celular.

Varios autores han mostrado en el microscopio electrónico una acumulación de mitocondrias en la zona próxima al brote. Estos hechos indujeron a Nickerson (26) a proponer que los puentes di-sulfuro de la manano proteína serían los que le dan rigidez a la pared y que la di-sulfuro reductasa actuando sobre estos grupos sería la responsable de debiliar la pared. En ese lugar entonces, se produciría la explosiva salida de una porción del citoplasma.

Factor aglutinante

Brook (40) estudia dos cepas de levaduras que conjugan sexualmente con aglutinación. De una de estas cepas aísla un factor que llama factor sexual. Si al medio en el cual se quiere producir aglutinación de esas dos cepas se agrega previamente el factor sexual, esta aglutinación se inhibe. Purifica este factor por absorción y posterior elución de la cepa se

rual opuesta. Encuentra que se trata de una manano protefina, que en formas de bajo peso molecular ubica en el citoplasma. Esta manano protefina, estaría en la superficie de la pared de una de las cepas. Durante el proceso de aglutinación no pudo determinar un aumento del contenido de manano (44).

Factor floculante.

En cepas que floculan, algunas células lo hacen mientras otras no. Masschelein y colaboradores (16) encuentran que en células de S. carlsbergensis que floculan, el contenido de manano está aumentado. En cambio Mill (12) en S. cerevisiae encuentra que no hay cambio en el contenido de manano sino en el grado de fosforilación del mismo. Hay que mencionar que Wickerham (18) sugiere que los fosfomananos extracelulares que producen varias especies de Hansenula, servirían para que éstas se adhieran a las plantas sobre las cuales crecen.

Componente de la invertasa

La invertasa aun purificada 60 veces contiene una cantidad fija de manano. Parece contener también glucosamina (42). La enzima se encuentra en el espacio entre la membrana citoplasmática y la pared celular de tal forma que se libera al medio a medida que se van formando los protoplastos (43).

Wickerham (18) sugiere que la unión al manano es casual y común a otras proteínas aunque no tan fuerte. Se produce al ser excretada la enzima del citoplasma.

Los resultados de estudios de las paredes de levaduras y sus componentes, indican la importancia del manano en estas estructuras. Vimos que constituye un 33% del peso seco de las paredes y que se han postulado varias posibles funciones. Como se explica más adelante en esta introducción, el interés en los estudios de biosíntesis, parece evolucionar hacia el estudio de estructuras subcelulares complejas. Se han iniciado estudios de la biosíntesis del gránulo de almidón (44), del glucógeno particulado hepático (45) y de la pared celular de bacterias (46 y 37).

Con el objetivo final de llegar a conocer el mecanismo de la biosíntesis de la pared celular de levaduras, se decidió estudiar primero la biosíntesis del manano. Esta biosíntesis constituye el tema de esta tesis.

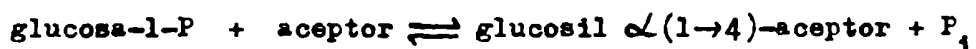
BIOSINTESIS DE POLISACARIDOS

En 1898, Croft Hill (47) obtuvo síntesis de disacárido, incubando maltasa de levadura con glucosa. A pesar de que las concentraciones de glucosa superaban en varios órdenes de magnitud a las fisiológicas, se tuvo que aceptar este camino como único plausible hasta que en 1939 Cori, Schmidt y Cori (48), y Kiessling (49) obtuvieron incorporación al glucógeno a partir de glucosa - 1-P. Esta biosíntesis se obtuvo con concentraciones del éster fosfórico suficientemente bajas como para poder ser fisiológicas.

La transglicosidación a partir de azúcares fosfatos catalizada por enzimas que se llamó fosforilasas, pareció entonces ser el mecanismo por el cual se efectuaba la síntesis de polisacáridos. Esta idea se vio afirmada cuando se descubrieron fosforilasas (50) que sintetizan disacáridos. Sin embargo, este camino no prosperó, y no se encontró ninguna fosforilasa además de la del glucógeno que sintetizara un polisacárido. Es más, sólo se han descrito desde entonces, las siguientes fosforilasas: la de glucógeno o almidón, de sacarosa, de maltosa, de cellobiosa, de laminari

biosa (51) y de β -1 \rightarrow 3 oligosacáridos de glucosa (52).

A pesar de esto, en el caso de la biosíntesis de glucógeno por la fosforilasa, se llegó a descartar este camino recién cuando se encontró y demostró otro (53). Había en aquel entonces varios hechos experimentales que la fosforilasa no explicaba. La reacción se puede escribir:



El equilibrio de la reacción está determinado por el cociente de las concentraciones de fosfato inorgánico a Glucosa-1-P y por el pH. A pH7 se establece el equilibrio con un valor del cociente de concentraciones de fosfato inorgánico a glucosa-1-P igual a 3,2. Con cocientes menores hay síntesis de glucógeno y con cocientes mayores hay degradación. En los tejidos el cociente es siempre mayor que 3,2 por ejemplo: en el diafragma de rata es igual a 300 (54). Partidarios de la fosforilasa como enzima anabólica trataron de invalidar esta contradicción diciendo que podría existir un compartimiento en el cual la concentración de P_1 fuera baja y de que ahí se llevaría a cabo la síntesis de glucógeno. Pero esta hipótesis parece poco probable ya que la fosforilasa se extrae siempre en forma soluble de la célula. También el efecto de la adrenalina dio resultados que no se podía explicar suponiendo que la fosforilasa sintetizara glucógeno. Sutherland y Cori (55) encontraron que esta hormona que se sabía produce degradación de glucógeno hepático, aumentaba la actividad de la fosforilasa. Resultados similares se obtuvieron con glucagón, es decir, un aumento paralelo de glucogenólisis y de actividad de fosforilasa. Fue difícil explicar cómo, si la fosforilasa es la encargada de sintetizar el glucógeno, su aumento se produzca siempre cuando hay glucogenólisis.

Estos problemas unidos al hecho mencionado de la imposibilidad de encontrar fosforilasas que sinteticen otros polisacáridos, se resolvieron - cuando se descubrió una nueva vía de biosíntesis de polisacáridos a par -

tir de nucleótidos - azúcares.

En 1949 Leloir y colaboradores (56 y 57) estudiando el metabolismo de galactosa en levaduras, descubrieron el UDP-glucosa, primer nucleóti do-azúcar de una familia de compuestos que hoy sobrepasa los cincuen ta (58). En la figura 6 está representada la estructura del UDP-glucosa.

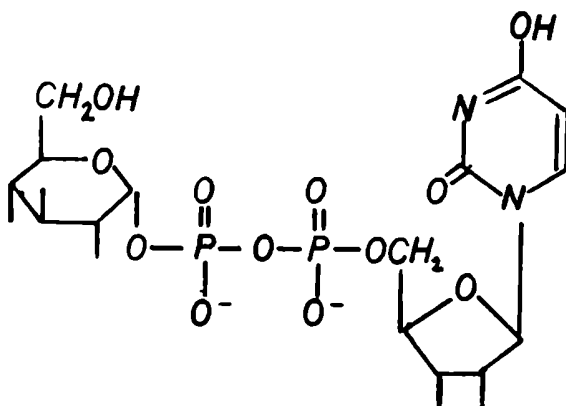


Figura 6: Estructura del UDP-glucosa

Inicialmente se descubrieron reacciones en las cuales el azúcar uni do al nucleótido era transformado en otro. Por ejemplo se encontró que la glucosa, unida al UDP, es transformada en galactosa en presencia de una enzima de levadura (59). Dutton y Storey (60) describieron la formación de un glicósido, el β -o-amino fenol glucurónico y Glaser y Brown (61) la primera síntesis de un polisacárido, el ácido hialurónico a partir de UDP-glucurónico.

Posteriormente Leloir y Cabib (62) encontraron una enzima de levadu ras que catalizaba la síntesis de la trehalosa-fosfato:



Niemeyer (63) analizó las contradicciones mencionadas que se ope -- nían al papel de la fosforilasa en la síntesis de glucógeno y sugirió al

UDP-glucosa como sustrato para una enzima que sintetizaría glucógeno. Le-
loir y Cardini (64) encontraron en hígado de rata, una enzima que catali-
zaba la reacción de síntesis de glucógeno según:



que luego se describió en varios tejidos más (65). Muchas de las propieda-
des de esta enzima, que se llamó glucógeno sintetasa, son idénticas a las
de la fosforilasa. Ambas adicionan uniones glucosilo $\alpha 1 \rightarrow 4$ y ambas re-
quieren un aceptor de alto peso molecular, siendo el glucógeno el mejor a
ceptor para las dos.

Es importante destacar sin embargo, que difieren mucho las posicio-
nes de equilibrio de las reacciones que catalizan estas enzimas. Como men-
cionamos, el sentido de la reacción de la fosforilasa se modifica varian-
do el cociente de concentración de glucosa-1-P y P_i . En cambio todas las
experiencias para demostrar reacción en sentido de la degradación con la
glucógeno sintetasa, han fracasado (53) de manera que el equilibrio de es-
ta última reacción se encuentra completamente desplazado en el sentido de
la síntesis.

Esto se debe en parte a que la energía de hidrólisis del UDP-glucosa
es casi el doble a la de la glucosa-1-P. De esta manera la formación de u-
nión glicosídica a partir del nucleótido-azúcar es termodinámicamente más
favorable que a partir del éster fosfórico. En la figura 7 están represen-
tados datos de energías libres de hidrólisis.

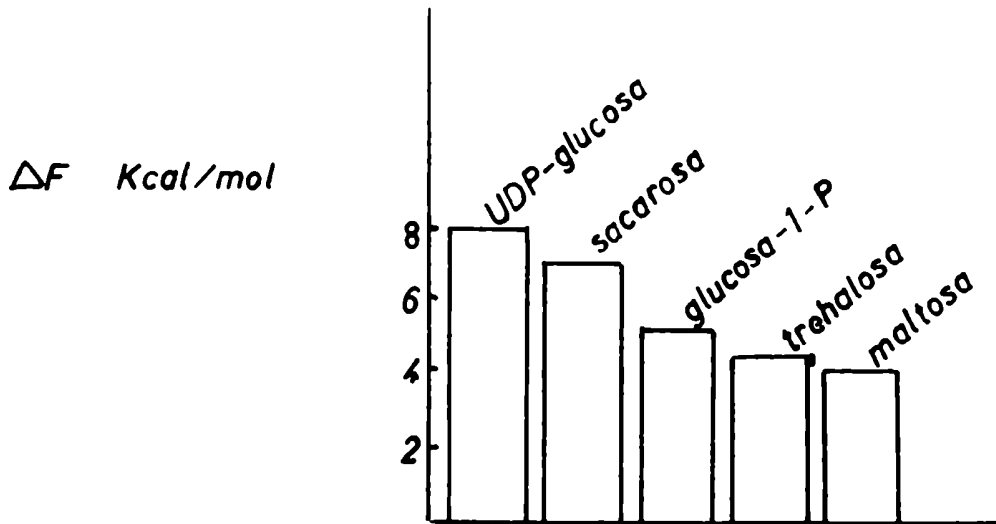


Figura 7: Energía libre de hidrólisis de distintos sustratos para la formación de la unión glicosídica (datos de Neufeld y Hassid)(66)

Una propiedad importante que surgió recién después de descubiertas muchas de las reacciones biosintéticas con nucleótidos-azúcares es que al existir las distintas bases púricas y pirimidínicas, existía la posibilidad de sintetizar varios polisacáridos del mismo azúcar al mismo tiempo. Se puede incluso regular separadamente la formación de cada uno. En la figura 8 está esquematizada la formación de tres polisacáridos de plantas, siempre a partir de glucosa-1-P.

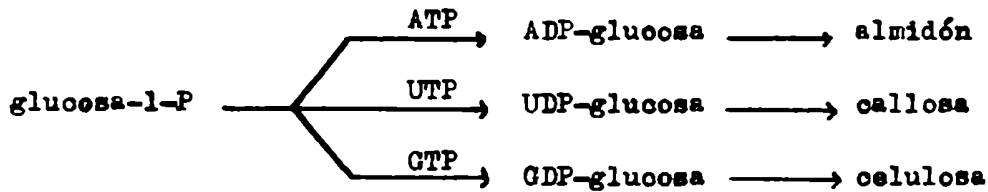
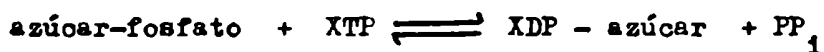


Figura 8: Formación en plantas, de diferentes polisacáridos del mismo precursor.

Cabib (67) imagina la base del nucleótido como un punto de apoyo apropiado que puede fijarse a la enzima para poder luego esta transformar

o transferir el azúcar.

El camino de biosíntesis a través de nucleótidos-azúcares se vale casi siempre de las mismas reacciones



Han surgido algunas pocas excepciones. Se encontró (68) que el ácido siálico se activa a CMP-siálico, o sea al nucleótido monofosfato. Se ñala sin embargo Leloir (69) que esto no disminuye apreciablemente la energía de unión para la transferencia y se encuentra que el mecanismo es común a otros azúcares ácidos. En un nucleótido di-fosfato azúcar la unión hemiacetal se encuentra próxima a dos grupos fosfatos y en el CMP-siálico, se encuentra próxima a un fosfato y a un carbóxido.

También de la segunda etapa, la transferencia al aceptor, se han encontrado excepciones al mecanismo general. En algunos casos, el azúcar se transfiere como azúcar-fosfato, liberándose el nucleótido como monofosfato. El azúcar fosfato se incorpora como tal en los polisacáridos que tienen fosfato en su estructura como son los ácidos teicóicos (70 y 71) o el azúcar fosfato es transferido a un intermediario liposoluble, para ser luego transferido a un aceptor, quedando en este caso el fosfato con el intermediario (72 y 73). Este punto se verá más detalladamente en la discusión.

Se puede decir entonces que las biosíntesis de los polisacáridos que no han sido descritas aún, seguramente se efectúan en la gran mayoría de los casos por transferencia del azúcar de un nucleótido. El interés actual parece desplazarse hacia el estudio de la regulación del nivel intracelular de los polisacáridos de reserva y hacia la formación, estudiada al nivel molecular, de estructuras celulares como ser la pared celular.

Antecedentes en la biosíntesis del manano.

En 1954 se descubrió en S.cerevisiae un nuevo nucleótido azúcar, el GDP-manosa (74), cuya estructura se ha esquematizado en la figura 9.

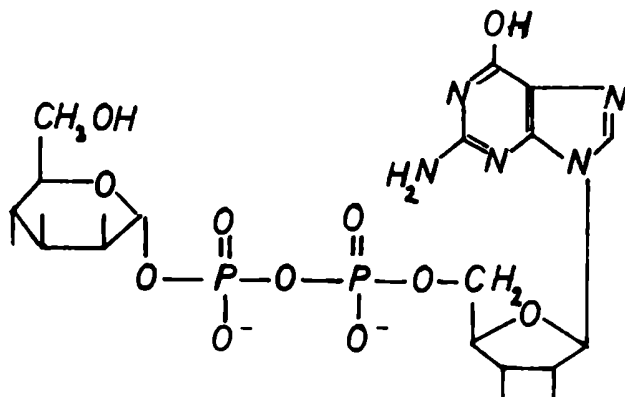


Figura 9: Estructura del GDP-manosa.

Los autores propusieron en este trabajo al GDP-manosa como precursor del manano de pared celular de la levadura.

En 1956 Munch-Petersen (75) describió la biosíntesis del GDP-manosa en levaduras a partir de manosa-1-fosfato según la reacción:



Como en las otras pirofosforilasas, nombre que se le da corrientemente a las nucleótido-azúcar-sintetasas, esta reacción tiene una constante de equilibrio aproximadamente igual a 1. Sin embargo nota Kornberg (76) que *in vivo* no parece funcionar más que en el sentido de la biosíntesis del nucleótido-azúcar.

Cabib y colaboradores (1) encontraron incorporación de radioactividad en un compuesto de propiedades similares al manano, incubando GDP-manosa, marcado con ¹⁴C en la manosa, con un extracto enzimático de levadura.

Los trabajos de Cabib y Leloir (74) y de Algranati, Carminatti y Cabib (1), sirven de punto de partida para el estudio de la enzima que bio-

sintetiza al manano. Este estudio deberá complementarse con el de los demás componentes de la pared celular, el glucano, la quitina y también la proteína (no existe caso conocido de síntesis de proteína del lado externo de la membrana citoplasmática), para poder llegar eventualmente a sintetizar la pared celular in vitro.

M E T O D O S

COMPUESTOS USADOS

Los compuestos no radioactivos que no se mencionan aquí, fueron obtenidos en el comercio.

GDP y GMP se obtuvieron de Sigma Chemical Co., EE.UU.

GMP-³H se adquirió a Bioschwarz.

GDP-manosa fue extraído de levadura según Pontis, Cabib y Leloir (77).

Manosa-1-P se obtuvo de manosa según las técnicas de Ashwell (78) y de Mac Donald (79).

Manosa-1-P-¹⁴C se obtuvo de la misma forma, utilizando manosa ¹⁴C de Calbiochem.

GDP-manosa ¹⁴C en la manosa. Se obtuvo según una técnica de Khorana (80 y 81) modificada según Recondo y colaboradores (82). El producto se purificó por cromatografía con los solventes B y A, (ver más adelante), lavando cada vez el papel antes de la elución con etanol absoluto, para eliminar el acetato de amonio. Posteriormente se pasó el GDP manosa por una columna de resina Dowex 50 forma hidrógeno, neutralizando luego a pH 6,5 con HOK. Este tratamiento adicional se adoptó porque se observó que se separa del GDP-manosa un inhibidor de la manano sintetasa, posiblemente proveniente del papel de cromatografía.

GDP-manosa ³H en la guanosina. Aplicando la técnica de Khorana usada en la preparación de GDP-manosa ¹⁴C, se encontró que se perdía la mayor parte de la radioactividad. El GMP-³H de Bioschwarz debe estar tritiado en posiciones que aunque a temperatura ambiente no intercambian con los H⁺ del medio, apenas se eleva la temperatura como exige la técnica intercambian rápidamente reemplazándose el ³H por ¹H. Se comprobó que el intercambio no era debido a los reactivos ni al pH sino únicamente a la temperatura. Se ensayó entonces la síntesis de la primera etapa, el GMP mor

folidato, a una temperatura menor, determinando al mismo tiempo radioactividad específica y rendimiento de la síntesis. El GMP-morfolidato se separó del GMP sin reaccionar, por electroforesis con el solvente G (ver más abajo).

En la figura 10 se observa que disminuyendo la temperatura del baño en el que se efectúa la síntesis de morfolidato, de 100° a 80°, a las 4.30 horas se había sintetizado algo más que la mitad de GMP-morfolidato. Por otra parte a 100° la actividad específica había caído a cero mientras que a 80° cayó a un valor alrededor del 50%. No se ensayó el efecto de la temperatura sobre el rendimiento en la técnica original de Khorana (80).

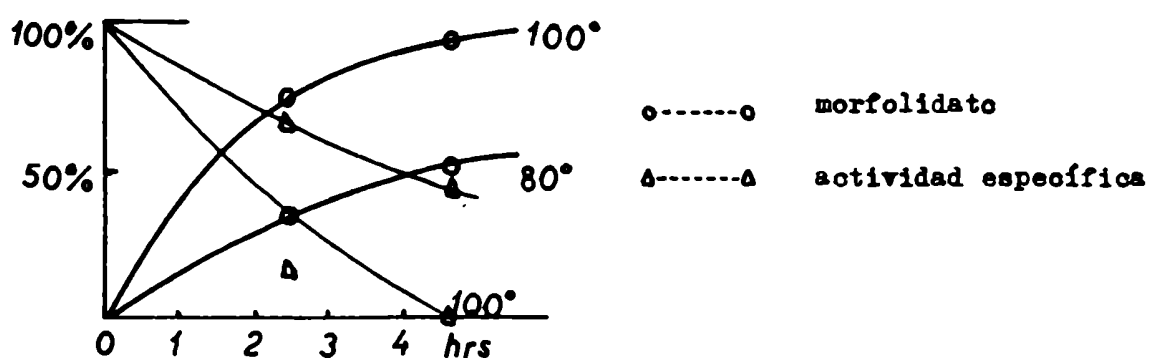


Figura 10: Intercambio de ^3H con ^1H al calentar GMP- ^3H . Se toman muestras a distintos tiempos y se mide semicuantitativamente la conversión del GMP en morfolidato por separación en electroforesis con carbonato (electrolito G, ver más adelante), y la radioactividad remanente.

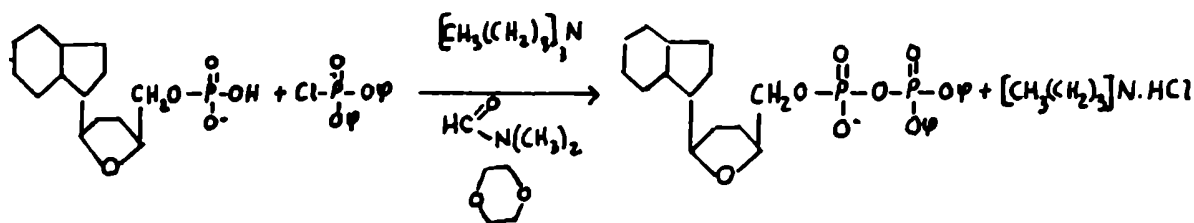
Como esta técnica utilizada a 80° daría rendimientos tanto de radioactividad como de intermediario (GMP-morfolidato) excesivamente bajos, se decidió ensayar un método general descrito por Michelson (83) adaptándolo para la preparación de GDP-manosa radioactivo. En esta técnica todas las reacciones se efectúan a temperatura ambiente y el rendimiento es igual o superior al de Khorana.

Técnica modificada de Michelson de preparación de GDP-manosa- ^3H .

A partir de GMP sal de Na, se prepara GMP ácido libre, por pasaje a

través de una columna de Dowex 50 forma H^+ . Se lava la columna hasta neutralidad y luego con un 10% más del volumen de agua usado.

Se mezclan luego 0,35 mC (0,35 μ moles) de GMP^3H sal de NH_4^+ con 20 μ moles de GMP ácido libre. Se evapora a sequedad a presión reducida y temperatura ambiente (todas las evaporaciones subsiguientes se efectúan en estas condiciones) y se evapora 3 veces con CH_3OH anhidro (84). Se suspende en 0,14 ml de CH_3OH anhidro y se agregan 0,01 ml de tri-*n*-octilamina. Se calienta por tiempos cortos con agua a 80° , con un refrigerante a reflujo, enfriando inmediatamente después de cada calentamiento. Después de haber calentado aproximadamente un minuto en total, se observa que la mayor parte del material se ha disuelto. Se evapora. Se toma y vuelve a evaporar cinco veces con *N-N'*-dimetil formamida. Se toma con 0,1 ml de *N-N'*-di-metilformamida y 0,14 ml de dioxano y se agregan 0,01 ml de difenil fosforil cloruro y 0,01 ml de tri-*n*-butilamina. Se deja en atmósfera seca $2\frac{1}{2}$ h a $30^\circ C$ y 40 h a $4^\circ C$. En la primera $1\frac{1}{2}$ h se observa que parte del material que no se había disuelto inicialmente pasa a solución. La reacción que ocurre es:



Se detiene la reacción precipitando el difenil-GDP con 0,5 ml de éter seco. Se deja 3 h en desecador a $0^\circ C$. Se decanta el éter. Se toma y evapora 6 veces con dioxano anhidro. La radioactividad soluble en dioxano corresponde al di-fenil-GDP formado (el GMP que no reaccionó es insoluble en dioxano).

Por otro lado se pesan 80 mg de manosa-1-P sal de ciclohexolamonio, se disuelve en agua, y se pasa por una columna de 0,6 x 7 cm de Dowex 50 forma H⁺. Se lava hasta que el eluido sale a pH 6,8. Se neutraliza con piridina. Se evapora a sequedad. Se agregan 0,1 ml de tri-n-butilamina y piridina y se vuelve a evaporar. Se repite dos veces la evaporación con piridina. Se toma con 0,10 ml de piridina.

Se toma el di-fenil-GDP con 0,065 ml de dioxano y 0,05 ml de piridina (que completa la disolución) y se agrega la manosa-1-P en los 0,1 ml de piridina. La condensación se lleva a cabo en atmósfera seca 3½ h a 30°C.

Para purificar el GDP-manosa, se siembra la mezcla de reacción directamente sobre un papel Whatman 3 MM, lavando el tubo de reacción primero con dioxano y finalmente con agua. Se somete a la misma purificación del que se empleó para el GDPM¹⁴C.

En la tabla II se comparan los rendimientos del método de Michelson con el de Khorana. Se observa que con el primero se conserva la radioactividad específica, aunque en ese experimento dio un rendimiento mi tad que el de Khorana.

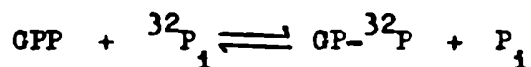
Tabla II - Rendimientos en la síntesis de GDP-manosa por dos técnicas.

Método	rendimiento en el GDP-manosa ³ H	
	μ moles %	desintegraciones/min. %
(A)	30	4
(B)	17	17

(A) Khorana et al. (80) (81). (B) Michelson (83)

NOTA: En este caso el rendimiento de (B) fue menor pero cuando se hizo con sustratos no radioactivos dio el mismo o mejor rendimiento. En este experimento puede haber ocurrido una pérdida mecánica no detectada.

GDP- β - 32 P. Una enzima de levadura cataliza el intercambio (85) del fosfato β de nucleótidos di-fosfato, con fosfato inorgánico. Si se incuba con 32 P₁, la reacción sería, simbolizando GDP como GPP, para indicar que solamente el fósforo en β intercambia:



Se prepara un extracto enzimático como indican Cabib, Carminatti y Woyzkowsky (85) llegando hasta la etapa de pasar el extracto crudo por una columna de Sephadex G25. Luego se incuba 50 min. a 30° 0,09 ml de esta enzima con la siguiente mezcla de reacción: 30 μ moles de imidazol-ClpH7,5, 1,5 μ moles de EDTA, 2 μ moles de GDP, 1 μ mol de P₁, y 60 μ C de 32 P en un volumen final de 0,3 ml. Se detiene la reacción agregando 3 ml ClO₄H 2,5%. Se centrifuga, se lava el precipitado y los sobrenadantes se tratan 10 min agitando con 18 mg de carbón Norit A. Se centrifuga y se lava 5 veces el carbón con 1 ml cada vez de PO₄H₂Na 0,1M y luego 3 veces con 1 ml de agua. Se extrae el carbón con 8 ml de la siguiente mezcla: etanol, amoníaco, agua (4 : 0,1 : 10), se evapora el sobrenadante y se toma con 1 ml de agua. El GDP 32 P obtenido tiene aproximadamente 4 x 10⁶ cuentas/min. por μ mol.

Manano. Se crecieron S. carlsbergensis hasta fase estacionaria con 9 l del medio de Wickerham (ver más adelante), con aireación forzada. Se obtienen 73 g de levadura lavadas con agua destilada. Se extrae el manano como indican Cifonelli y Smith (86) omitiendo la segunda precipitación con Cu⁺⁺ y reemplazando el metanol por etanol para precipitar (los sobrenadantes de metanol quedan turbios). Se obtienen 1,1 g de manano, peso seco.

Manano ¹⁴C de pared de S. carlsbergensis (manano "in vivo"). Se utiliza un medio de cultivo de Halverson (87), modificado de la siguiente forma para asegurarse de que la única fuente de carbono sea efectivamente la glucosa 0,45 g de sulfato de amonio, 0,45 g de fosfato monopotásico, 0,045 g de

sulfato de magnesio heptahidrato, 0,18 g de peptona (Difco), 0,09 g de extracto de levaduras (Difco), 1,8 g de glucosa y 100 μ C de glucosa 14 C (0,5 μ moles de D-glucosa uniformemente marcada de International Chemical and Nuclear Co., California), y agua hasta un volumen final de 90 ml. Se esteriliza la glucosa junto con los demás compuestos ya que se comprobó que no influye sobre el crecimiento de S.carlsbergensis.

Se inocula con 36 mg de S.carlsbergensis 74. Se incuba 12 horas 30 C en un agitador rotativo, se cosecha por centrifugación y se lava una vez las células con agua destilada. Se deja 12 h en congeladora. Se suspende con 1,5 ml de HONa 1,5 N y 2 gotas de HONa 10N. Se trata 2 h en autoclave, a una presión de 1 kg/cm². Se enfría. Se centrifuga y lava el precipitado. El sobrenadante se purifica como indican Cifonelli y Smith (86), simplificando la técnica a las siguientes etapas: se precipita con etanol 66%, se redisuelve y se precipita con Fehling, se redisuelve con HCl y se vuelve a precipitar con etanol 66%. Se seca con éter. Rendimiento : 8 mg.

Se determina la pureza de este manano de la siguiente forma: 0,12mg del manano 14 C (aproximadamente 6.000 cuentas/min.) se disuelven en 0,055 ml de agua y se tratan con 0,3 ml de ácido sulfúrico 2,3 N 5 h a 100°C. Se enfría y se pasa por una columna de resina aniónica-catiónica Amberlite MB 3 forma acetato e hidrógeno. Se siembra en papel y se somete a cromatografía con el solvente C (ver más adelante). Luego se revela con el reactivo de Trevelyan (88). Hay aproximadamente un 10% de glucosa. No se detecta glucosamina.

Manano 14 C obtenido con la manano sintetasa (manano "in vitro"). Se preparó la siguiente mezcla de reacción: 1,45 μ moles de Cl_2Mn , 0,59 μ moles GDP-manosa- 14 C ($5,9 \times 10^5$ cuentas/min.) 0,4 ml de enzima que contenía - 0,32 mg de manano, en un volumen final de 0,4 ml. (La solución de Cl_2Mn y GDP-manosa se evapora a sequedad antes de agregar la enzima).

Se incubó 2 h a 30°C. Se purifica igual que el manano ^{14}C "in vivo", sólo que antes de calentar se agregan 3,1 mg de manano de S. carlsbergensis no radioactivo y el calentamiento se efectúa 40 min. a 100°C a presión atmosférica. Se incorpora el 20% del GDP-manosa incubado.

Oligosacáridos de manano. Se adapta la técnica de Lee y Ballou (23) a trabajo con cantidades 40.000 veces menores.

Se suspendieron 0,3 mg de manano en 0,05 ml ácido acético glacial, 0,1 ml de anhídrido acético y 0,005 ml de ácido sulfúrico concentrado y se dejó en tubos sellados, 1 día a temperatura ambiente con agitación y 6 días a 30°C sin agitación. Se suspendió la mezcla con agua fría y se neutralizó cuidadosamente con HONa hasta pH 5,6-6,0. Se decantó el sobrenadante y el precipitado de acetatos se llevó a sequedad. Se tomó con metanol anhidro y se volvió a evaporar. Esta etapa se repitió varias veces para eliminar toda el agua. Finalmente se disolvió en 1 ml de metanol.

Se preparó metilato de Na de la siguiente forma. En un balón con refrigerante de reflujo, se agregaron 120 mg de Na a 20 ml de metanol anhidro. Se dejó hasta que todo el sodio haya reaccionado. Se agregó entonces 0,4 ml de esta solución de metilato de sodio fresca, a la mezcla de acetatos de oligomanano disuelta en 1 ml de metanol anhidro. Se dejó 5 min. a 60°C en atmósfera libre de agua. Aparece un precipitado pero que no contiene radioactividad. Se centrifugó y lavó dos veces el precipitado con metanol. Al sobrenadante se agregó 1 volumen de agua y resina Dowex 50 forma H^+ hasta llevar a pH 7,4. Se centrifugó y lavó varias veces la resina. Los sobrenadantes combinados se evaporaron a sequedad y se tomaron con un volumen pequeño de agua. Recuperación de la radioactividad: 90%. Se cromatografió con el solvente C (ver más adelante) en papel Whatman N° 1, durante 41 horas.

Jugo intestinal de caracol. Se utilizaron caracoles recolectados en jardí

nes de la zona del Gran Buenos Aires, en Mar del Sud (Prov. de Bs.As.) y comestibles comprados. Se extrajeron los intestinos y se molieron con arena en mortero, sin agregar agua. Se centrifugó y lavó una vez el sedimento de arena con 1 volumen de agua. Los sobrenadantes combinados se filtraron por una columna de dextrano Sephadex G25 previamente equilibrado con ClNa 0,01 M y EDTA 0,001 M pH 6,5. Se guardó congelado o se liofilizó.

Se encontró que una cantidad de esta enzima que contenga 17 mg de proteína, es suficiente para formar protoplastos de 1 g (peso húmedo) de levadura.

Se determinó que su actividad de proteasa, con albúmina bovina, y de mananasa con manano de S. cerevisiae, es no detectable. Otros autores (89) (90) afirman que encuentran mananasa y algo de proteasa.

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA 74 DE SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS (National collection of Yeast Cultures, The Brewing Industry Research Foundation, Nutfield, Redhill, Inglaterra).

La cepa se mantiene en estrías de medio de Wickerham (91) que contiene 0,33% de extracto de malta "Difco", 0,33% extracto de levaduras "Difco", 0,55% Bacto-peptona "Difco", 1,1% de glucosa y 2% de agar. Se cultivaba en el mismo medio, pero sin agar.

Se cosechan las levaduras hacia el final de la fase logarítmica por centrifugación y se lavan dos veces con agua destilada. Se obtienen 6-7 g. Se guardan en heladera. Se ha comprobado que aún después de 2 semanas, la actividad de la manano sintetasa que se obtiene, no disminuye apreciablemente.

PREPARACION DE LA MANANO SINTETASA

En las preparaciones iniciales se hacía actuar el jugo intestinal directamente sobre la levadura sin ningún pretratamiento de éstas. Sin em-

bargo, este procedimiento es más largo y suele dejar muchos residuos de paredes celulares e incluso algunas células enteras sin atacar. Pretratando las levaduras con mercaptoetanol y EDTA (3), se disminuye apreciablemente el tiempo de ataque con el jugo intestinal de caracol y se obtiene un preparado reproduciblemente libre de residuos de pared y de las células enteras. Más abajo se describe el procedimiento con pretratamiento. En los casos que se obtuvo enzima a partir de protoplastos no pretratados, se omite simplemente esa parte y se comienza pesando la levadura lavada con ClK 0,6 M.

La preincubación e incubación se efectúan en un baño de 30° con agitación suave.

Para la preincubación se suspenden 3,2 g de levaduras (peso húmedo) con 3,8 ml de agua y se agregan 4,4 ml de EDTA 0,1 M pH 7.0 y 0,08 ml de β -mercaptoetanol. Se tratan 30 min. Se centrifugan y suspenden una vez con ClK 0,6 M y se vuelven a centrifugar. Se pesan (en este caso el peso se redujo de 3,2 a 2,2 g debido al ClK).

Se suspenden luego los 2,2 g de levaduras pretratadas con 1,8 ml de buffer citrate 0,1 M fosfato 0,2 M pH 6,1 (92), 0,2 ml de EDTA 0,1 M pH 7,0 y 6,4 ml de ClK 1,2 M. Se agregan inmediatamente 4,4 ml de jugo intestinal de caracol y se lleva con ClK 0,6 M a 22 ml de volumen final.

El tratamiento dura 45-60 min. con preincubación y por lo menos 2 h sin preincubación. Se sigue el progreso de liberación de protoplastos tomando con un ansa una muestra, y colocándola sobre un porta con una gota de ClK 0,6 M.

Se observa con dispositivo para contraste de fases. Como S. carlsbergensis cepa 74 tiene forma alargada, es fácil diferenciar las células sin atacar de los protoplastos, que son esféricos (ver figuras 15 y 18).

Finalizando el ataque del jugo intestinal de caracol, se centrifuga

a 1500 xg por 10 min., en un tubo de policarbonato. Se suspende suavemente con una varilla de polietileno y se lava 2 veces con 20 y 5 ml de ClK 0,6 M y citrato 0,01 M pH 6,1 centrifugando 10 min. a 1500 xg y 3000 xg respectivamente.

1) Obtención de la enzima de células no preincubadas con mercaptoetanol y EDTA. Los protoplastos se suspenden con buffer Tris-ClO,05 M pH 7,5 a 2,2 ml. Se congela y descongela 3 veces. Este constituye el extracto total sin tratar. Se centrifuga y el sedimento se lava con un volumen de buffer Tris-Cloruro, centrifugando nuevamente. Parte de este segundo sobrenadante se utiliza para llevar al primer sobrenadante a 2,2 ml de volumen final. El resto se descarta. El sedimento de la segunda centrifugación se suspende con buffer Tris-cloruro a 2,2 ml. Se obtiene así un extracto sobrenadante y uno sedimentable. Preparado de esta forma, el extracto total tiene 60 mg/ml de proteína, la enzima sobrenadante 22 mg/ml de proteína y la enzima sedimentable 37 mg/ml de proteína y 30 μ moles/ml de manano.

2) Obtención de la enzima de células preincubadas. Se resuspende el sedimento de protoplastos con 4 veces su volumen de buffer imidazol-cloruro 0,05 M, pH 6,5 que contiene sulfato de magnesio 0,002 M. Se centrifuga a 20.000xg 10 min. Se resuspende con el mismo buffer a 2,2 ml de volumen final y se congela y descongela 2 veces con una mezcla de hielo y sal. Se centrifuga 10 min. a 20.000xg. Se suspende con 4 volúmenes del sedimento del buffer de imidazol y se vuelve a centrifugar, 10 min. a 20.000xg. Finalmente se resuspende con 0,7 ml de glicerol, 0,03 ml de buffer imidazol-cloruro 1 M, pH 6,5 que contiene sulfato de magnesio 0,04 M llevando con imidazol-cloruro 0,05 M, pH 6,5 que contiene sulfato de magnesio 0,002 M a un volumen final de 2,2 ml (1 ml de enzima particulada corresponde a 1 g peso húmedo de levadura lavada con ClK 0,6 M). Preparada de esta forma, la enzima tiene aproximadamente 33 mg de proteína por ml y 3-5 μ moles/ml de manano, expresado como anhidro-manosa.

DOSAJE DE LA MANANO SINTETASA

La mezcla de reacción usual contiene: 2,5 μ moles de imidazo 1-Cl pH 6,5 , 0,1 μ moles de GDF manosa ^{14}C en la manosa ($2,5 \times 10^5$ cuentas/min μ mol), 0,15 μ moles de Cl_2Mn , 0,1 μ moles de sulfato de magnesio y 0,02 ml de enzima en un volumen final de 0,048 ml. Se incuba a 30°C y dosa como se indica a continuación.

Se utilizaron cuatro métodos para medir la actividad de la manano sintetasa. El primero consiste en una extracción alcalina de la mezcla de reacción y el manano solubilizado es precipitado por alcohol, Cu^{++} y nuevamente por alcohol. Este método es de los cuatro que se describen, el único específico pero es muy laborioso en parte debido a que el manano da un precipitado gomoso muy difícil de tratar.

En el segundo método, la mezcla de reacción se somete a una electroforesis sobre papel, de manera que el manano formado permanece inmóvil en el origen mientras que el sustrato remanente migra hacia el ánodo. Este segundo método se ideó como alternativa rápida del primero y tiene la ventaja que es casi completamente conservativo; se puede estudiar fácilmente qué ocurre con la manosa que no es transferida a manano o liberada como tal (descargada).

En el tercero que es el más rápido de manera que se lo utiliza con preferencia, la mezcla de reacción simplemente se precipita con etanol 66% y luego de lavar se mide directamente.

En el cuarto, se diluye la mezcla de reacción con agua y se filtra por "millipore". El manano queda en el filtro.

La eficiencia que se obtiene con cada método es aproximadamente la misma.

Método de extracción del manano con álcali

Se detiene la reacción agregando 0,5 ml de HOK 2M. Se agregan 2 mg de

manano no radioactivo, se completa a 1 ml con agua y se calienta 40 min. a 100°C. Se centrifuga a 12000 xg 10 min. y se lava el precipitado homogeneizando con varilla con 0,5 ml de HOK 1 N y centrifugando nuevamente. Los sobrenadantes combinados se precipitan con 2 volúmenes de etanol, calentando en un baño a 100° y raspando con una varilla a medida que se agrega el alcohol. Se deja por lo menos 2 h a -15°C. Se centrifuga. El precipitado, que es una mezcla de manano, glucógeno y glucano "soluble", se redissuelve con 1 ml de agua y se agrega 1 ml de reactivo de Fehling. Este reactivo se prepara en el momento a partir de volúmenes iguales de dos soluciones, una que contiene 17,3% de tartrato de Na y K más 12,5% de hidróxido de K y otra que contiene 3,5% de sulfato de Cu pentahidratado.

Se deja 30 min a -15°C. Se centrifuga. El manano precipitado, se lava una vez con 2 ml de reactivo de Fehling y se centrifuga nuevamente. Al sedimento se le agregan 3 gotas de HCl 5N y apenas se disuelve, se diluye con agua a 1 ml. Se agregan 2 volúmenes de etanol en las condiciones en que se efectuó la primera vez y el precipitado se redissuelve con agua y se pasa con pipeta a una plancheta de acero inoxidable. Esta se seca sobre un baño a 100°C y se cuenta en un contador de flujo gaseoso. (Al valor obtenido se le resta el que se obtiene en un tubo equivalente, en el cual se agregó el GDP-manosa o la enzima un instante antes de agregar el álcali).

Método electroforético

Se indica el origen con una línea que se traza a 13 cm de un extremo de un papel Whatman N° 3 MM. Se dibujan luego círculos de 2,8 cm de diámetro, contiguos y con centros sobre la línea de origen (un círculo para cada muestra). Para evitar que muestras adyacentes se mezclen, se cortan entre los círculos ventanas de aproximadamente 2 mm de ancho y de 7-8 cm de largo. El papel así preparado, se moja en el electrolito F (ver más adelante) eliminándose el exceso de buffer secando con papel de filtro .

Cada mezcla de incubación se toma con una pipeta capilar que se desecha luego de usada, y se siembra en una banda de aproximadamente 1 cm de ancho, dentro del círculo que le corresponde. El tubo se lava con 0,05 ml de agua y el lavado se transfiere al papel. La electroforesis se lleva a cabo en un aparato como el que describen Markham y Smith (93) aplicando una tensión de 20 Volts/cm durante 2 horas. Después de secar el papel, los círculos del origen se recortan con tijera. Como se encontró que usualmente junto con manano se libera manosa en forma soluble en etanol 50 %, se ideó un procedimiento para eliminar esta radioactividad, que no corresponde a manano propiamente dicho. Cada círculo de papel es fijado con un alfiler de acero a una superficie de corcho, que se coloca al revés sobre un cristizador que contiene etanol 50% de manera que el círculo de papel queda sumergido. Después de 30 min. con agitación suave de un agitador magnético, se sacan los círculos del etanol y se secan en una corriente de aire caliente. Cada disco se coloca luego en una plancheta de aluminio de 3 cm de diámetro. Se cuenta en un contador de flujo gaseoso, primero de un lado y luego del otro, y se suman ambas cantidades. (Se resta un blanco contado de la misma forma, hecho agregando GDP-manosa al final de la incubación).

Filtración por millipore

Se agrega 0,25 ml de agua fría, y se pasa por un filtro de nitrato de celulosa "millipore" con poros de 0,65 μ . Se lava el tubo y el filtro con 0,25 y 0,5 ml de agua y finalmente el filtro con 1 ml de agua más. Se seca el filtro con lámpara infrarroja, se lo coloca en el fondo de un vial de vidrio y se mide en un contador de centelleo líquido con 5 ml de tolueno que contiene 0,5% de PPO y 0,03% de di-metil POPOP.

Precipitación directa con etanol 66%

Al finalizar la reacción se agrega a los 0,048 ml de mezcla de reac

ción 1 ml de etanol 66% (etanol 66: H₂O 33). Se mezcla bien con un agitador de tubos excéntricos y se centrifuga 2 min. en centrífuga tipo clínica. Se decanta el sobrenadante, que se guarda y ha servido para recuperar GDP manosa ¹⁴C. El precipitado se lava, resuspendiendo cada vez con ese agitador, dos veces con 1 ml y una vez con 0,5 ml de etanol 66% que contiene acetato de amonio 25 mM. Finalmente se resuspende con 0,35 ml de agua y se pasa por decantación a una plancheta de aluminio. Se deja secar sobre un baño de agua a 100° y se lava una vez el tubo con 0,35 ml de agua, agitando bien y transvasando a la misma plancheta. Se cuenta en un contador de flujo gaseoso.

Como en los otros métodos, se resta un blanco realizado de la misma forma, al que la enzima o el GDP-manosa se agregó al terminar la reacción.

CROMATOGRAFIA Y ELECTROFORESIS

Se usaron los siguientes solventes para cromatografía en papel, siempre en el sentido descendente:

Solvente A, etanol-acetato de amonio 1 M pH 6,8 (5 : 2)

Solvente B, etanol-acetato de amonio 1 M pH 3,8 (5 : 2)

Solvente C, n-butanol-piridina-agua (6 : 4 : 3)

Solvente D, ácido isobutírico-amoniaco-agua (25 : 1 : 14), con EDTA 1 mM

Solvente E, n-butanol-etanol-agua

En los casos que se purifica un compuesto para ser utilizado con enzimas, se usó papel previamente lavado según (94).

Los siguientes electrolitos se emplearon para electroforesis sobre papel:

Electrolito F, ácido acético-piridina-agua (0,4 : 10 : 90)

Electrolito G, carbonato de Na 0,25 M - bicarbonato de Na 0,25 M, pH final 9

Electrolito H, borato de sodio 0,05 M

REDUCCION E HIDROLISIS DE OLIGOSACARIDOS DE MANANO

Para reducir tanto el di como el mano-trisacárido se utilizó la técnica de Walker y Whelan (95). Se deja 1 μ mol de sacárido con 17 μ moles de BH_4Na en 0,4 ml de agua, 24 horas a temperatura ambiente. Se destruye el exceso de borohidruro con una pequeña gota de ácido sulfúrico 5N. Se pasa luego por una columna de resina aniónica catiónica tipo Amberlite MB-3 forma hidrógeno y acetato. El exceso de ácido bórico se elimina evaporando dos veces con metanol.

La hidrólisis del disacárido reducido se efectúa en tubo sellado 120 minutos a 100°C, con ácido clorhídrico aproximadamente 2N. Se elimina luego el ácido, dejándolo durante la noche en un desecador al vacío, en presencia de HONa. Se toma con agua y se siembra en la electroforesis.

Se determinó con mano-trisacárido no radioactivo, que es más resistente que el mano-disacárido a la hidrólisis ácida. El ácido sulfúrico resultó ser más eficiente y se lo usó en vez del clorhídrico. Posteriormente se pasó por una resina aniónica catiónica antes de sembrar en el papel de electroforesis.

Después de determinar las posiciones de la manosa y manitol en el papel con un detector "Scanner" (ver más adelante), se eluyeron, pasaron por columna de Amberlite MB 3 forma acetato-hidrógeno, evaporaron dos veces con metanol y contaron en planchetas de acero en un contador de flujo gaseoso.

SEPARACION DE MANOSA Y MANITOL

En la figura 11, A se representó la separación de manosa y manitol lograda en electroforesis con el electrolito H. Como el mano-disacárido migra muy próximo a la manosa, se cromatografió con el solvente C (figura 11, B) en el cual el disacárido reducido tiene menor movilidad que la manosa.

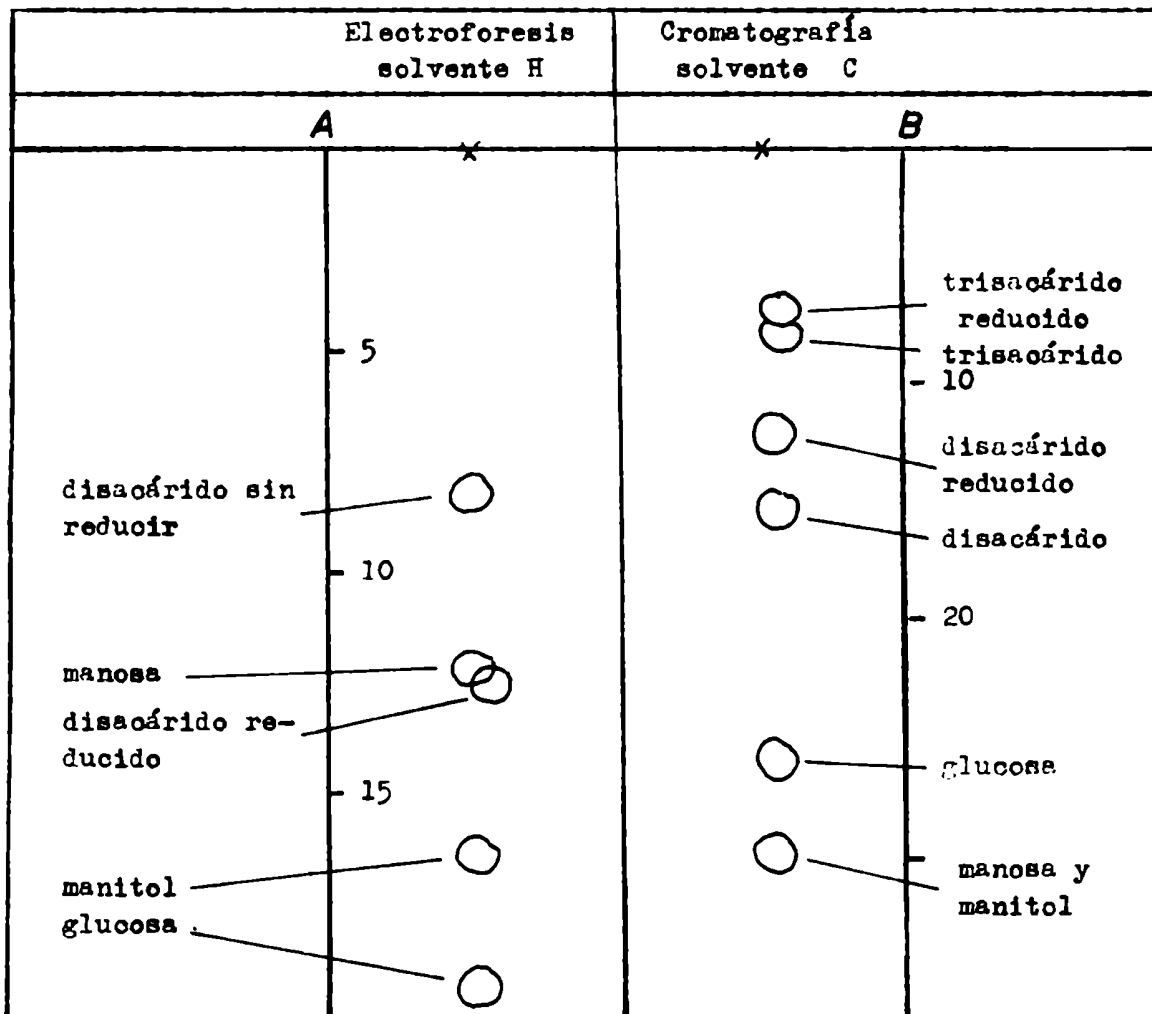


Figura 11, A y B. Separación electroforética de manosa de manitol. En el borde izquierdo de A y el derecho de B se ha anotado la distancia del punto donde se sembró la mezcla. En ambos casos se utilizó papel Whatman N° 1. La electroforesis es de 2 horas a 20 Volts/cm. La omatografía de 40 horas.

MÉTODOS ANALÍTICOS

La concentración de manano y oligosacáridos de manano se midió por el método de Dubois (96). La concentración de nucleótidos se determinó por su extinción a 260 m μ y por el fósforo según Fiske y SubbaRow (97). Las proteasas se dosaron por la liberación de material que absorbe a - 280 m μ , en un sobrenadante de tricloroacético. El mismo procedimiento se empleó para fosfodiesterasas de RNA, donde se midió la extinción a 260 m μ . La lipasa se dosó por el método descrito por Bier (98).

Sobre papel de cromatografía o electroforesis se ubicó los azúcares reductores con el reactivo de Trevelyan (88), los nucleótidos con luz ultravioleta y los ésteres fosfóricos por el método de Burrows (99).

Medidas de radioactividad

En el dosaje de la manano sintetasa, se describe cómo se mide el manano ¹⁴C. Cuando el material se quiere recuperar, se usó planchetas de acero inoxidable mientras que en los dosajes de rutina se usaron planchetas de aluminio. El ³²P también se midió en contador de flujo gaseoso, usando planchetas de aluminio.

Para medir después de una cromatografía o electroforesis en papel la posición de compuestos ¹⁴C, se usó un detector "Scanner" Nuclear Chicago. Para obtener datos cuantitativos, se eluyeron con agua las zonas correspondientes a cada pico y se contaron en planchetas como se describió más arriba.

Se midió ³H en solución, en una mezcla que contenía 1 ml de agua más 10 ml del centellador descrito por Bray (100). Se usó un detector de centelleo líquido Packard Tricarb, con una ventana 50 a infinito y 60% de ganancia.

En las cromatografías con ³H sólo o con ³H más ¹⁴C, se recortó una zona de 7 cm de papel y colocó dentro del vial en forma de un cilindro.

Se agregó luego 10 ml de tolueno conteniendo 0,5% de PPO y 0,03% de dimetil POPOP. Cuando existía una mezcla de ambos isótopos, se midió el ^{14}C solo en un canal con ventana 150-650 y 6% de ganancia y ^{14}C más ^3H en un canal con ventana 50-700 y 40% de ganancia. El ^3H no se mide en el primer canal. En el segundo canal, para corregir por el ^{14}C que se mide junto con el ^3H , se puso sobre un papel una cantidad conocida de ^{14}C y se lo sometió al mismo tratamiento que sufrieron las muestras incógnitas. Se determinó así, qué porcentaje de ^{14}C se mide en el segundo canal. En las medidas de ambos isótopos, se calcula este mismo porcentaje que se está midiendo en el primer canal y se resta del valor que se mide en el segundo, obteniendo así el valor para el ^3H .

RESULTADOS

Para iniciar el estudio de la manano sintetasa, se desarrollaron primeramente técnicas rápidas de dosaje de la actividad de esta enzima. En "Métodos" se describe el dosaje empleado por Algranati, Carminatti y Cabib (1) y tres técnicas que aunque no absolutamente específicas para el manano, son muchísimo más rápidas.

Se estudió entonces la posibilidad de purificar la enzima. Se confirmó el resultado de Algranati y colaboradores (1), que la actividad es sedimentable. En "Métodos" se describen dos técnicas de preparación de la enzima. La primera fue adaptada directamente del trabajo mencionado, y se usó en los primeros estudios. En la segunda, los protoplastos son previamente tratados con EDTA y mercaptoetanol, que labilizan la pared celular de tal forma que el jugo intestinal de caracol la digiere por completo (3). Lavando la enzima por centrifugación repetidas veces y guardándola sin congelar, se logró un preparado enzimático particulado purificado (el contenido en manano cae de la primera técnica a la segunda 10 veces) y relativamente estable.

Como la enzima es particulada, se intentó fraccionar de manera de poder identificar la partícula a la cual se encuentra unida.

Se estudiaron varias propiedades de la enzima. Se vio que no requiere receptor, que el GDP-manosa es un sustrato relativamente específico y que requiere Mn^{++} para su actividad. Se demostró la identidad del producto biosintetizado con el manano extraído de pared celular. La parte nucleotídica del GDP-manosa se libera aparentemente como una mezcla de GDP y GMP.

Finalmente se estudiaron algunas propiedades de la unión a una partícula que hace que el manano biosintetizado sea sedimentable.

PREPARACION DE LA ENZIMA

La técnica de preparación de protoplastos fue adaptada de la de Eddy (101). Se sustituyó el estabilizante osmótico que él usa, la rhamnosa o el manitol, por CLK como usa Ottolenghi (102). Como el jugo intestinal de caracol es una mezcla cruda de enzimas, se intentó preparar protoplastos con enzimas purificadas. Se esperaba obtener extracto de manano sintetasa más activos. Por ejemplo, si el jugo de caracol con tuviera una proteasa (90) podría atacar a la enzima, expuesta cuando se libera el protoplasto. En la tabla III se observa que en ningún caso hubo formación de protoplastos con las enzimas purificadas, a pesar de que en algunos, las paredes celulares estaban visiblemente atacadas. Con la enzima de Rhizopus la falta de efectividad no se puede atribuir a que se hubiera inactivado ya que si se hacía actuar sobre laminarina un β 1 \rightarrow 3 glucano similar al de la pared de levadura, era 60 veces más efectiva que la misma cantidad de jugo intestinal de caracol. El resultado con las glucanetasas purificadas, se asemeja al obtenido por Bacon y colaboradores (34) y por Lampen (36). Como se vió en la introducción, las glucanetasas solas no actúan ya que aparentemente existe una barrera que protege al glucano.

Rutinariamente se utilizaron S.carlsbergensis cosechadas en la parte final de la fase logarítmica como recomienda Eddy. Sin embargo el proceso de formación de protoplastos en esta forma es largo y muchas veces simplemente no se forman los protoplastos sin que se encuentre explicación alguna a este fenómeno.

TABLA III - Efectividad de distintas enzimas en su acción sobre S.carlsbergensis.

Enzima (s)	Ataque de las paredes	Liberación de protoplastos
Celulosa de caracol.	++	++
Fracción precipitable con sulfato de amonio del medio de crecimiento de <u>Streptomyces</u> sp., cultivado con <u>S.carlsbergensis</u> como única fuente de carbono.	+	-
exo- β -1 \rightarrow 3 glucanasa de <u>Basidiomycetes</u> .	-	-
endo- β -1 \rightarrow 3 glucanasa de <u>Rhizopus</u> . (*)	+	-
Mezcla de la enzima de <u>Rhizopus</u> y de <u>Basidiomycetes</u> .	+	-
Mezcla de la enzima de <u>Rhizopus</u> y de <u>Streptomyces</u>	++	-

(*) Esta enzima es 60 veces más activa para hidrolizar laminarina, que la celulasa de caracol.

Se trata una suspensión de S.carlsbergensis con las enzimas indicadas. Se incuba con buffer acetato-ácido acético pH 5,0 0,05 M y ClK 0,6 M , a 30° y con agitación. Se sigue el ataque y la formación de protoplastos tomando alícuotas en ClK 0,6 M y observando al microscopio con dispositivo de contraste de fases. Se considera que la pared ha sido atacada cuando se deforma, cambiando visiblemente de aspecto respecto de las células normales.

Para investigar la posibilidad que en alguna fase del crecimiento fueran más susceptible al jugo de caracol, se hizo una curva de creci-

miento de nuestra cepa, S.carlsbergensis 74, (figura 12). Se tomaron muestras en los puntos indicados y se incubaron con jugo intestinal de caracol. A distintos tiempos se tomaron muestras que se observaron al microscopio. En forma aproximada y contando protoplastos y células enteras en varios campos, se determinó la marcha de la formación de protoplastos. Estos resultados semicuantitativos están representados en la figura 13. Se confirman los resultados de Eddy (101), que señalaba la relativa insensibilidad de células en fase estacionaria. Se observa que la curva 1 aunque tiene una pendiente inicial menor que la curva 2, llega a un 100 % de protoplastos antes.

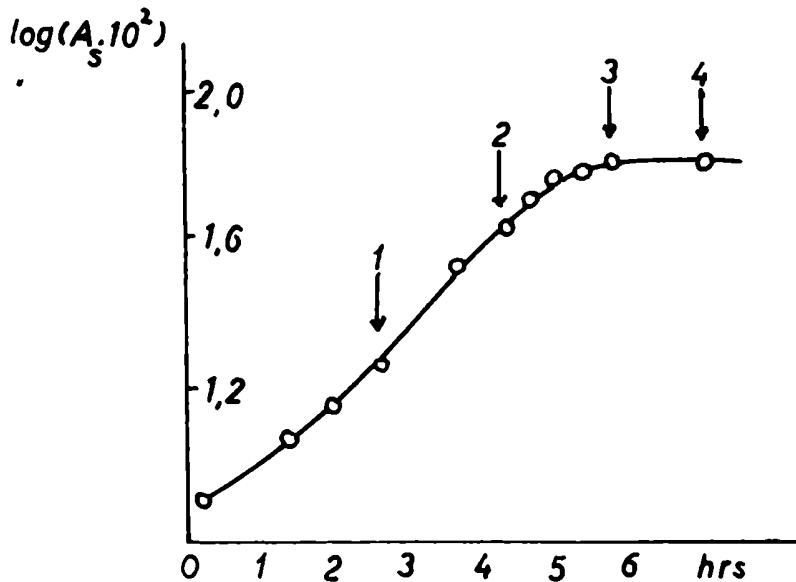


Figura 12: Curva de crecimiento de S.carlsbergensis. En los puntos indicados por las flechas, se tomaron muestras para preparar protoplastos (ver figura 13).

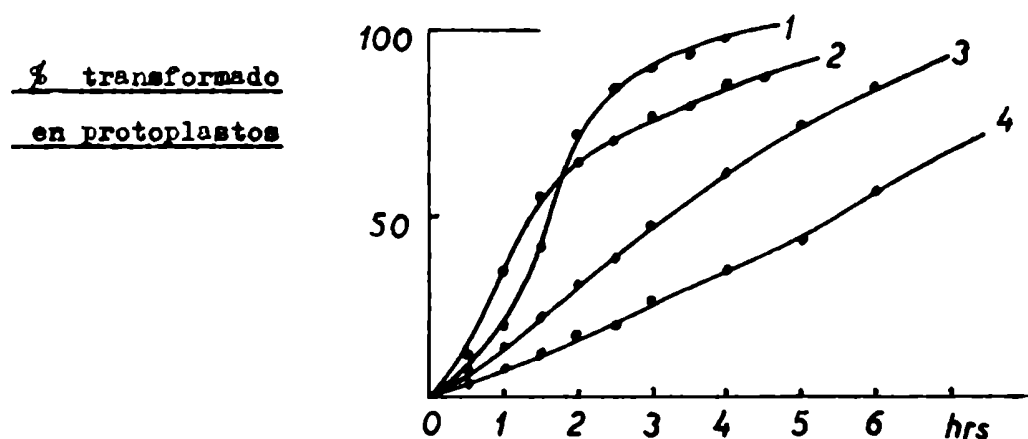


Figura 13: Velocidad de formación de protoplastos de *S. carlsbergensis*.
Se tomaron muestras de levaduras en distintas fases de crecimiento, que se indican en la figura 12, y se trató con jugo intestinal de caracol (ver "métodos").
En las muestras (1) y (2) las levaduras están en fase logarítmica de crecimiento. En las muestras (3) y (4) están en fase estacionaria. Se determina por observación de varios campos del microscopio, el porcentaje de células transformadas en protoplastos en función del tiempo de incubación con jugo intestinal de caracol.

Con las células en fase estacionaria temprana, curva 3, y fase estacionaria avanzada, curva 4, la velocidad decrece notoriamente. En este último caso a las 6 horas de incubación recién se llega a un 50% de formación de protoplastos.

Se determinó entonces la relación óptima de jugo intestinal de caracol a levadura para la formación de protoplastos en el menor tiempo posible. La relación 1,5 ml de jugo de caracol a 1 g de levadura (en una suspensión al 10% de ésta), parece ser satisfactoria (ver figura 14). Con una relación 1 a 1 se llega a un punto en el cual no se forman más protoplastos. En ciertas ocasiones se agregó entonces una cantidad adicional de jugo de caracol, pero sin obtener resultado alguno.

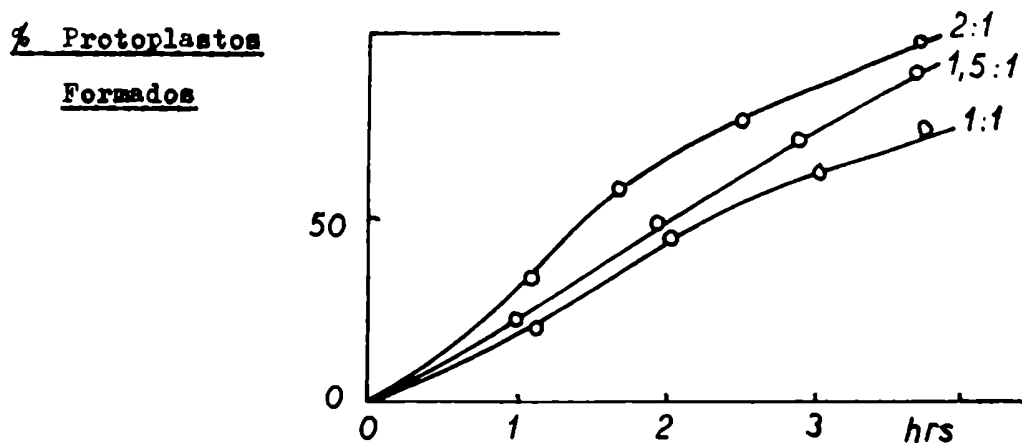


Figura 14: Relación óptima de jugo intestinal de caracol a levadura.

Se siguió la formación de protoplastos con las relaciones jugo intestinal de caracol a levadura indicadas. Se usó S. carlsbergensis no preincubadas con EDTA y mercaptoetanol. (ver "métodos").

Como los protoplastos son muy delicados se trató en lo posible no romperlos involuntariamente durante su preparación y posterior centrifugación. En ciertas ocasiones se comprobó que el material de vidrio aumentaba la labilidad de los protoplastos. Se usó entonces rutinariamente material de polietileno.

Se estudió el efecto de lisar los protoplastos por distintos procedimientos sobre la actividad de la manano sintetasa resultante. Usualmente se resuspenden los protoplastos agregando el buffer diluido en pequeñas porciones y homogeneizando en forma continua (ver "métodos"). El sedimento ocupa aproximadamente una tercera o cuarta parte del volumen al que finalmente se lleva la enzima. Esto significa que se diluye el CLK en ese primer lavado a no menos de 0,1 M. La concentración del CLK disminuye luego en los lavados sucesivos. Sin embargo, al

microscopio se observan más protoplastos lisados que si se los diluye violentamente haciéndolos salir de una jeringa a un volumen grande de buffer diluido, tal que la concentración de ClK final resulte 35 veces menor.

En el caso de la dilución violenta quedan muchos protoplastos con la forma original que aparentemente tienen un pequeño orificio de manera que el líquido intra y extra celular se mezcló. Estos protoplastos se diferencian al microscopio de los enteros en que estos últimos se observan con un halo brillante mientras que los que tienen un orificio no brillan. Un tercer método de homogeneizado lo constituye el sonicado del preparado de protoplastos apenas rotos, de manera de lisarlos por completo. Por último se preparó una enzima por sonicado directo de los protoplastos enteros. Se observa en la tabla IV que con el choque osmótico como se lo describe en "métodos", se obtiene la enzima más activa.

Tabla IV - Distintos métodos de romper los protoplastos para obtener la enzima.

Tratamiento	Actividad
	cuentas/min.
Segunda técnica de preparación de la enzima.	1450
Choque osmótico violento .	1120
Choque osmótico violento y sonicado.	570
Sonicado directo.	340

Choque osmótico violento se llamó diluir súbitamente 30 veces la concentración salina del medio en el que se encuentran los protoplastos. El sonicado se efectuó durante 1 minuto a la intensidad máxima.

En las figuras 15 a 24 están dibujadas las observaciones efectuadas al microscopio con contraste de fases del proceso de formación de protoplastos. Se colocó siempre el material a observar sobre una gota de ClK 0,6 M. Cuando se quiso observar la lisis de los protoplastos por choque osmótico, se agregó cuidadosamente por cada lado del cubre-objetos, buffer diluido. Después de un momento inicial en el cual hay un movimiento brusco del material y resulta imposible observarlo, el preparado se estabiliza y se puede seguir perfectamente como por ejemplo, un protoplasto se va hinchando y al mismo tiempo se hace cada vez menos brillante. Finalmente se observa su explosión quedando la mayor parte de las veces como se indica en las figuras 20 y 21. Una vez que la membrana citoplasmática se rompe en esa forma brusca, resulta imposible ubicarla. Sólo se la reconoce cuando tiene las organelas adheridas, en especial la vacuola.

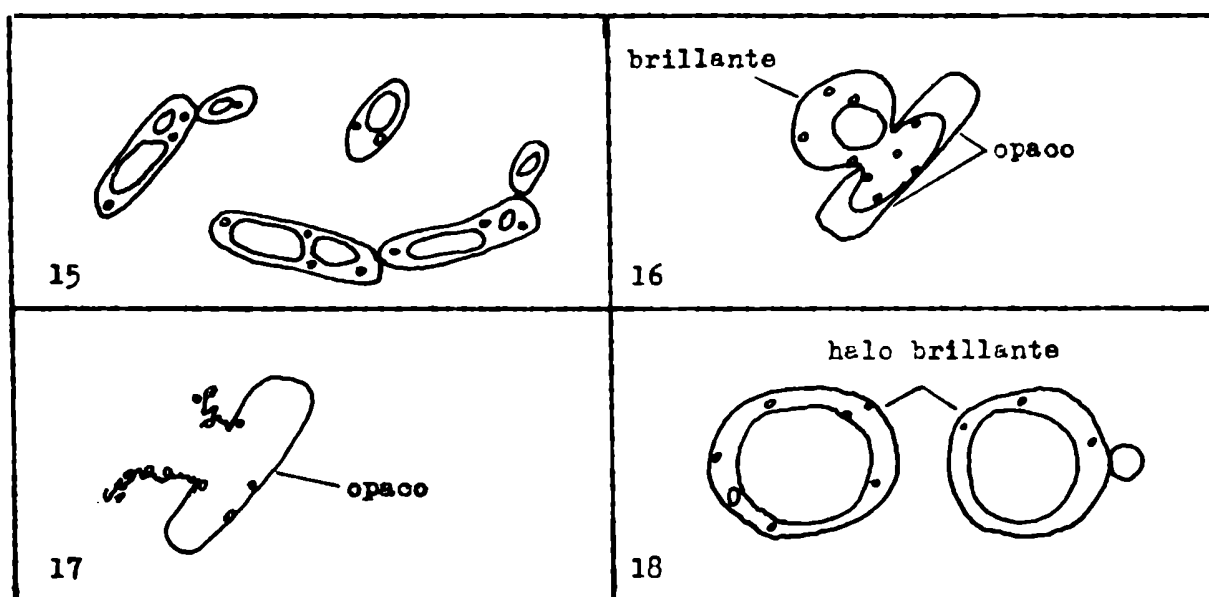


Figura 15: S. carlsbergensis, fase logarítmica.

Figura 16: Protoplasto en formación. Está saliendo por un orificio en la pared celular. La parte que queda vacía es opaca.

Figura 17: Protoplasto que se rompió antes de salir. La membrana citoplasmática quedó adherida a la pared, dentro y fuera de la célula. Algunas organelas quedan unidas a la membrana.

Figura 18: Protoplastos. Uno de ellos tiene unido el protoplasto del brote.

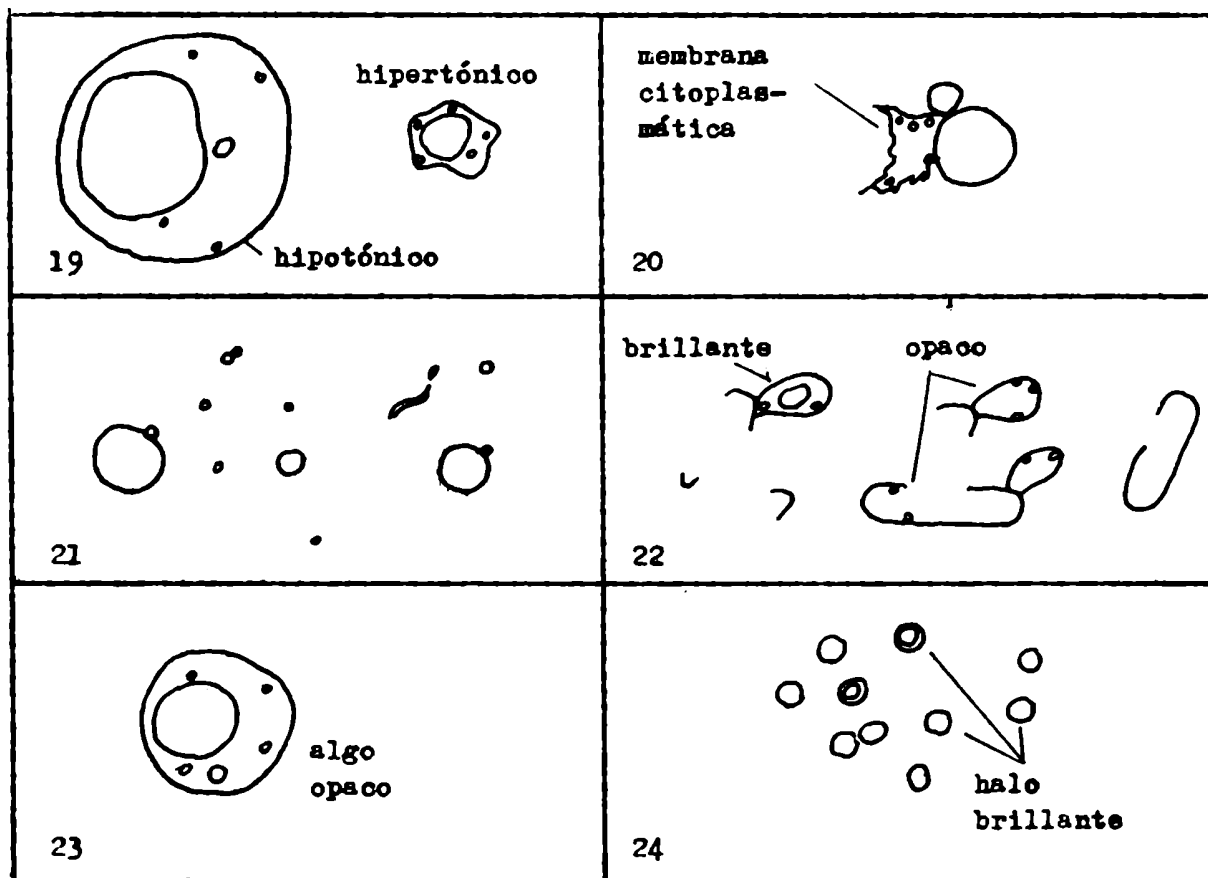


Figura 19: Cambios en la morfología de los protoplastos debidos a cambios de presión osmótica.

Figura 20: Protoplasto que acaba de reventar. La vacuola queda entera.

Figura 21: Partículas subcelulares que liberan los protoplastos.

Figura 22: Residuos de paredes. En un caso el brote no fue atacado.

Figura 23: Protoplasto cuya membrana está rota pero conservó la forma.

Figura 24: Preparado de protoplastos que se obtiene con preincubación con mercaptoetanol y EDTA. Esta última figura está dibujada en menor escala.

A pesar de que se optimizaron los parámetros que intervienen en la preparación de los protoplastos, seguían esporádicamente presentándose ca sos donde la formación no se completaba. Se ensayó entonces preincubar las levaduras con un compuesto que tuviera un grupo sulfidrilo, como lo sugie ren varios autores (3, 103, 104).

Se decidió usar el β -mercaptoetanol ya que si era efectivo, era más sencillo de emplear que otros compuestos indicados. Se observó que el tiempo de formación de los protoplastos disminuyó a la mitad o menos, pero que había que eliminar el mercaptoetanol durante la incubación con jugo intestinal de caracol, sino el material se aglomeraba y no se liberaban los protoplastos. En la tabla V se indican las actividades observadas sin y con preincubación de los protoplastos.

Tabla V - Actividad de la enzima preparada sin y con preincubación con EDTA y mercaptoetanol.

Método de preparación de la enzima	Actividad
Protoplastos sin tratamiento previo	1840 cuentas/min.
Levadura preincubada con β -mercaptoetanol 0,1 M. Luego se prepararon los protoplastos en presencia de esa concentración de mercaptoetanol	750
Levadura preincubada con β -mercaptoetanol y EDTA pero sin estos reactivos durante la formación de protoplastos.	1680

NOTA: En la tabla XIV se muestra el efecto del mercaptoetanol sobre la actividad de la enzima cuando se lo agrega a la mezcla de reacción.

Tratamientos similares se aplicaron entonces a células enteras (tabla VI), observándose que tiene un efecto pronunciado sobre la actividad. La actividad de las células enteras aumenta de un 10% a un 27% de la actividad observada con la enzima de protoplastos.

De manera de tener una enzima más purificada, se ensayó el efecto de sucesivos lavados sobre la enzima. En la tabla VII se observa que la enzima los resiste perfectamente.

Tabla VI - Actividad según el procedimiento de preparación de la enzima.

Enzima	Actividad cuentas/min.	Porcentaje tomando la enzima preparada como se indica en "métodos" como 100.
Extracto usual (segunda técnica de preparación de la enzima)	1800	100
Células enteras de <u>S. carlsbergensis</u> .	170	10
Células enteras tratadas con EDTA 0,04 M,	330	18
Células enteras tratadas con EDTA 0,04 M y mercaptoetanol 0,1 M	480	27

Los pretratamientos con EDTA o con EDTA y mercaptoetanol, se efectuaron como se indica en "métodos" experimentales. Se dosó la actividad enzimática por el método de precipitación con etanol 66%.

Tabla VII - Efecto del lavado con buffer sobre la recuperación de la enzima en el sedimento de 25.000 μ g.

Tratamiento a la enzima sedimentable por 15.000 g 10 minutos.	Actividad cuentas/min.
Ninguno	1800
Un lavado con 3 volúmenes de buffer	1530
Dos lavados con 3 volúmenes de buffer	1770

A partir de protoplastos se prepara una enzima por la primera técnica indicada en "métodos" (enzima preparada sin preincubación con EDTA y mercaptoetanol). Se toma una muestra para medir la actividad. El resto se centrifuga a la misma velocidad, resuspendiendo con 3 volúmenes de buffer. Se toma una muestra y se vuelve a repetir el lavado.

Tabla VIII - Estabilidad de la enzima.

Enzima	Actividad
	cuentas/min.
Recién preparada	650
Guardada 65 días en congeladora	500

En la tabla VIII se ve que el extracto particulado no lavado (primer método de preparación de la enzima) es muy estable. En más de dos meses sólo perdió un 23% de su actividad. Las enzimas se conservan a -15°C . Sin embargo, en la curva inferior de la figura 25 se ve que la enzima que ha sido lavada (segundo método de preparación de la enzima), no es tan estable. Se pensó que los sucesivos congelamientos y descongelamientos que sufre cada vez que se la utiliza podía afectarla. Como el glicerol no tiene un efecto mayormente inhibitorio, ver figura 26, se ensayó guardarla a -7°C , con una concentración de glicerol tal que evite que a esa temperatura se congele. La curva superior de la figura 25 representa la actividad de una alícuota de la misma enzima que se dosó en la curva inferior, pero conservada con un 30% de glicerol. Se adoptó entonces esa técnica de conservación.

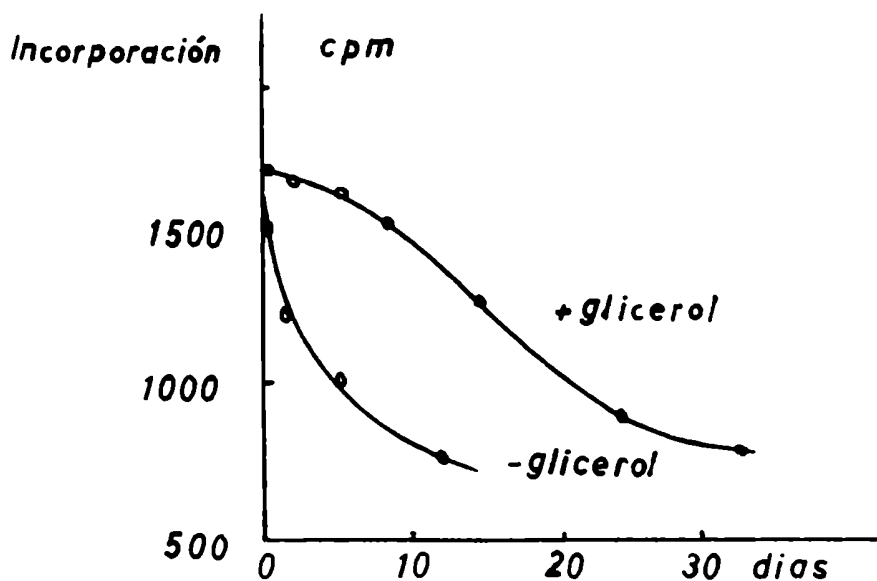


Figura 25: Efecto del congelamiento sobre la estabilidad de la enzima.

Se preparó una enzima a la cual no se le agregó glicerol y se guardó a -15°C . Se determinó en distintos días cómo se conservaba la actividad de esta enzima en comparación con la enzima usual con glicerol, guardada a -7°C (sin congelar).

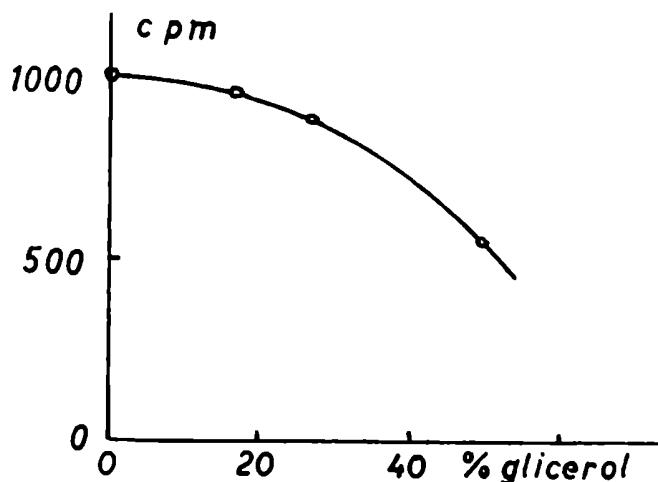


Figura 26: Efecto del glicerol sobre la actividad de la enzima. Se centrifugaron alícuotas de una enzima y se resuspendieron en el volumen original con buffer con glicerol a distintas concentraciones.

Sedimentabilidad de la enzima.

Para determinar si la enzima existe en dos formas, una soluble y otra sedimentable, se centrifugó el preparado enzimático no sedimentable a 20.000 xg, (primer método de preparación de la enzima) a mayores fuerzas centrífugas. En la tabla IX se observa que en este extracto, de la actividad que no sedimentaba a 20.000 xg, 80% sedimenta a 100.000 xg.

Tabla IX - Sedimentabilidad a 100.000 xg de la enzima no sedimentable a 20.000 xg.

Enzima	Actividad	Distribución de la actividad
	cuentas/min.	%
Sobrenadante 20.000 xg	550	-
Sobrenadante 100.000 xg	100	20
Sedimento 100.000 xg	370	80

Se centrifuga 90 min. a 100.000 xg la enzima no sedimentable en 10 min. a 20.000 xg. (ver en "métodos" primera técnica de preparación de la enzima). Se mide la actividad en el sedimento y en el sobrenadante, por el método electroforético.

Enzimas contaminantes que actúan sobre el GDP-manosa.

En el extracto preparado sin preincubación con mercaptoetanol más EDTA, según la primer técnica de preparación de la enzima, el GDP-manosa es relativamente inestable. En un experimento, en el cual se dosó la enzima por el método electroforético, se determinó también que aproximadamente el 50% del GDP-manosa se había descompuesto (cuando al manano se incorpora sólo un 5%). El GDP-manosa parece transferir la manosa a un aceptor soluble en etanol 50% o simplemente libera directamente la manosa como tal (el manano propiamente dicho es insoluble a esa concentra -

ción de alcohol). En el método electroforético de dosaje se corrige por la actividad de esta enzima contaminante lavando el papel antes de ser contado, con etanol 50%. En algunos experimentos se eliminó esta radioactividad sometiendo posteriormente al mismo papel a una cromatografía con el solvente A.

En la tabla X están resumidos los datos obtenidos con diversas enzimas. Se observa que la mayor parte de actividad del sobrenadante, no es de manano sintetasa. Un posterior lavado con etanol 50% o una cromatografía con el solvente A, elimina la casi totalidad de la radioactividad.

Tabla X - Aparición de radioactividad en el origen de la electroforesis que no es debida a la acción de la manano sintetasa.

Tratamiento	Actividad			
	Sedimento de 20.000 xg		Sobrenadante de 20.000 xg	
	1	2	1	2
	cuentas/min.			
Ninguno	1350	830	1650	1070
Lavado con etanol 50%	-	790	-	220
Cromatografía con solvente A	1280	-	160	-

Se dosa la actividad enzimática preparada según la primer técnica (ver "métodos") por el método electroforético, pero omitiendo a menos que es té indicado, el lavado final con etanol 50%. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. La cromatografía con el solvente A se hace sobre el mismo papel y en la misma dirección que la electroforesis. El lavado con etanol 50% se describió en "métodos".

En la tabla XI se observa que la enzima contaminante es igualmente activa sobre manosa-1-P que sobre GDP-manosa.

Tabla XI - Especificidad de sustrato de la enzima que libera radioactividad soluble en etanol 50%.

Sustrato	Medida antes de cromatografía.		Medida después de cromatografía.
	Incorporación	Sustrato transformado	Incorporación
	cuentas/min.	%	cuentas/min.
^{14}C GDP-manosa	3300	20	150
manosa-1-P ^{14}C	3700	10	50

Se dosa una alícuota directamente por el método electroforético, pero sin lavar al final el papel con etanol 50%. Otra alícuota se somete luego a una cromatografía en el mismo sentido que la electroforesis, con el solvente A.

LOCALIZACION DE LA PARTICULA A LA CUAL ESTA ASOCIADA LA MANANO SINTETASA.

Como la enzima está constituida por una mezcla de partículas subcelulares, se intentó fraccionarlas para determinar a cuál de ellas se encontraba asociada la manano sintetasa.

La enzima fracción sedimentable preparada según la primera técnica, se trató de fraccionar en sus componentes por centrifugación. Esta enzima contiene además de las membranas citoplasmáticas, las partículas intracelulares y residuos de pared celular (ya que estos ensayos se realizaron cuando aún no se había adoptado la técnica de pretratar las levaduras con mercaptoetanol y EDTA). Centrifugando a muy baja velocidad se intentó separar los residuos de paredes, pero se encontró que con esta fracción sedimentaba la mayor parte de la enzima. Como no se quiso tener un preparado que tuviera tantos residuos de pared, se abandonó este camino.

Se ensayaron entonces fraccionamientos con gradientes de sacarosa. La

misma enzima se siembra en la parte superior de un tubo que contiene un gradiente lineal de sacarosa, cuya densidad varía usualmente entre 1,19 y 1,31.

Los gradientes se prepararon en forma discontinua, y se dejaron 16 horas a 4°C para permitir la equilibración. Los tiempos y velocidades de centrifugación variaron de un experimento a otro, de manera que en algunos las partículas deben haber llegado a una posición estable (isopícnico) mientras que en otros se interrumpió antes (velocidad de sedimentación). Desde el punto de vista de separación del material en bandas discretas, el mejor resultado se obtuvo cuando se centrifugó 30 minutos a 5.000 revoluciones/minuto en el rotor SW-25 de una centrífuga "Spinco". Las diversas fracciones que se obtienen se diluyeron con buffer y se centrifugaron nuevamente para eliminar la sacarosa. Luego se resuspendieron en un volumen igual al volumen inicial de la muestra total previo fraccionamiento. De esta manera se pueden sumar directamente las actividades de cada fracción para determinar el rendimiento en actividad enzimática.

En la figura 27 se dibujó la distribución usual que se observó del material en el gradiente. Se anotaron las densidades de cada zona y la observación al microscopio. Se nota que las partículas de S. carlsbergensis se fraccionaron sólo parcialmente.

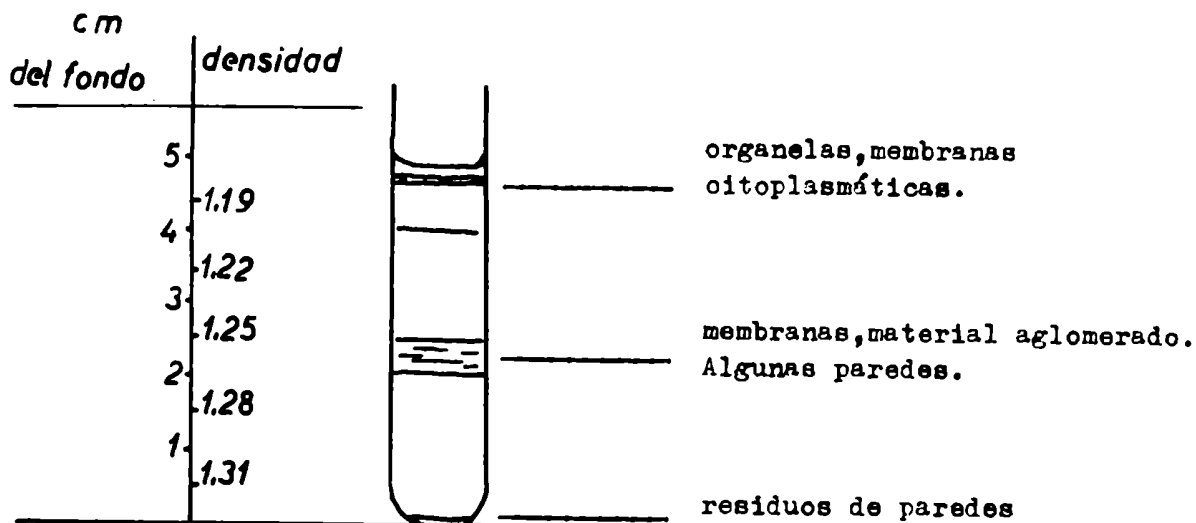


Figura 27: Gradiente de sacarosa, 25 min. a 7000 rev./min., rotor SW-25 de una centrífuga "Spinco".

En la figura 28 está representada la actividad en función de la altura del tubo. En casi todos los experimentos se encontró que las fracciones inferiores eran las más activas, aunque en una curva se vio que aumentaba la actividad hacia la parte superior del tubo. En la figura 28 se determinó además de la actividad de la enzima, la actividad de la enzima que produce material no precipitable por etanol 50 % y además el manano en cada fracción.

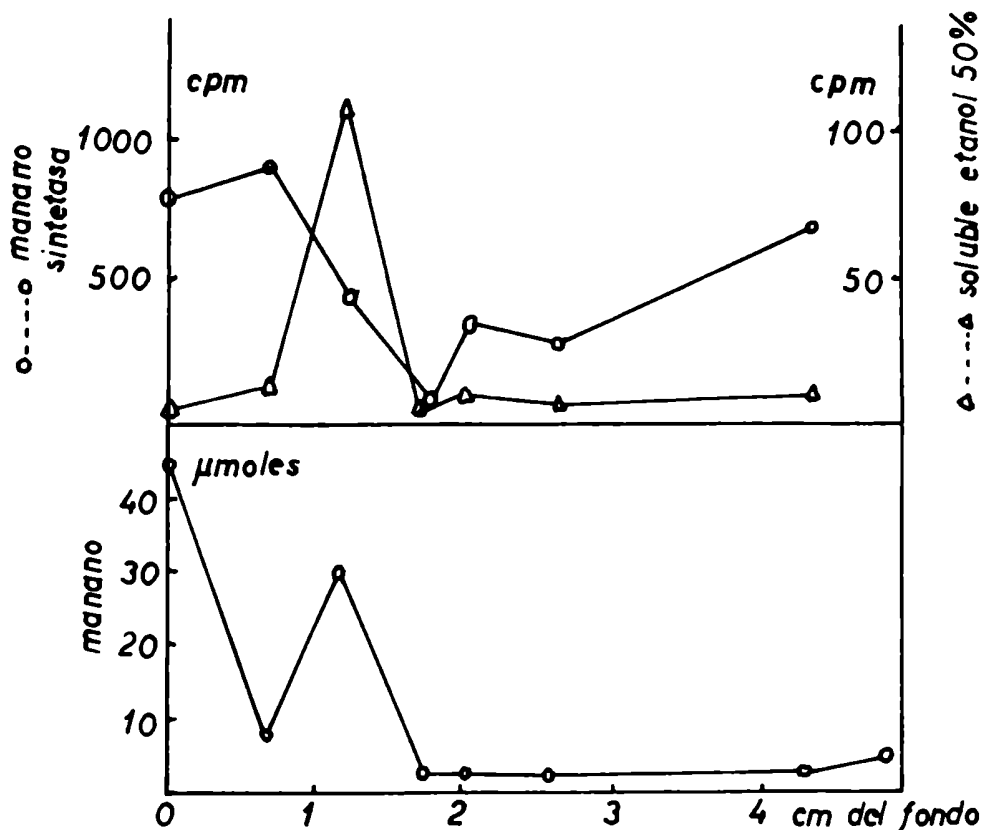


Figura 28: Fraccionamiento de la manano sintetasa en gradiente de sacarosa. Se representó en el mismo gráfico pero con distinta es cala, las actividades de manano sintetasa y de la actividad que da un producto soluble en etanol 66%. Se determinó además el contenido en manano de cada fracción, que se expresó como μ moles de anhidro manosa.

PROPIEDADES DE LA ENZIMA

En la figura 29 A está representada la actividad de la enzima en función del tiempo. Este tipo de curva es el que se obtuvo usualmente. En la figura 29 B está representada la curva que dieron algunos preparados. En todo caso la actividad enzimática se midió siempre en la zona proporcional al tiempo. Se observa en el segundo tipo de curva de tiempo, un achatamiento después de los 60 min., de manera que la velocidad de síntesis de manano decae prácticamente a cero.

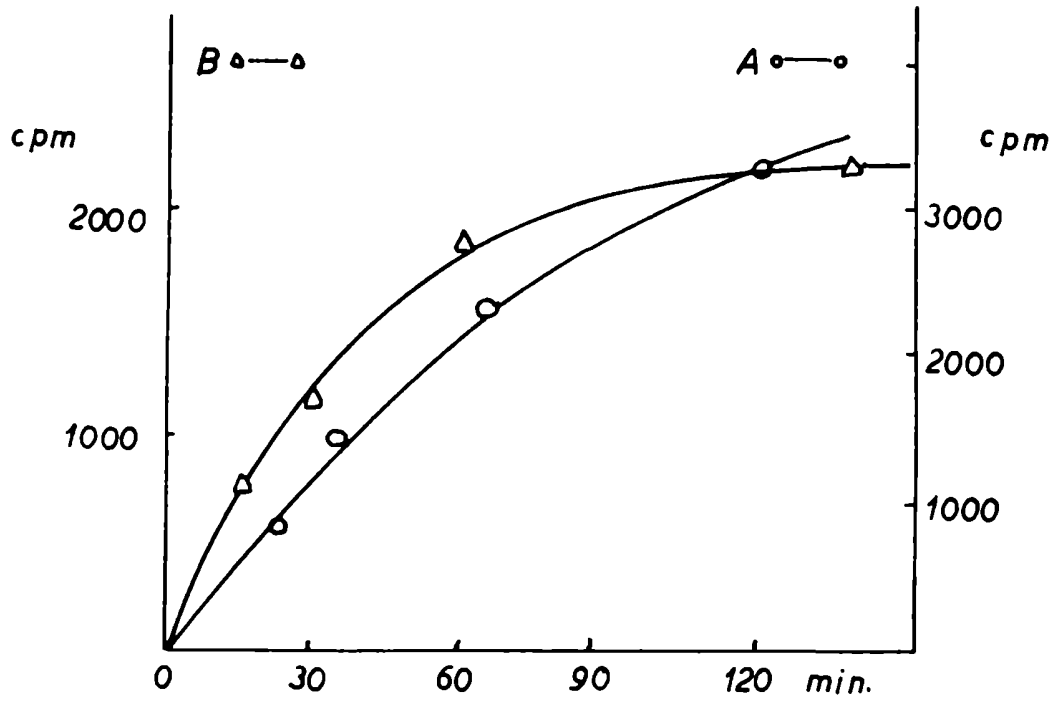


Figura 29 A y B : Curva de actividad en función del tiempo de reacción.

Se empleó el dosaje por precipitación directa de la mezcla de reacción con etanol 66% (ver métodos experimentales).

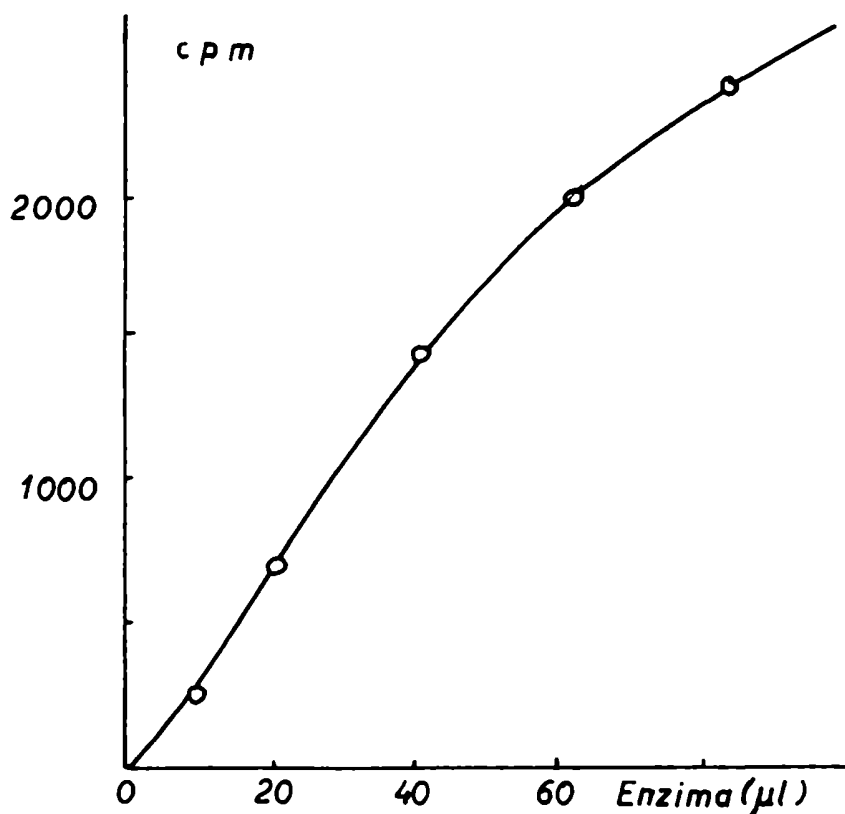


Figura 30: Efecto de la concentración de enzima sobre la incorporación a manano.

En la figura 30 se representó la curva de concentración de la enzima. La mezcla de reacción se llevó a 0,09 ml de manera de obtener más puntos experimentales. Se trabajó en condiciones tales que la velocidad de síntesis era proporcional a la concentración de la enzima.

En la figura 31 se observa el efecto de la temperatura sobre la actividad. Se nota un efecto pronunciado. A 0° la actividad es prácticamente nula.

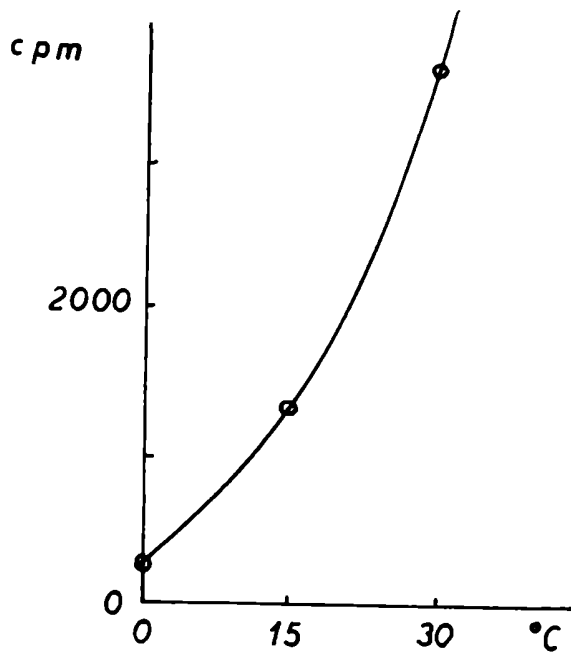


Figura 31: Efecto de la temperatura sobre la actividad de la manano sintetasa.

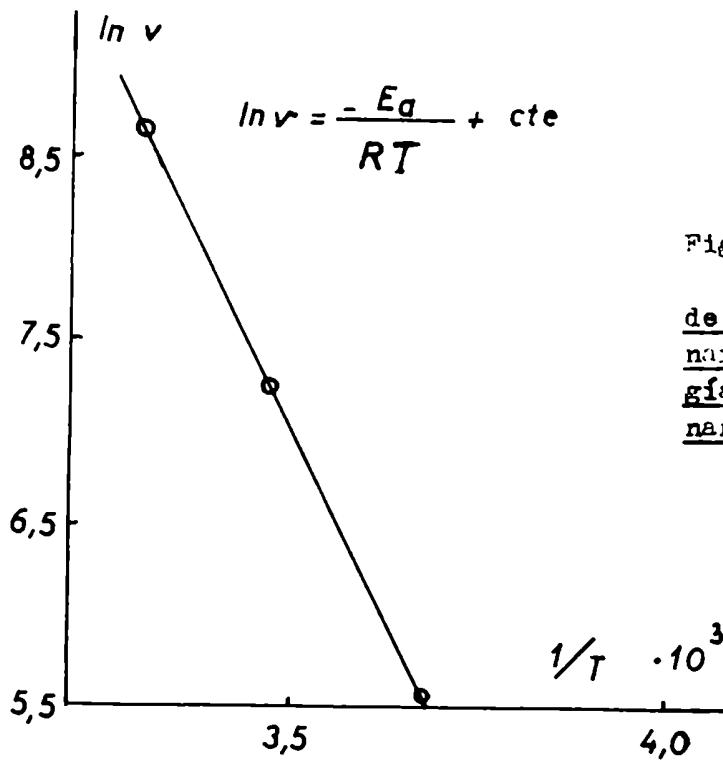


Figura 32: Representación de la ecuación de Arrhenius, para determinar gráficamente la energía de activación de la manano sintetasa.

En la figura 32 se calculó gráficamente la energía de activación de la manano sintetasa, usando los datos de la curva de temperatura. Se encontró una energía de activación de 16 Kcal./mol.

En la tabla XII se observa el efecto de distintos metales sobre la actividad de la enzima. Se comprobó visualmente que ninguno precipitaba al GDP-manosa. El Fe^{III} produce un precipitado cuando se lo agrega a la enzima pero aparentemente no es el GDP-manosa, ya que un blanco incubado en ausencia de enzima y agregada ésta antes de sembrar en la electroforesis, no da incorporación.

Tabla XII - Efecto de cationes sobre la actividad de la manano sintetasa.

Cación	Actividad (%)
	%
Ninguno	10
Mn	100
Co	30
Fe^{II}	38
Fe^{III}	10
Ni	11
Mg	12
Ca	15
Zn	5

(%) Tomando la actividad con Mn^{++} como el 100%

En la figura 33 A se representó una curva de concentración de Mn^{++} . Se usó escala semilogarítmica para poder abarcar todo el rango de con -

centraciones de Mn^{++} , Se notó que el aumento de la actividad es muy rápido, y la zona de concentración de Mn^{++} donde se produce este aumento, varía de una enzima a otra. En escala lineal (figura 33 B), la curva de concentración de Mn^{++} es bifásica.

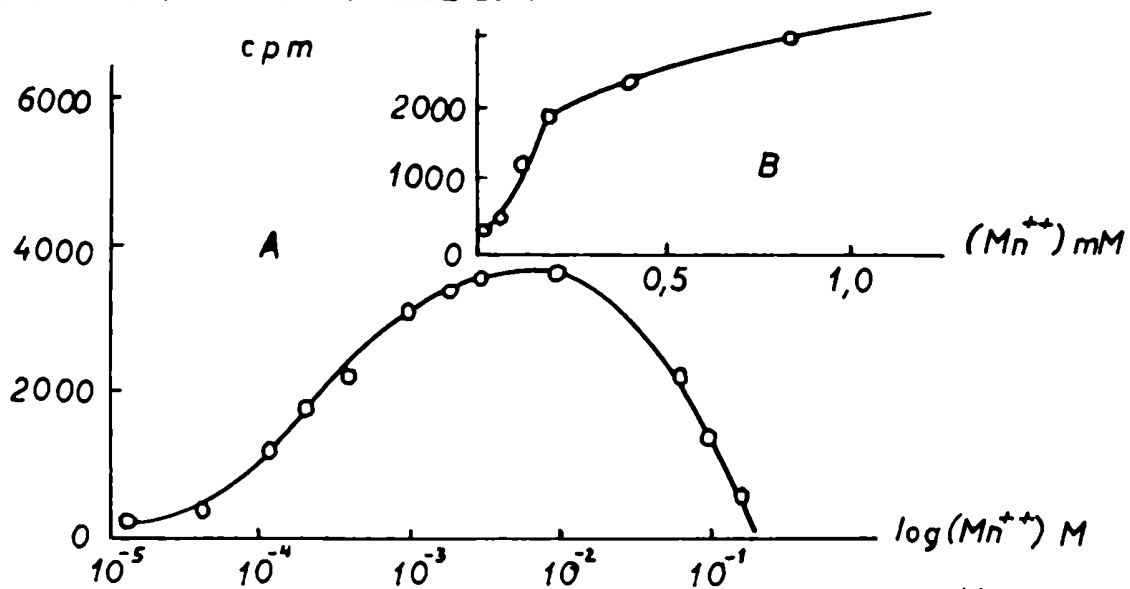


Figura 33 A y B: Efecto de concentraciones crecientes de Mn^{++} sobre la actividad de la manano sintetasa.

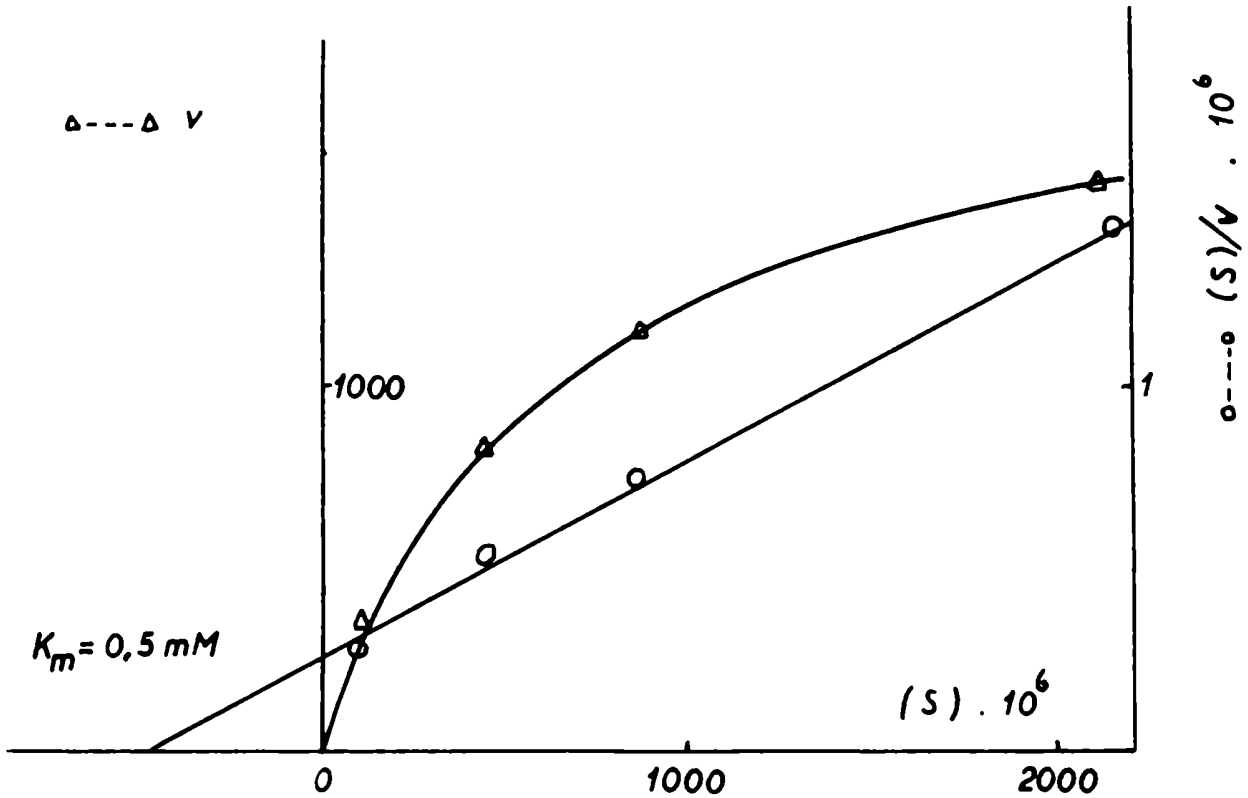


Figura 34: Efecto del aumento de la concentración de GDP-manosa sobre la velocidad de la reacción. ((S) representa la concentración de GDP-manosa)

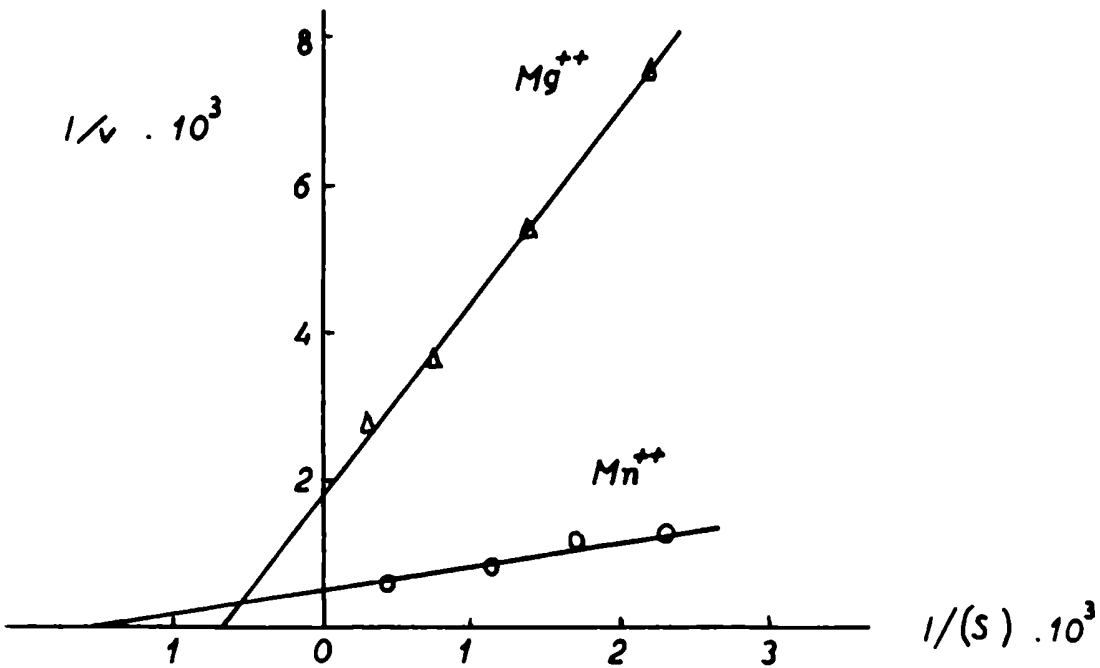


Figura 35: Representación de Lineweaver y Burk (105) en presencia de Mn^{++} y de Mg^{++} .

En la figura 34 se representó la actividad en función de la concentración de GDP-manosa. Se obtuvo la constante de Michaelis representando el cociente concentración de sustrato a velocidad de reacción, en función de la concentración del sustrato. La ecuación es: $S/v = K/V + (1/V)S$ (106). En la figura 35 se representó el gráfico de inversas usual y se incluyó el que obtiene con el Mg^{++} .

En la tabla XIII se muestra la especificidad de la enzima. La actividad con los sustratos ensayados fue menor que el 15% de la actividad con GDP-manosa.

En la figura 36 se representó el efecto del pH sobre la actividad de la enzima. El pH anotado es el que da una alícuota de la enzima con todos los agregados menos el GDP-manosa. Para llevar a pH superiores a 6,5, por ejemplo a pH 7,2, hay que agregar buffer 0,05 M de aproximadamente una unidad más de pH.

Con los diferentes buffers usados no hubo que aplicar correcciones, ya que a un mismo pH con cada par de buffers se observó la misma actividad.

Tabla XIII - Especificidad de la manano sintetasa.

Sustrato	m μ moles	actividad específica en cpm/ μ mol.	m μ moles incorporados.
GDP-manosa	140	240.000	6
ADP-manosa	170	600.000	0,8
manosa-1-P	120	400.000	0,1
manosa	120	370.000	0,5

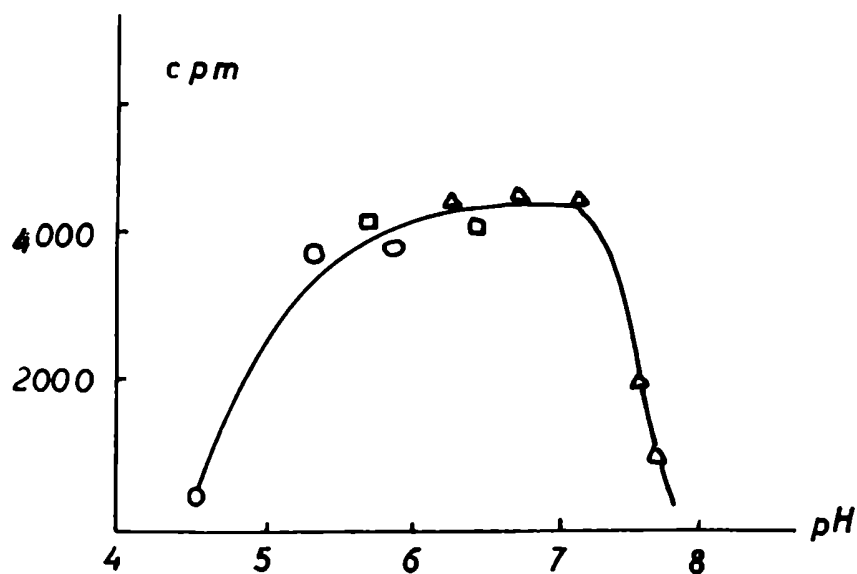


Figura 36: Curva de pH de la enzima. En la mezcla de reacción usual, se emplearon los siguientes buffers: o — o acetato de K 0,05M, □ — □ maleato de K 0,05M y Δ — Δ imidazol-Cl 0,05M.

En la tabla XIV se representó el efecto de diversos metabolitos sobre la actividad de la enzima. En el caso de complejantes de aniones, como el Hg^{++} , podría ser que haya eliminado el sustrato complejándolo. Por otra parte no se produjo precipitación del GDP-manosa. En el caso de complejantes de cationes, tampoco se ha determinado si su acción es similar al EDTA, o sea eliminar los iones Mn^{++} de la solución. El p-Cl-mercuri-benzoato no tiene efecto alguno sobre la actividad.

Tabla XIV - Efecto del agregado de distintas sustancias a la mezcla de reacción.

Agregado	Concentración	Actividad (')
	mk	
ninguno	-	100
EDTA	10	16
sulfato de Cu	5	110
cloruro mercurico	5	21
espermidina	10	108
p-Cl-HgC ₆ H ₄ COO ⁻	0,1	100
sacarosa	1	105
"	100	100
"	circa 1500	31
β-mercaptoetanol	50	87
ATP	15	42
acetato de amonio	10	88
fluoruro de K	10	97
"	100	105
citrato	50	39
"	100	23
oligomicina (en etanol)	40 ug/ml	62
azida sódica	0,5	21
Tris-Cl	100	120
acetato de K	60	126
acetato de K	100	146
GMP	3	95
GDP	3	81

(') Se toma la actividad sin ningún agregado igual a 100.

En la tabla XV se anotaron los resultados de los efectos de algunos tratamientos físicos sobre la manano sintetasa. Ya se había observado que en la etapa de protoplasto, la enzima era sensible al sonicado. También se observa una inactivación por detergentes. No se determinó en este caso si la actividad pasó al sobrenadante.

Tabla XV - Efecto de diversos tratamientos físicos sobre la enzima.

Tratamiento	Actividad
ninguno	100
sonicado	49
sonicado y vuelto a centrifugar; actividad en el sedimento	46
Desoxicolato	21
Dodecil-sulfato	28

Se tomó la actividad de la enzima sin tratar igual 100. Los detergentes se eliminaron por centrifugación antes de dosar.

Se ensayó con varias enzimas la posibilidad que tuvieran un requerimiento por un aceptor. En la tabla XVI se anotaron los resultados obtenidos con distintos preparados enzimáticos. Se observa que el factor de activación es del orden del error en la determinación, es decir, despreciable.

En un experimento que no se anotó en la tabla, se repitieron los ensayos con manano y manco-trisacárido dosando la enzima por el método de filtración por "millipore". En el manano retenido per el filtro no se observó un incremento de la incorporación por el agregado de los posibles aceptores, pero existía la posibilidad que se hubiera formado un producto soluble que hubiera pasado por el filtro. Para determinar esto, se eliminó el GDP-manosa remanente del filtrado tratándolo con resina Dowex-1

forma acetato y se midió una alícuota del sobrenadante. Tampoco aquí se observó un efecto de aceptores.

Tabla XVI - Ensayo del requerimiento de factores de la enzima sedimentable.

Enzima		Factor de activación	Aceptor agregado
- aceptor	+ aceptor		
cuentas/min.			
650	860	1,3	E.C. (1)
1.190	1.450	1,22	E.C. (2)
660	730	1,1	E.C. (2)
470	600	1,28	E.C. (1)
470	680	1,45	E.C. (2)
990	1.240	1,25	E.C. (1)
760	650	0,85	manano
1.300	1.230	0,92	manotrisacárido

(1) y (2), extractos calentados de extracto total y de enzima sedimentable a 20.000 xg, respectivamente (primer método de preparación de la enzima). Se los preparó calentando 2 min. a 100°, centrifugando y tomando el sobrenadante. Estos E.C. contienen aproximadamente 0,1 mg de manano endógeno. Donde se indica se agregó 0,15 mg de manano y 0,12 mg de manotrisacárido. La actividad enzimática se midió por el método electroforético.

En la tabla IX se había visto que un 80% de la actividad que no sedimentaba a 20.000 xg, lo hacía luego a 100.000 xg. Podría existir sin embargo, actividad enzimática en el sobrenadante que no es detectable por faltarle aceptor conveniente. Se hicieron varios intentos para detectar esta necesidad de aceptor. En la tabla XVII están resumidos los datos obtenidos para varias enzimas que mostraban algo de actividad en el sobrenadante de 20.000 xg (primera técnica de preparación de la enzima, ver

"métodos"). En la tabla se observa un solo caso donde hubo una activa -
ción apreciable.

Tabla XVII - Efecto de agregados a la actividad de la enzima no sedimen-
table a 20.000 μ g.

Enzima		Factor de activación	Aceptor agregado
- aceptor	+ aceptor		
cuentas/min.			
220	310	1,42	E.C. (1)
210	360	1,65	E.C. (2)
230	720	3,4	E.C. (2)

Se prepararon los E.C. como se describe en la leyenda de la tabla XVI.
Se dosó la actividad enzimática por el método electroforético.

Se ensayó varias veces la posibilidad que la enzima necesitara de
factores que hubieran pasado al sobrenadante. En la tabla XVIII se mues-
tran los datos obtenidos para distintos preparados de enzima sedimenta-
ble a 20.000 μ g (primer método de preparación de la enzima). En un ca-
so se observó una activación de 7,4 veces, que fue la más alta detecta-
da.

Tabla XVIII - Ensayo de requerimientos de la enzima por factores solubles

Enzima		Activación
- factor	+ factor	
cuentas/min.		
160	1180	7,4
320	350	1,1
280	770	4,3
685	895	1,3

Se midió la actividad enzimática por el método electroforético. Las distintas enzimas ensayadas fueron las sedimentables por 20.000 xg de la primera técnica de preparación de la enzima. El factor agregado fue el sobrenadante de 20.000 xg. Los valores están corregidos por la incorporación que cataliza el sobrenadante mismo.

La tabla XIX muestra los resultados de un experimento en el cual se estudiaron algunas propiedades de este factor activante. Aparentemente no sedimenta a 100.000xg y tendría alto peso molecular ya que en columna de gel de dextrano Sephadex G-25 sale inmediatamente después del volumen muerto. Se nota que la activación ha disminuído respecto al experimento anterior (tabla XVIII). Entre un ensayo y otro, el factor se guardó a -15°, 20 horas. Las veces que se ensayó, no se volvió a encontrar activación por sobrenadante.

Tabla XIX - Propiedades del factor soluble que activa la enzima sedimentable a 20.000 xg.

Agregados	Actividad (°)	Activación
	Cuentas/min.	
ninguno	250	-
Sobrenadante 5×10^4 g min.	450	1,8
Sobrenadante 100.000 xg	550	2,2
Sobrenadante 100.000 xg pa sado por Sephadex G-25	790	3,1

(°) Se resta a la incorporación las cuentas que se determinaron son debidas a los sobrenadantes per se. Se dosó la enzima - por el método de la electroforesis.

ESTRUCTURA DEL MANANO BIOSINTETIZADO

El producto de la reacción enzimática fue identificado tentativamente por Algranati, Carminatti y Cabib (1). Los autores de ese trabajo purificaron con reactivo de Fehling, hidrolizaron y luego sometieron los productos de hidrólisis a cromatografía y electroforesis. En cada una de estas etapas, determinan que la radioactividad por μ mol de manosa permanece constante. Este resultado demostró que el producto es un polisacárido de manosa.

Sin embargo, este experimento no identifica al producto enzimático como el manano auténtico de pared celular de levaduras. Varias alternativas podrían explicar igualmente bien los resultados obtenidos. Por ejemplo, podría haberse sintetizado un polisacárido, pero de estructura dife-

rente al manano auténtico. Una posibilidad sería que se forme únicamente la cadena fundamental $\alpha 1 \rightarrow 6$ y no las ramas laterales $\alpha 1 \rightarrow 2$ y $\alpha 1 \rightarrow 3$ (ver figura 4). También podría ser que ocurra lo contrario, es decir, que se formen sólo las ramas laterales sobre un aceptor no ramificado endógeno. Otra posibilidad sería que la enzima agregara una sola manosa a cada extremo no reductor de manano aceptor endógeno o sea que fuera incapaz de adicionar manosa en forma consecutiva.

Para demostrar entonces que el producto era efectivamente manano auténtico, había que comparar las estructuras de manano enzimático formado in vitro, con el natural extraído de la pared.

Se decidió aplicar un método de degradación química parcial que produjera en lo posible, oligosacáridos de dos, tres y cuatro unidades de manosa. Estos serían, si se observa la estructura propuesta para el manano (ver figura 4), representativos de las uniones existentes en el polisacárido.

El método de degradación parcial aplicado, consiste en una acetólisis seguida de una desacetilación de los acetatos de oligosacáridos producidos (ver "Métodos"). Para trabajar con cantidades parecidas de ambos mananos, se hizo la extracción del manano de pared de células crecidas en medio radioactivo de manera que el manano tuviera una actividad radioactiva específica similar al enzimático.

En la figura 4 de la introducción, se explica cuáles uniones son atacadas preferentemente por este método. La mezcla obtenida se resuelve por cromatografía en papel.

Bate-Smith y Westall (107) establecen una relación entre la estructura de un compuesto y su R_F . Se deduce para nuestro caso, que si las uniones que poseen los oligosacáridos son de un mismo tipo, una representación de $\log. (1/R_F - 1)$ en función de las manosas en el oligosacárido

debe dar una recta. En la figura 37 vemos que esta relación se cumple incluso para el caso del tetrasacárido, que según Lee y Ballou (23) tendría una unión $\alpha 1 \rightarrow 3$.

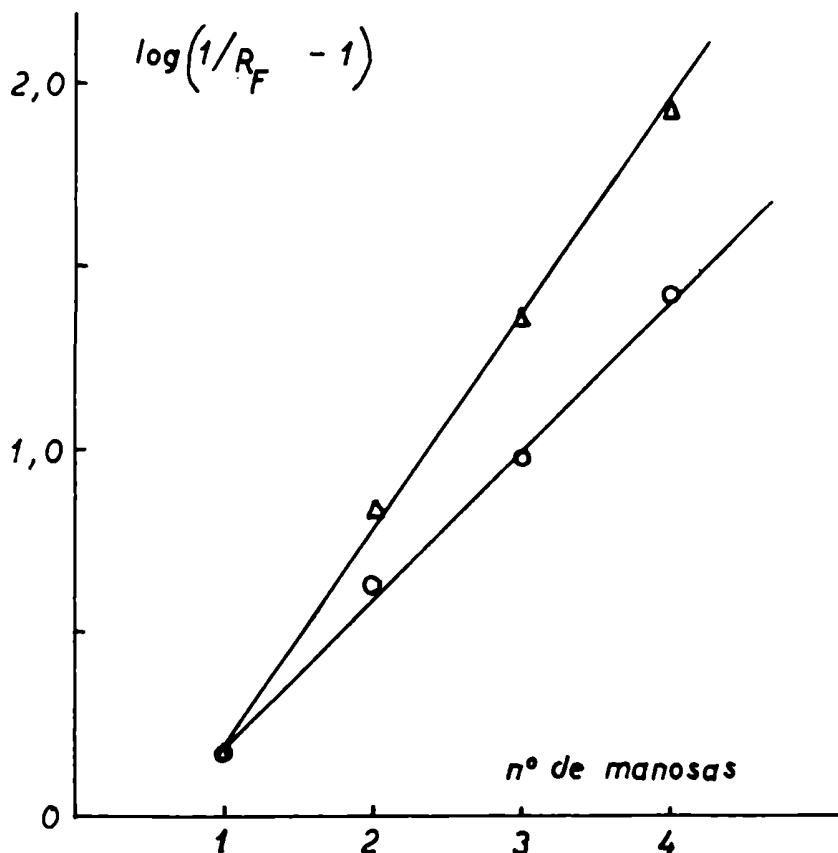


Figura 37: Estructura de los oligosacáridos de manano. Se representa la relación de Bate - Smith y Westall (107) para los oligosacáridos separados por cromatografía con el solvente E: Δ — Δ y con el solvente C: o—o

En la figura 38 se observa el gráfico que se obtuvo pasando la cromatografía de los oligosacáridos de cada manano, por un detector de radioactividad en tiras de papel "Scanner" (ver "métodos"). Bajo cada pico de radioactividad se anotó el porcentaje de la radioactividad que corresponde a ese oligosacárido, determinado por elución y medición en planchas en contador de flujo gaseoso. Se observa que el aspecto de los cro-

matogramas y el porcentaje de radioactividad en cada pico para ambos mananos es muy similar. El manano enzimático carece aparentemente de tetrasacárido y libera algo más manosa.

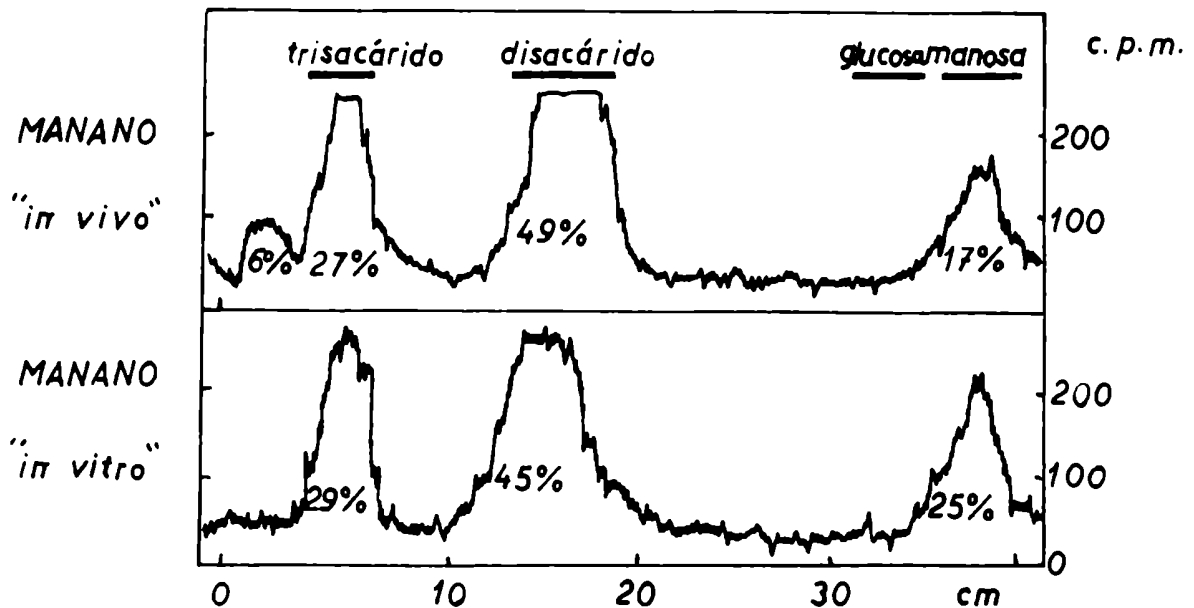


Figura 38: Productos de la acetólisis de manano. Se aisló manano de "Saccharomyces carlsbergensis" 74, crecido con glucosa- C^{14} como única fuente de carbono. Por otra parte se aisló el manano radioactivo obtenido en una incubación de la enzima, con GDP-manosa- C^{14} como sustrato. Alícuotas de ambos mananos fueron sometidas a la acetólisis y los productos desacetilados se corrieron en cromatografía de papel con el solvente C. La distribución de la radioactividad en el papel fue determinada con un "scanner" Nuclear Chicago. El número de bajo de cada pico indica el porcentaje de la radioactividad total que le corresponde.

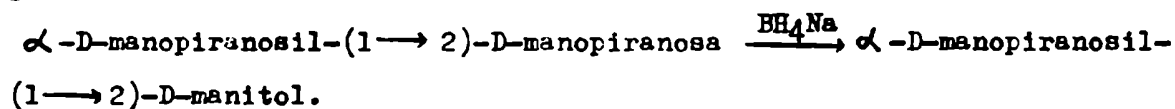
Tabla XX - Rendimiento en la obtención de oligosacáridos de manano por el método de Lee y Ballou (23).

Experimento	manano ¹⁴ C obtenido "in vivo"		manano ¹⁴ C obtenido "in vitro"	
	1	2	1	2
	cuentas/min.		cuentas/min.	
iniciales	18000	18000	13000	13000
mezcla de acetatos de oligosacáridos	13000	11500	12500	10500
mezcla de oligoma- nanos	11500	7500	9000	10000
rendimiento final	65%	41%	70%	77%

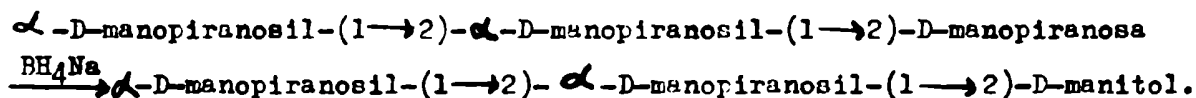
La tabla XX muestra el rendimiento en dos experimentos, de cada etapa de la acetólisis. Menos en un caso, que se debe posiblemente a una pérdida mecánica, el rendimiento fue del orden del 70%.

Estos resultados demuestran que el manano biosintetizado por la manano sintetasa es muy parecido al natural.

Para determinar si la enzima adiciona manosas en forma consecutiva, se decidió comprobar si por lo menos adiciona dos y tres manosas consecutivas. Para esto se aislaron di y trisacáridos obtenidos por acetólisis del manano enzimático y se los sometió a una reducción con boro hidruro de Na según:



Para el trisacárido la reacción sería:



Posteriormente se hidrolizó completamente con ácido y los productos de hidrólisis se separaron por electroforesis en papel con borato de Na como electrolito. Este método fue el único de los ensayos con el cual se pudo separar manosa de manitol (ver figura 11A).

El resultado de un experimento de este tipo se muestra en la figura 39A donde la radioactividad sobre el papel se midió como se describe en "métodos" y cada pico se midió cuantitativamente eluyéndolo con agua. Debajo de cada pico están indicadas las cuentas/mimuto que se midieron en planchetas en un contador de flujo gaseoso.

En la tabla XXI se observa que en el caso del disacárido tanto el manitol como la manosa tienen la misma radioactividad mientras que en el trisacárido la manosa tiene aproximadamente el doble que el manitol. Esto demostraría que ambos oligosacáridos tenían manosas igualmente radioactivas. Esto sólo se explica si la manano sintetasa catalizó la incorporación al polisacárido de cada una de ellas.

Como control, este experimento se hizo también con disacárido y trisacárido del manano radioactivo extraído de pared celular. En la figura 39 B se aprecia que la distribución de la radioactividad entre manosa y manitol es muy similar sino idéntica a la obtenida del manano enzimático.

Para verificar que la hidrólisis de los oligosacáridos reducidos fuese completa, se cromatografió una alícuota de la electroforesis de manosa y manitol con el solvente C. En la electroforesis en borato (ver figura 11 A) los oligosacáridos reducidos migran próximos a la manosa pero en la cromatografía mencionada se separan bien. En la figura 40 se

confirma que la hidrólisis fue completa, ya que sólo hay manosa y manitol (en este solvente ambos compuestos tienen el mismo R_f).

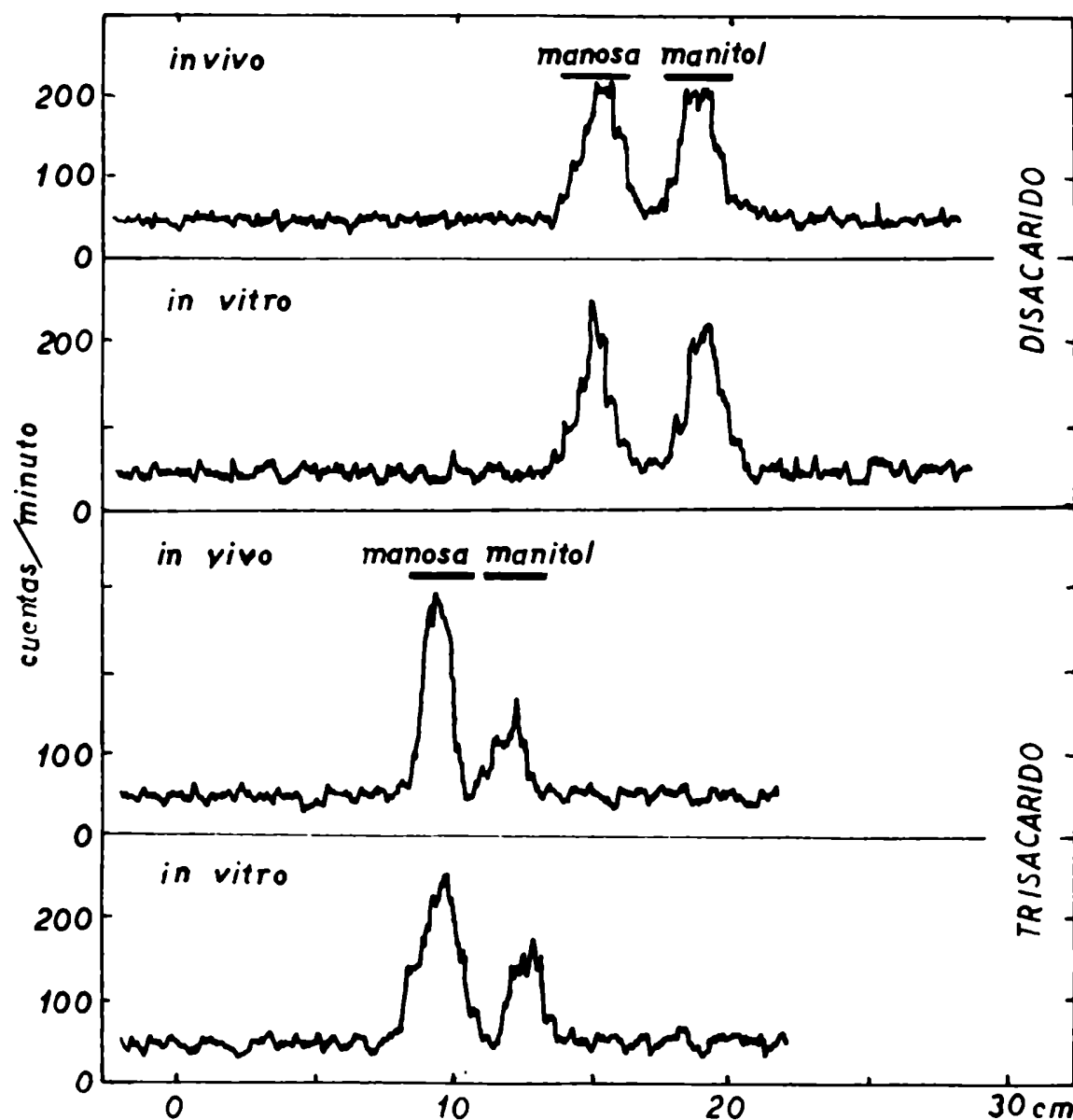


Figura 39 A y B: Reducción e hidrólisis de oligosacáridos de manano. Se trató una alícuota (5500 cpm) de manotrisacárido obtenido por elución de un cromatograma similar al de la Fig.38 con borohidruro de sodio 24 horas a temperatura ambiente. Se hidrolizó el produco

to de la reducción por 3 horas a 100° con SO₄H₂ 2,3 N. Se pasó el hidrolizado por una columna de resina de intercambio MB-3 y se sometió a electroforesis en papel con solvente H como electrolito. Se obtuvo la distribución de radioactividad representada en la figura, con un "scanner" Nuclear Chicago. Los picos correspondientes a manosa y manitol se eluyeron con agua y contaron como se describe en "método".

Tabla XXI - Relación de actividad de manosa a manitol en oligosacáridos de manano natural, "in vivo" y de manano obtenido "in vitro".

Manano	Oligosacárido	cuentas/min.		Relación manosa/manitol
		manosa	manitol	
in vitro	disacárido	1270	1060	1.2
	trisacárido	1440	670	2.2
in vivo	disacárido	1090	1100	1.0
	trisacárido	2380	1245	1.9

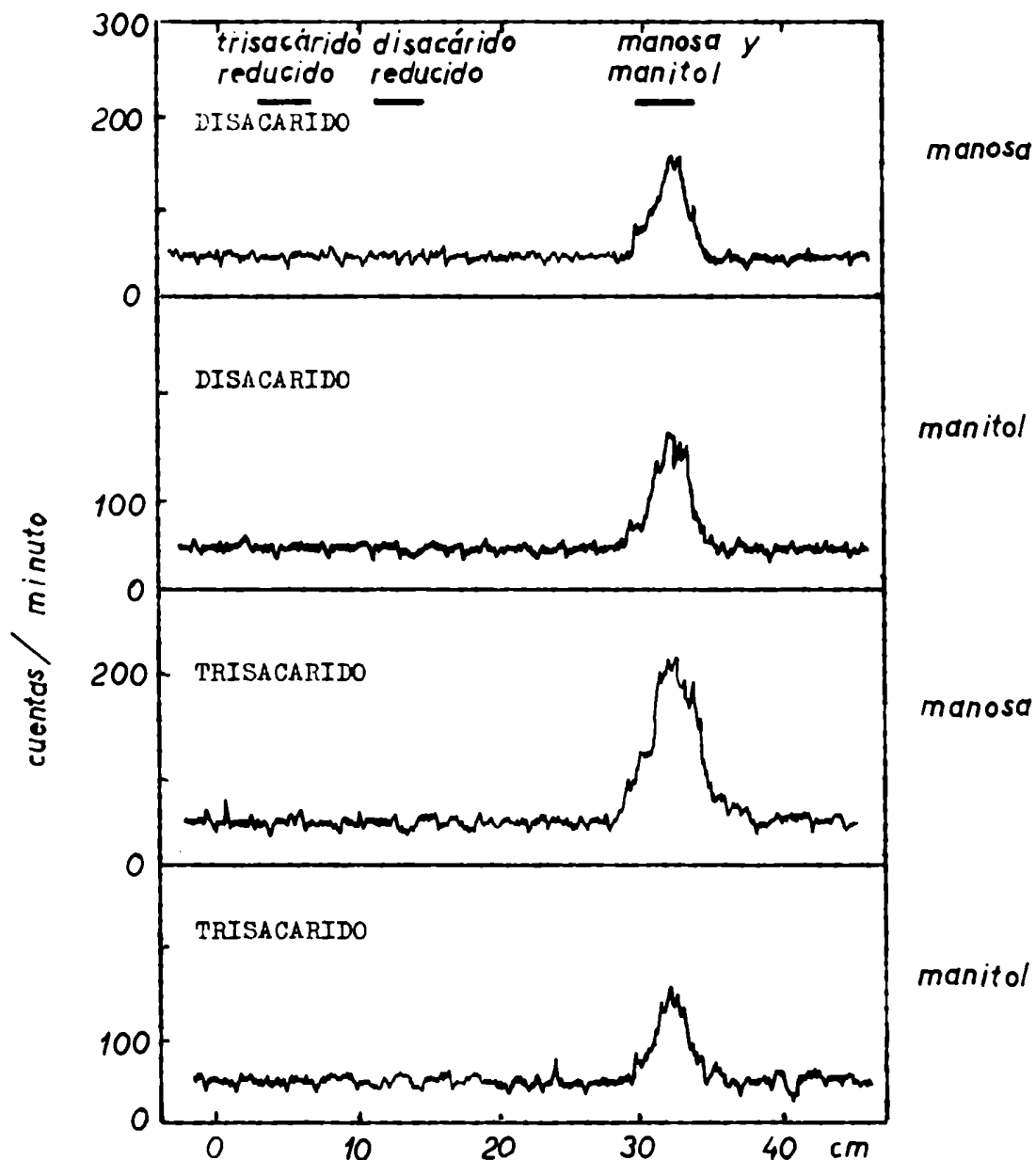


Figura 40: Control de la hidrólisis de los oligosacáridos de manano reducido. Se resuelve por cromatografía con el solvente C, la manosa y manitol eluidos de la electroforesis de la figura : 39 A.

NUCLEOTIDO QUE SE LIBERA EN LA REACCION

En la transferencia catalizada por la manano sintetasa de manosa del GDP-manosa al manano aceptor, de la parte nucleotídica de la molécula - del GDP-manosa podría liberarse GDP, GMP o una mezcla de ambos. Como se dosa la enzima midiendo la incorporación de manosa ^{14}C , no se determina qué ocurre con el resto de la molécula de GDP-manosa.

En el caso especial de la manano sintetasa donde se cataliza la síntesis de un compuesto que está ubicado del lado exterior de la membrana citoplasmática a partir de un sustrato que se encuentra del lado inte -- rior, es importante determinar cómo se libera el nucleótido. Cada posibi -- lidad, señala un mecanismo posible de síntesis. Por ejemplo, la libera -- ción de GMP podría indicar la operación de un mecanismo similar al des -- cripto para la síntesis del mucopéptido de bacterias Gram positivo (73) en donde los azúcares se unen primero como fosfo azúcares a un lípido in -- termediario. En cambio, la liberación de GDP indicaría la operación de un mecanismo donde la transferencia de la manosa se haría directamente al manano.

Se quiso determinar la estabilidad del GDP, uno de los productos más probables, frente a la enzima. Para esto se preparó GDP- ^{32}P como se indi -- ca en "métodos". En la tabla XXII se dosó la actividad degradante de GDP midiendo al finalizar la reacción, la radioactividad no absorbible al car -- bón. Se utilizó la técnica de Cabib, Carminatti y Woyskovsky (85), pero utilizando ácido fórmico en vez de perclórico, ya que éste no es volátil e introduce errores en la medida de la radioactividad. Se observa en la tabla XXII que sin protección, aproximadamente 70% del GDP desaparece en 15 minutos de incubación. Este es un tiempo relativamente corto para la manano sintetasa. Si se agrega GDP no marcado, la degradación del GDP se reduce a un 25%.

Tabla XXII - Estabilidad del GDP en extractos de manano sintetasa.

Agregados	Absorbido sobre carbón	Sobrenadantes de la absorción sobre carbón.
	cuentas/minuto	
sin incubar	4330	220
ninguno	1640	3870
0,25 μ moles de GDP ³¹ -P	3560	1330

La mezcla de reacción contiene: 2,25 μ moles de imidazol-Cl pH 6,5, 0,09 μ moles de sulfato de magnesio, 0,15 μ moles de cloruro de Mn⁺⁺, 0,004 μ moles de GDP³²-P (5.10⁶ cuentas/min. μ mol) y 20 μ l. de enzima en un vólvumen final de 50 μ l. Se incuba 15 min. a 30°C. Se detiene la reacción agregando ácido fórmico 0,5 N. Se centrifuga y el sobrenadante se trata con 17 mg de carbón. Se absorbe así el GDP mientras que el fosfato inorgánico permanece en solución.

Para mejorar aún más la protección del GDP, se estudió el efecto - del F⁻ sobre la fosfatasa de GDP. Ya se vio en la tabla XIV que el fluoruro no inhibe a la manano sintetasa. Se incubó GDP con Mn⁺⁺ y enzima, y se midió la liberación de P₁. En la figura 41 se representó esta liberación de P₁ en presencia y en ausencia de fluoruro. Se observa que la hidrólisis del GDP se reduce a la mitad.

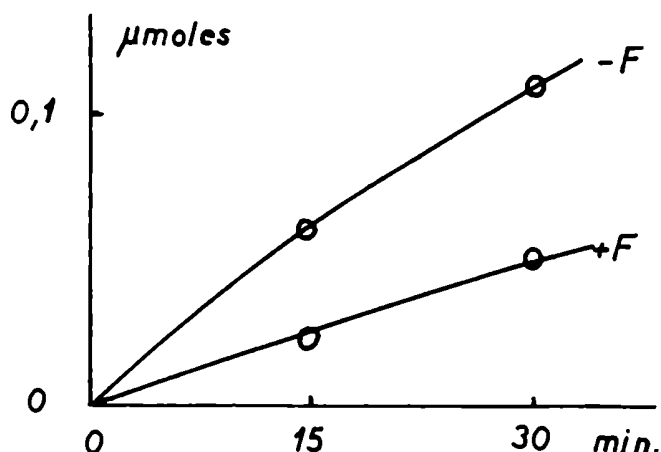


Figura 41: Estabilidad del GDP en presencia y en ausencia de fluoruro. Se mide a distintos tiempos la liberación de P₁.

Habiendo logrado condiciones para que el GDP no se degrade demasiado rápidamente, se decidió dosarlo por el método de Leloir y Goldemberg (108). En este método, mediante la piruvato kinasa, fosfoenolpiruvato y GDP dan GTP y piruvato. El piruvato se dosa luego por su fenil-hidrazona en medio alcalino. Para poder medir cantidades del orden esperado, se redujo el volumen final de la reacción a 0,61 ml. En esta forma el coeficiente de absorción molar es 9,1. Sin embargo, debido al blanco excesivo de la enzima, que por sí sola da tanto color como aproximadamente 30 μ moles de GDP, se abandonó esta técnica.

Se decidió entonces utilizar GDP-manosa marcado en el nucleótido. De manera de poder medir simultáneamente formación de manano, se empleó otro isótopo, distinto del ^{14}C que marca la manosa. Como el ^{32}F es de vida media muy corta si se compara con el tiempo que toma la síntesis química del GDP-manosa a partir de GTP, se decidió utilizar tritio.

Se efectuaron entonces incubaciones con GDP-manosa marcada con ^3H en la guanosina y con ^{14}C en la manosa. En la leyenda de la tabla XXIII se describe la mezcla de reacción. Se hacen controles con cada isótopo por separado. Se mide la radioactividad como se indica en "métodos".

Para la separación de los productos, y del sustrato remanente se ensayaron varias técnicas. En la figura 42 está representado un cromatograma bi-dimensional, en el cual se colocó la mezcla de reacción directamente sobre el papel. Se puede notar que aunque en la primera dimensión la separación es deficiente, resulta aceptable en la segunda dimensión.

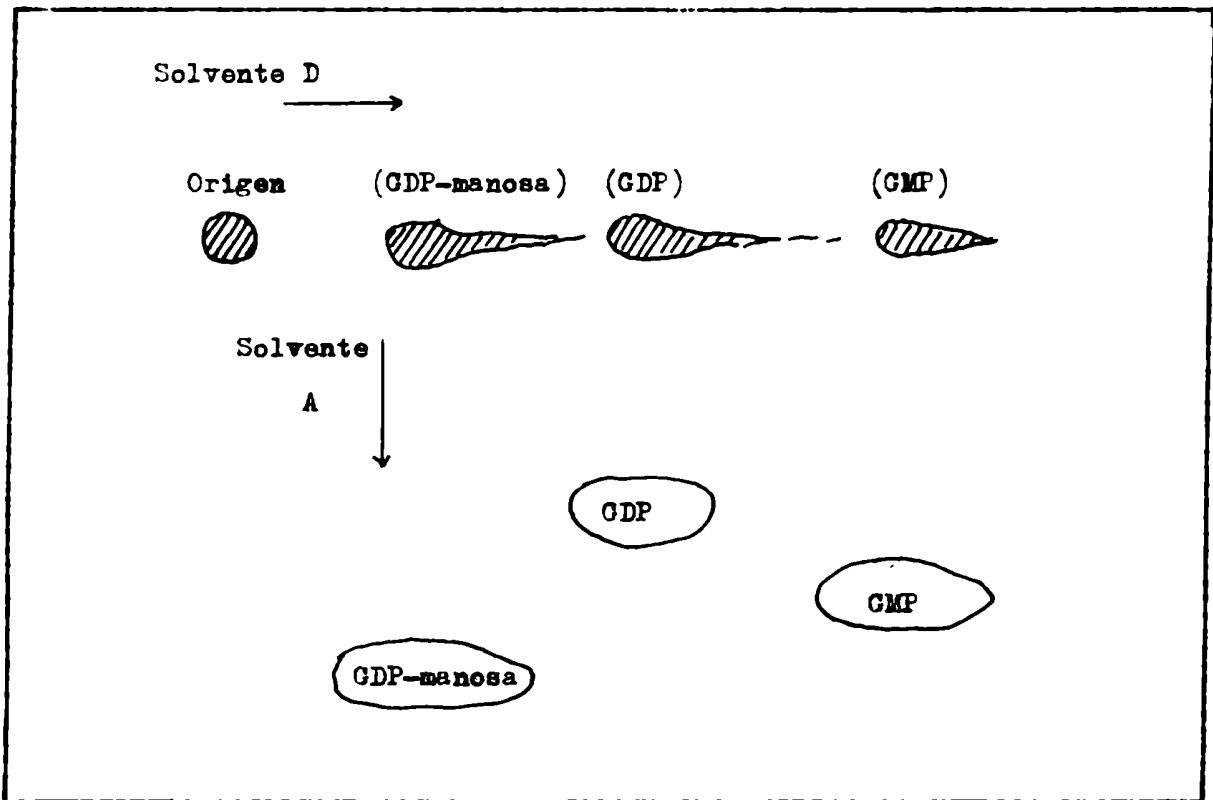


Figura 42: Cromatografía bidimensional de una mezcla de GDP-manosa, GDP, GMP y enzima. Se cromatografió la mezcla de reacción con el solvente D en la primera dimensión y con el solvente A en la segunda. Se usó papel Whatman N° 3 MM.

Sin embargo, la cromatografía bidimensional con estos solventes es muy lenta de manera que después de los primeros experimentos se hicieron distintos ensayos para mejorar la cromatografía con el solvente D, pero en una sola dimensión.

En la figura 43 se observa que si la mezcla de reacción es tratada con etanol 66% o filtrada por "millipore" y se elimina posteriormente el Mn^{++} con resina catiónica, la mezcla de nucleótidos se resuelve en forma aceptable en una sola dimensión.

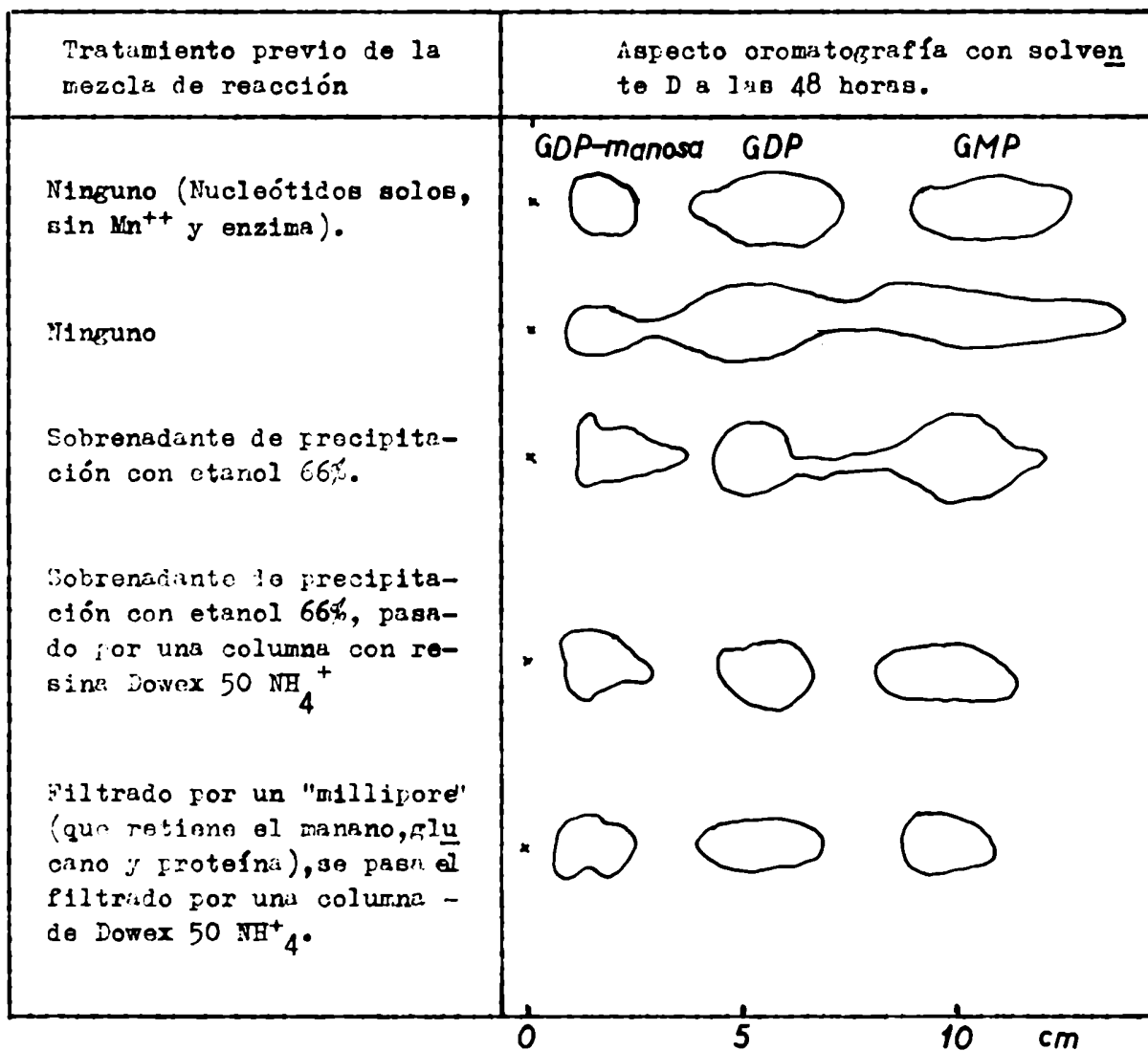
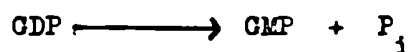


Figura 43: Separación por cromatografía de GMP, GDP y GDP-manosa en presencia de enzima. La mezcla sembrada es la descrita en la leyenda de la figura XXIII. Se revela como se indica en "métodos".

Con ambos métodos cromatográficos se hicieron varios experimentos para determinar la estequiometría de la reacción catalizada por la manano sintetasa. Se coloca como sustrato GDP-manosa ¹⁴C y ³H y se mide simultáneamente la formación de manano, GDP y GMP. En la leyenda de la tabla XXIII se describe la mezcla de reacción empleada. Al final de la incubación, se detiene la reacción enfriando y agregando 0,5 μmoles de EDTA. En

experimentos en que se usó la cromatografía bidimensional, se sembró la mezcla de reacción directamente sobre el papel. En cambio, cuando se usó la cromatografía en una sola dimensión (figura 43), se pasó la mezcla de reacción por filtro de nitrato de celulosa "millipore". Para medir la incorporación a manano el filtro se trató como se describe en "métodos". Por otro lado, el filtrado se pasó por una columna de Dowex 50 forma amonio, el eluido se concentró al vacío y se sembró sobre Whatman N° 3 MM y resolvió con el solvente D.

Como se vio en la figura 41, la protección del GDP no es completa. La reacción de descomposición sería:



Se determinó que también el GMP se descompone, liberando P_i' . Se hicieron entonces, determinaciones paralelas del P_i formado durante la reacción, omitiendo en un caso de la mezcla de reacción al GMP y en otro al GDP para determinar el P_i formado a partir del GDP y GMP, respectivamente. Los datos de la tabla XXIII han sido corregidos por estas descomposiciones.

Los resultados de medidas simultáneas de manano, GDP y GMP, se han resumido en la tabla XXIII. Se pueden clasificar en dos grupos. En el primero, la suma de los $m\mu$ moles de nucleótidos formados da igual a los de manano formado. En el segundo, aumenta mucho la cantidad de GDP formado, de manera que la suma de los $m\mu$ moles de ambos nucleótidos es mucho mayor que la de los $m\mu$ moles de manano formado. No se ha encontrado una explicación a la formación en algunos casos, de cantidades no estequiométricas de GDP.

Tabla XXIII - Estequiometría de la reacción

manano	GDP	GMP	GDP + GMP
m μ moles			
4,6	3,3	1,5	4,8
8,5	6,6	2,1	8,7
9,5	9,0	1,5	10,5
17,0	11,2	5,9	17,1
12,8	25,5	5,3	30,8
14,5	54,0	4,3	58,3

La mezcla de reacción contiene: 3,5 μ moles de imidazol-Cl pH 6,5 , 0,15 μ moles de Cl₂Mn, 0,08 μ moles de Cl₂Mg, 2,5 μ moles de FK , 0,15 μ moles de GDP, 0,15 μ moles de GMP, 0,14 μ moles de GDP-mano - sa - ³H (8 x 10⁶ desintegraciones/min./ μ mol), 0,03 μ moles de GDP manosa ¹⁴C (2,2 x 10⁶ desintegraciones/min./ μ mol), 40 μ l de enzima en un volumen final de 69 μ l. Se incubó 30 min. a 30°C. Se procesa la mezcla de reacción y se corrigen los resultados por las descomposiciones que sufren el GDP y el GMP, como se describe en el texto.

UNION DEL MANANO ENZIMATICO A PARTICULAS

Se ha visto que la manano sintetasa es generalmente particulada (ver tabla IX), y los experimentos realizados para localizarla en alguna partícula subcelular señalan, aunque no fehacientemente, que estaría unida a la membrana citoplasmática (ver también la discusión). Como el manano se encuentra en la pared celular se decidió estudiar si el manano sintetizado por la enzima, es soluble o se encuentra unido a una partícula.

Para estudiar esto, se dosó la manano sintetasa por dos procedimientos. En el primero se precipitó el manano formado con etanol 66% como se hace usualmente (ver "métodos"). En el segundo, la mezcla de reacción se diluyó con agua y centrifugó a 100.000 rg. El sedimento se lava una vez centrifugando nuevamente y se resuspende en agua y pasa a una plancheta para ser contado. En la tabla XXIV observamos que con ambos procedimientos se obtiene aproximadamente la misma incorporación.

Tabla XXIV - Sedimentabilidad del manano enzimático.

Manano precipitado con etanol 66%	Manano sedimentable por centrifugación
cuentas/min.	
2350	2920

Se detiene la reacción según se indica (la centrifugación se hace 30 min. a 100.000 rg). Se lava el sedimento con etanol 66% en el primer caso y por centrifugación en el segundo. Luego se pasa a planchetas y se mide en contador de flujo gaseoso.

Se hicieron entonces, varios experimentos para intentar determinar la naturaleza de la unión que mantiene al manano en forma particulada. Se preparó una cantidad mayor de manano radioactivo, con el procedimiento de la centrifugación recién descrito. Alícuotas de éste se sometieron a tratamientos a distintos pH y temperaturas, para determinar su efecto sobre la sedimentabilidad del manano biosintetizado. Al final de la incubación, se diluye nuevamente con agua y se centrifuga. Los datos de la tabla XXV corresponden a estos sobrenadantes y sedimentos que se obtienen. La actividad sumada de sobrenadante más sedimento varía entre 2700 y 3300 cuentas/min. Esta variación puede deberse a diferencias en absorción del ma-

terial al ser contado. Se observa que a pH 6,5 el manano sigue sedimentando. Con fosfato esta sedimentabilidad se mantiene algo menos que con imidazol. Calentado a 100°C a ese pH también sigue sedimentando. En cambio cuando se lo trata a pH 7,5 tanto a 30° como a 100°, el manano se solubiliza.

Tabla XXV - Efecto del pH sobre la sedimentabilidad del manano enzimático

Tratamiento	Sedimentables	No sedimentables
	cuentas/min.	
imidazol pH 6,5	2880	450
imidazol pH 6,5, calentando 2 min. a 100°C (')	2805	435
imidazol pH 7,5	1956	1588
tris-Cl pH 8,6	1182	2100
fosfato pH 6,5	2122	1160
fosfato pH 7,5	817	1954
fosfato pH 7,5, calentando 2 min. a 100°C (')	556	2348
fosfato pH 7,5, calentando 2 min. a 100°C	468	2376

(') Estos tubos no se incuban a 30°

Se prepara manano radioactivo incubando la enzima como se describe en el texto. Se detiene la reacción centrifugando, y el manano que ha sedimentado se lava y se suspende en agua. De éste se toman alícuotas que se tratan como indica la tabla. Luego de incubar 60 min. a 30°C se centrifuga y mide radioactividad en contador de flujo gaseoso del sedimento y del sobrenadante.

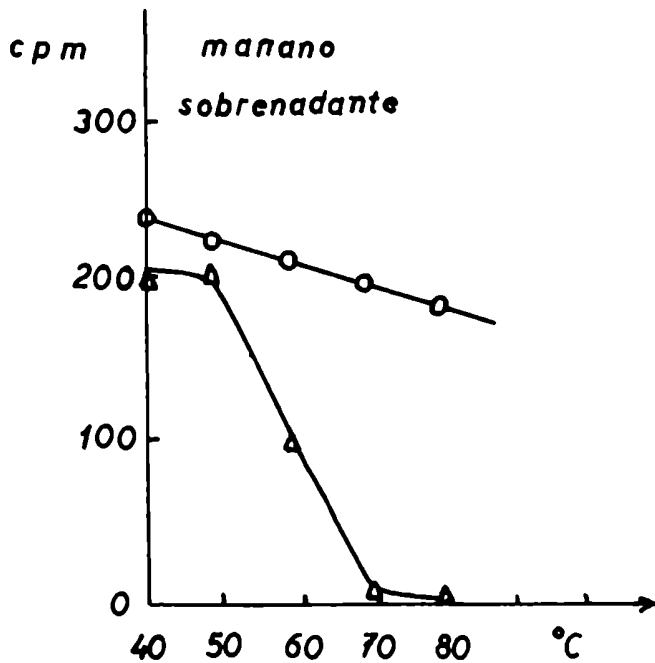


Figura 44: Efecto del precalentamiento a diferentes temperaturas y a pH 6,5 sobre la solubilización del manano. Se trata 10 min. a las temperaturas indicadas y a pH 6,5, manano ^{14}C preparado con GDP-manosa ^{14}C y la enzima. Se centrifuga y alícuotas del sedimento se tratan a pH 7,5 a 100° 2 minutos (O----O) y a 30° 60 min. (Δ----Δ). Se vuelve a centrifugar y se determina la m dioactividad que pasa al sobrenadante.

En la figura 44 se estudia el efecto de un precalentamiento de 3 minutos a pH 6,5 y temperaturas crecientes, sobre la solubilización posterior del manano a pH 7,5 a 30° y a 100°C. En ordenadas se representó el manano que se solubilizó. Se observa que mientras la solubilización a 100°C disminuye muy poco al aumentar la temperatura del precalentamiento, a 30° la solubilización cae bruscamente.

Vimos que pretratando al manano 3 min. a pH 6,5 a 80° ya no se solubiliza a pH 7,5. Este hecho permite el estudio del efecto de diversas enzimas hidrolíticas, que tienen un pH óptimo de acción por encima de pH 7.0. Se prepara manano ^{14}C con la enzima y aísla y lava por centrifugación. Luego se lo calienta a pH 6,5 con buffer imidazol 3 min. a 80°C. En la tabla XXVI se observa el resultado de tratar alícuotas de este manano con distintas enzimas hidrolíticas. Todas son activas para solubilizar al manano, en especial la de veneno de Crócalus. El mercaptoetanol no actuó

pero en otro experimento donde se lo hizo actuar junto con EDTA, sí solubilizó al manano.

Tabla XXVI - Efecto de distintas enzimas sobre la sedimentabilidad de manano radioactivo pretratado a pH 6,5, 10 min. a 80°.

Tratamiento	Sedimentables	No sedimentables
	cuentas/min.	
ninguno	1390	276
pronasa	617	673
papaína	306	667
tripsina y quimotripsina	384	752
lipasa + inhibidor de tripsina	629	690
celulasa de caracol	748	838
fosfo di-esterasa de veneno de Crótalus Ademanteus	444	1034
mercaptoetanol 0,14 M	1057	412

Se incubó 60 min. a 30° manano radioactivo preparado y pretratado como se indica en el texto. Se centrifuga y mide radioactividad en sobrenadante y sedimento.

Tabla XXVII - Carga iónica del manano solubilizado por tratamiento a pH 7,5

Agregado	cuentas/min. residuales
ninguno	490
Dowex 50-Na	460
Dowex 1-acetato	300
DEAE-Cl	220

Se pretrata el manano ¹⁴C con fosfato a pH 7,5, 60 min. a 37°. Se centrifuga y el manano que pasa al sobrenadante se incubó 10 min. con las resi-

nas indicadas. Se vuelve a centrifugar y se mide la radiactividad en una alícuota del sobrenadante.

Se estudió la posibilidad de que el manano solubilizado tuviera carga iónica. En la tabla XXVII se observan los resultados de tratar manano solubilizado por efecto de pH, con resinas de distinta polaridad. Se observa una absorción preferencial por las resinas aniónicas, que indicaría que el manano solubilizado posee carga negativa.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Preparación de la enzima.

Para preparar la manano sintetasa, Algranati, Carminatti y Cabib (1) partieron de la hipótesis de que la enzima debía estar muy posiblemente en la membrana citoplasmática, puesto que se formaban con componentes de la pared celular. Las células de levaduras son extremadamente resistentes a cualquier método mecánico de rotura. En cambio las membranas citoplasmáticas son muy delicadas. Le pareció a los autores que para encontrar actividad de manano sintetasa, debían aislar las membranas citoplasmáticas lo más intactas posible. Luego, un método mecánico que destruyera efectivamente las paredes celulares, no parecía el apropiado. Se empleó entonces la técnica de obtención de protoplastos o esferoplastos que Eddy (101) describió para levaduras. (Nosotros usamos el término protoplasto como lo hace Eddy, pero puede ser muy bien que esferoplasto sea más apropiado (109)). Se eligió la levadura de cerveza S. carlsbergensis cepa 74, por su forma alargada (ver figura 1). Esto permite seguir la formación de protoplastos sin dificultad por observación con microscopio. Los protoplastos que son esféricos, se distinguen claramente de las células enteras, que son alargadas.

Algranati y colaboradores obtuvieron así, incorporación a partir de GDP-manosa a un polisacárido similar al manano con una actividad enzimática que era aparentemente sedimentable. En el presente trabajo se estudiaron los distintos parámetros que intervienen en el método de preparación de la enzima en sus dos fases principales: la preparación de los protoplastos de las células enteras y la obtención de la enzima a partir de los protoplastos.

El resultado de la figura 13 indicaría que para preparar protoplas-

tos con jugo intestinal de caracol, es más conveniente usar células en fase logarítmica temprana. Pero esto tendría el inconveniente del menor rendimiento en número de células que se cosechan. Luego se decidió cosecharlas en la última parte de la fase logarítmica, donde son aún sensibles al jugo intestinal de caracol. Aunque al microscopio óptico no cambian de aspecto al pasar a la fase estacionaria, es dramático como aumenta la resistencia al jugo intestinal de caracol. En qué forma se modifica la estructura de la pared para hacerse refractaria al ataque no se sabe y es un problema muy interesante. Una forma de estudiarlo sería agregar al jugo de caracol enzimas hidrolíticas que tal vez éste no posee.

Como estas incubaciones duraban como mínimo 2 horas, era deseable encontrar un método de acelerar el proceso, sobre todo cuando muchas veces sin explicación aparente, no había formación de protoplastos. En ciertas ocasiones en que la formación de protoplastos se detenía, se agregó más jugo de caracol pensando que éste se hubiera inactivado durante la incubación. Sin embargo, este agregado no tuvo ningún efecto y aducimos entonces la resistencia a las levaduras mismas. En estos preparados se encontró además que siempre quedaban algunas células enteras y residuos de pared celular. Ambos contaminantes tenían que ser eliminados. Las células enteras iban a quedar en la enzima particulada con la consiguiente incertidumbre de qué papel juegan en la síntesis del manano, aunque en la tabla VI se observa que no lo sintetizan. Se hizo un ensayo de separarlas en la etapa de lavado de los protoplastos. Se vio que estos se dimentaban formando 2 capas de distinto aspecto, con igual actividad enzimática en ambas, pero con un mayor contenido en células enteras en la inferior. Sin embargo, por más cuidado que se tuvo en la separación de las capas, siempre la capa inferior se contaminaba con células enteras y sobre todo con residuos de paredes.

Estos problemas se resolvieron cuando se adoptó la técnica de pre-

tratar las células con mercaptoetanol y EDTA antes de incubar con jugo de caracol. Esto hace que con la misma actividad final, el tiempo de in cubación con jugo de caracol se reduzca a la mitad o menos. Con este pro cedimiento la preparación de la enzima se hizo además muy reproducible y se formaban los protoplastos prácticamente libres de células enteras sin digerir y de residuos de pared celular. Se observa al microscopio, que el pretratamiento per se produce un leve cambio en el aspecto de las levaduras.

Durante el lavado de los protoplastos por centrifugación, se notó que mientras en la primera centrifugación, cuando tienen aún el jugo de caracol, el sobrenadante es límpido, en las sucesivas centrifugaciones es turbio. Esto significaría que hay algo en la primera centrifugación que protege a los protoplastos que se pierde luego. Se hizo un ensayo tentativo de protegerlos con albúmina y con manano, pero sin resultado. Se encontró una mejora evitando el uso de material de vidrio en esta e tapa y resuspendiendo los protoplastos con máximo cuidado. Esta labilid ad con material de vidrio sería similar aunque no tan pronunciada, a la encontrada por Rodbell (110) con células aisladas de tejido adiposo.

Eddy (5) describe partículas subcelulares de levadura, observando con contraste de fases. No observa la membrana citoplasmática después de romper el protoplasto. Se intentó seguir la suerte de la membrana ci toplasmática después de lisado el protoplasto, pero sólo fue posible en aquellos casos donde se rompían apenas y quedaban casi enteras (fig ura 23) con organelas adheridas. En la figura 16 se ve cómo se está liberando un protoplasto, que generalmente ocurre en la zona de menor curvatura de la pared. En la figura 17 vemos qué ocurre cuando se som e te a choque osmótico un protoplasto que en parte se encuentra dentro de la célula. En la figura 18 vemos dos típicos protoplastos; en uno d ellos se mantiene unida una pequeña esfera que pensamos se trata del

protoplasto del brote. En la figura 20 observamos el resultado del choque osmótico descrito en "métodos" sobre el protoplasto. Queda posiblemente la vacuola entera y la membrana con organelas adheridas pegada a la vacuola. Con el tiempo la vacuola también se lisa. En la figura 24 se ve el aspecto de un preparado enzimático usual, obtenido con pretratamiento con mercaptoetanol y EDTA (segunda técnica de preparación de la enzima, ver "métodos"). Es posible que cuando los protoplastos se rompan completamente la membrana se arrolle y se confunda con una organela. Algo similar se describe en membrana de esferoplastos de E.Coli (111) y en membranas citoplasmáticas de hígado (112).

El hecho que células enteras (tabla VI) tratadas con mercaptoetanol y EDTA tengan un 27% de la actividad del extracto usual, es un resultado difícil de interpretar. Por el brillo que siguen teniendo las levaduras al microscopio, parece poco probable que la membrana se hubiera dañado por el tratamiento con mercaptoetanol y EDTA. Según Lampen (36) este tratamiento libera manano-proteína. No menciona un efecto sobre la membrana citoplasmática. Se supone que in vivo el GDP-manosa se biosintetiza intracelularmente y no atraviesa la membrana citoplasmática. La primera etapa en la biosíntesis del manano (ver más adelante) podría ser una transferencia de la manosa a un intermediario que puede atravesar la membrana citoplasmática. ¿Cómo pueden entonces células enteras mostrar incorporación? Una de las explicaciones que respaldaría lo dicho respecto de la impermeabilidad de la membrana in vivo al GDP-manosa, es que aunque el tratamiento con mercaptoetanol y EDTA no la hace impermeable a otros solutos, sí la hace permeable al GDP-manosa. También podría ser que unas pocas células que aparecen opacas, y por consiguiente tengan un orificio por el cual penetra el GDP-manosa y sea en éstas donde hay síntesis del manano.

Una vez lavados los protoplastos, se intentó obtener una manano

sintetasa libre de enzimas no sedimentables y lo más homogénea posible en el sentido de las partículas subcelulares que contiene. Se determinó que es relativamente estable al lavado con buffer (tabla VII) pero no si se diluye en una sola operación (ver en tabla IV el efecto del cho que osmótico violento). Tampoco es estable al sonicado y al tratamiento con detergentes (tabla XV y XVI). Estos hechos podrían indicar que la enzima está constituida por un sistema estructural complejo sobre una membrana.

Con la enzima sedimentable (primera técnica de preparación, ver "métodos") se detectó repetidamente una actividad que liberaba un producto soluble en etanol 66% y que no migraba en un campo eléctrico. Como también actúa sobre manosa-1-P (ver tabla XI), es posible que sea una fosfatasa. Parte de esta enzima se encuentra en el sobrenadante de 100.000 xg. En una ocasión, se observó una activación sorprendente de esta enzima por simple dilución con buffer pH 7,5. El experimento se ensayó en otra ocasión pero no se reprodujo. Si se prepara la enzima rompiendo las levaduras con una prensa como la descrita por French y colaboradores (113), casi todo el producto formado resultó ser no precipitable por etanol 66%.

Podría ser que esta actividad esté relacionada en alguna forma al sistema enzimático de la manano sintetasa. Indicaría una falta de aceptor o algún tipo de desacoplamiento.

Con las incubaciones prolongadas con jugo intestinal de caracol que se hacían inicialmente, se detectó repetidas veces actividad de manano sintetasa en el sobrenadante de 20.000 xg. Al pretratar con mercaptoetanol y EDTA (ver "métodos") y reducir consecuentemente el tiempo de incubación con jugo de caracol, se encontró que casi toda la actividad es sedimentable (ver tabla IX).

Propiedades de la enzima

En algunos pocos preparados se observó una curva de tiempo que se achataba después de una hora cuando usualmente era lineal hasta las 2 horas. Esto puede deberse a que sea un preparado con menos aceptor endógeno (a la mezcla de reacción no se le agrega aceptor). Inesperado fue el efecto del Mn^{++} . Como no se esperó un efecto específico tan pronunciado, inicialmente se trabajó con Mg^{++} en la reacción ya que se vio que un complejante como el EDTA (tabla XIV) inhibía. También activan en menor grado el Fe^{++} y el Co^{++} . La curva de actividad en función de la concentración de Mn^{++} es bifásica (figura 33 B). Se notó un incremento inicial muy brusco de la actividad, para aumentar luego más lentamente.

La curva de pH muestra un rango muy amplio de actividad, que va sin modificarse mayormente de pH 5,5 a pH 7,2. Se dosa usualmente a pH 6,5. El pH fisiológico de S.cerevisiae es aproximadamente 6 (114). La caída brusca de actividad a pH mayor que 7 puede ser debido a que el Mn^{++} comience a precipitar sustrato o complejarlo mejor. También puede ser que sea un efecto de falta de aceptor. En experimentos que se discuten más adelante sobre la sedimentabilidad del manano en estado nativo, se ve que un tratamiento a pH 7,5 lo solubiliza. Puede ser que en esas condiciones no funcione como aceptor.

La constante de Michaelis es $5 \times 10^{-4} M$.

Comparando las rectas obtenidas en la figura 35 vemos que el efecto del Mn^{++} es al mismo tiempo, de aumentar la velocidad máxima como disminuir la constante de Michaelis. Los datos de este experimento, corrigiendo aproximadamente por haberse usado cantidades distintas de enzima, explican una activación de cuatro veces. En la tabla XII se observó una activación de 10 veces.

Los datos de especificidad de la enzima, sirven una vez más para

confirmar a los nucleótidos - azúcares como sustratos de las enzimas que biosintetizan uniones glicosídicas. Vemos que hay una incorporación despreciable tanto con manosa libre como también con manosa-1-P. Luego, el camino tiene que ser de manosa-1-P a GDP-manosa y no a la inversa. En la levadura se ha descrito solamente el GDP-manosa como nucleótido azúcar de manosa. Igualmente se ensayó ADP-manosa. Un sólo caso se ha descrito de manosa unida a otro nucleótido que no fuera el GDP, y es a la timidina di-fosfato en Streptomyces griseus (115) e interviene en una reacción de interconversión de azúcares y no en síntesis de un polisacárido.

Los ensayos efectuados para detectar el requerimiento de un aceptor fracasaron. Se ve en la tabla XVI que el mayor factor de activación obtenido está muy poco por encima del error experimental. Como se verá en el estudio de la estructura del manano biosintetizado, éste se forma con una estructura igual a la del natural uniéndose varias manosas en forma consecutiva. Este hecho junto al de no encontrar efecto de aceptor, podría indicar una gran especificidad de la enzima por el aceptor: ninguno de los agregados le sirve y en el endógeno adiciona manosas sólo donde "corresponde". Este resultado es de esperar por otro lado, si el sistema de síntesis fuese uno especialmente ordenado, asociado a una membrana. El aceptor tendría entonces que estar unido a esta membrana y todo el aceptor libre que se agrega a la mezcla de reacción no es activo. Como se vio en los resultados el manano está efectivamente unido a una partícula, que debería ser la misma a la cual está unida la enzima.

En algunos preparados hechos por la primera técnica (ver "métodos") se observó que de la actividad del extracto total se recuperaba anormalmente poco en el sedimento. Se encontró sin embargo que había algo en el sobrenadante, que activaba al sedimento. La tabla XVIII

muestra algunos experimentos negativos y otros positivos, realizados con extractos totales que al centrifugar se comportaban de esa forma anormal. En el mejor caso se obtuvo una activación del 700%. Este puede ser un fenómeno similar al que ocurre cuando se trata mitocondrias de tal forma que pierden un componente esencial para que fosforile el ADP, ya que también en nuestro caso se trata de una partícula (el sistema enzimático) que pierde un factor soluble.

Estructura del manano biosintetizado

El estudio de la estructura se ha basado en la técnica de degradación química parcial del manano de Lee y Ballou (23). Como se vio en los resultados, produce una mezcla de oligosacáridos de manano con un rendimiento del 70% (incluyendo 15-20% de manosa libre), de manera de poder excluir la posibilidad de que se esté estudiando sólo una parte del material biosintetizado.

Para identificar a los oligosacáridos formados en la acetólisis, se los sometió a una cromatografía con el mismo solvente (el solvente E) que usaron Lee y Ballou y se los reconoció por su R_f . Posteriormente se adoptó el solvente C que resuelve la mezcla igualmente bien pero mucho más rápidamente.

Se ha demostrado la casi identidad del manano enzimático con el extraído de las paredes celulares de S.carlsbergensis. La enzima es aparentemente incapaz de catalizar la formación de la unión 1 \rightarrow 3. También se demostró que la enzima agrega por lo menos tres manosas en forma consecutiva. Esto querría decir que sintetiza todo el polisacárido y no agrega solamente manosas a los extremos no reductores del manano endógeno del preparado enzimático.

Por la estructura que posee el manano, es evidente también que se

está biosintetizando la unión 1→6, aunque el método de acetólisis así como se aplicó, no permite aislar oligosacáridos con uniones 1→6. En la figura 4 se explicó como la acetólisis produce por ejemplo al disacárido. Al reducir luego a éste con boro hidruro de Na e hidrolizarlo, se vio que la manosa y el manitol tenían la misma radioactividad. Como el manitol originariamente habría formado parte de la cadena fundamental del manano, se deduce que ésta fue formada por la enzima in vitro. El mismo razonamiento se puede hacer con el trisacárido.

Mecanismo de transferencia de la manosa del GDP-manosa al manano.

Munch-Petersen (75) describió en levadura la pirofosforilasa de GDP manosa. La obtuvo por autólisis en forma soluble. En otros casos descritos de pirofosforilasas de bacterias y de hongos, se observa siempre que se trata de enzimas citoplasmáticas y solubles. No hay entonces hecho alguno que pueda indicar que el GDP-manosa no se biosintetiza en el citoplasma. Pensamos que es poco probable que exista un mecanismo para transportar GDP-manosa, compuesto insoluble en lípidos a través de la membrana citoplasmática, al sitio donde se encuentra el manano en la pared celular. (Existen sin embargo, resultados recientes de Roseman (116) y Pogell(117), que hacen dudar si la hipótesis de G-Manago (118), de la impermeabilidad de la membrana citoplasmática a los ésteres fosfóricos, tiene validez universal). De manera que hay dos problemas a resolver: 1) dónde está ubicado el sistema enzimático que biosintetiza al manano y 2) cómo llega la manosa del citoplasma a la pared celular (ver figura 45). Este punto se trata más adelante al discutir qué nucleótido se libera paralelamente a la síntesis de manano.

El intento de identificar la partícula a la cual se encuentra asociada la actividad de la manano sintetasa, se efectuó cuando no se ha

bía desarrollado aún el método de preparación de la enzima con preincubación con mercaptoetanol y EDTA. Esta preparación (primera técnica, ver "métodos") contiene como se mencionó, residuos de paredes celulares parcialmente digeridos (figura 22) y algunas células enteras.

Se pensó que si se obtenía un fraccionamiento efectivo, suponiendo que la actividad se encuentre en las membranas citoplasmáticas, éste podría servir para identificar la partícula a la cual se encuentra unida la enzima y además para purificarla. Sin embargo, la mayor actividad de manano sintetasa se observó en las bandas que contenían los residuos de pa redes. Hay que recordar además que las membranas citoplasmáticas libres, si es que existen, no se han podido reconocer al microscopio óptico.

En el gradiente que se representó en la figura 28 se ve que el mana no se encuentra en las mismas bandas que la enzima (ver figura 28). Esto es una confirmación microscópica de lo dicho ya que el manano está en la pared.

A pesar entonces de que no se pudo demostrar, se sigue pensando que el sistema enzimático de la manano sintetasa se encuentra asociado a la membrana citoplasmática. El hecho de que los preparados enzimáticos que se obtienen con preincubación con mercaptoetanol y EDTA sean activos, des cartan a los residuos de paredes celulares como sitio de la síntesis, ya que en estas enzimas estos residuos han sido digeridos completamente.

Han aparecido recientemente trabajos sobre la biosíntesis del compo nente polisacárido de paredes celulares de bacterias en los cuales demue tran que el nucleótido se libera como mono-fosfato, quedando el otro fos fato del nucleótido di-fosfato azúcar, unido al azúcar (73), (119), (120). En la primera etapa se forma una unión pirofosfato con un compuesto lipo soluble. Este sería el que atraviesa la membrana citoplasmática y luego transfiere el azúcar al aceptor en la pared celular. En el caso del in - termediario liposoluble que interviene en la biosíntesis del antígeno O

de Salmonella, este sería un terpeno (121).

Como el sistema que sintetiza manano es similar en cuanto sustrato y producto se encuentran separados por una membrana (ver figura 45), es especialmente importante determinar en qué forma se libera el nucleótido en la reacción. Si fuese como GMP podría ser que opere un mecanismo similar al de paredes de bacterias mencionado.

También podría operar un mecanismo como el propuesto por Northcoote y colaboradores (122) (123) para polisacáridos extracelulares de plantas, en el cual el manano debería preformarse en una vesícula citoplasmática, y ser incorporado a la pared al ser excretado dentro de esa vesícula a través de la membrana citoplasmática.

El dibujo de la figura 45 en la cual se representó la reacción global de biosíntesis del manano, se ha ubicado cada compuesto en la parte de la célula en la cual se cree está in vivo. Se ve esquematizado así, cual es el problema de compartimientos que interviene en la biosíntesis del manano.

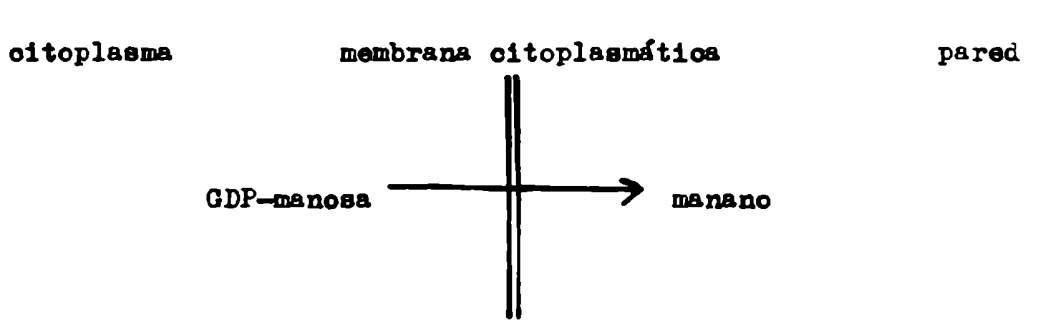


Figura 45: Ubicación de la manano sintetasa en la célula. La membrana citoplasmática sería impermeable al GDP-manosa y al manano.

Los resultados que se obtuvieron (ver tabla XXIII) indican que en la reacción se forma efectivamente GMP, al mismo tiempo que se forma GDP. La relación manano a GMP sintetizadas varía entre 2 y 6 aproximadamente.

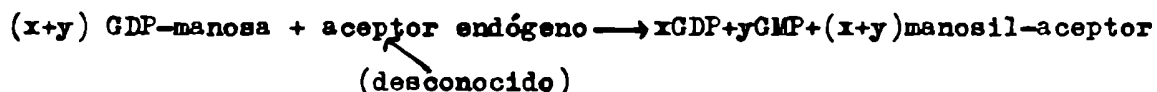
Se determinó en un experimento con GDP-manosa ¹⁴C solo, que no hay prácticamente formación de manosa-1-P de manera que se descarta que el GMP se forme por la pirofosfatasa de levadura que cataliza la reacción(124):



No pudimos demostrar qué produce la variabilidad en la proporción de GDP formado, que en muchos experimentos supera a la de manano. Una ex plicación posible sería que en los experimentos que dan GDP en exceso ac túe la enzima contaminante que describimos libera un producto soluble en etanol 66% y podría estar catalizando la reacción:



De estos resultados se deduce tentativamente que la reacción de bio síntesis del manano es:



Se pueden formular varias hipótesis de mecanismos de transferencia de manosa del GDP-manosa al manano, y que contemplen la formación de GDP y GMP. Para demostrar si alguna es correcta, habría que fraccionar el pro ceso de síntesis del manano en etapas intermedias y seguir la suerte de la manosa en cada una.

La estructura del manano que dedujeron Peat y Ballou y sus respecti vos colaboradores, sugiere algunos mecanismos posibles de síntesis. Su gran ramificación, hace difícil imaginar una enzima del tipo de la ramificante de glucógeno(125), que fuese la encargada de formar las ramas laterales.- Más bien parece que la cadena fundamental y las laterales, se forman simul táneamente. Se puede incluso suponer un mecanismo en el cual se for-

ma el polisacárido por el agregado de di, tri, y tetrasacárido (tal como se los aísla en la acetólisis) convenientemente activados. Al combinarse estos por uniones 1→6, formarían automáticamente la cadena fundamental del manano.

Como el manano contiene fosfato en su estructura, podría ser que este provenga de una manosa que no se transfirió como tal sino como manosa-1-P. Para explicar la formación de hasta un 33% de GMP (respecto del manano sintetizado, ver tabla XXIII), el manano de S.carlsbergensis 74 debería contener un porcentaje mayor de fosfato que el determinado por Mill en S.cervisiae (12). En este sentido, podría ser interesante intentar preparar una enzima que forma el manano de Hansenula wingeei que tiene un alto contenido de fosfato en su estructura (18). Una determinación de los sub-productos formados podría mostrar un relativo aumento en la liberación de GMP respecto de GDP (en el supuesto caso de que también el GDP-manosa sea el sustrato).

Como se mencionó, en los mecanismos en los cuales se han demostrado la intervención de intermediarios lípido-azúcar, éste se transfiere con un fosfato. Un mecanismo de este tipo podría explicar también la formación de GMP. Habría que suponer que la manosa atraviesa la membrana citoplasmática por ejemplo como un tri-mano fosfo-lípido. De esta forma por cada tres manosas que son transferidas una se transfiere como manosa-1-P y da como subproducto GMP y las otras dos se transfieren como manosa y consecuentemente dan GDP.

La estructura del manano que se describió, se efectuó sobre el producto extraído con álcali y purificado con Cu^{++} . Como en la estructura in vivo contiene fosfato y está asociado por lo menos a una proteína, el estado de las propiedades del manano extraído en condiciones relativamente muy suaves, puede enseñarnos algo adicional sobre el mecanismo de la reacción de biosíntesis y aclararse algún aspecto desconocido de su

estructura.

Como el manano biosintetizado, al igual que la enzima que cataliza su formación es sedimentable (ver tabla XXIV), se estudió el efecto de distintos tratamientos sobre esta sedimentabilidad.

El efecto del pH sobre la solubilización del manano es sorprendentemente pronunciado. En ensayos que se hicieron a pH 7,2 con fosfato, se producía la misma solubilización que a pH 7,5 mientras que a pH 6,5 permanece asociado a una partícula; o sea, un cambio en menos de una unidad de pH cambia drásticamente su sedimentabilidad. Se observa además, un efecto propio del buffer usado. El fosfato a un mismo pH libera siempre más manano que el imidazol (tabla XXV).

Como a pH 7,5 la liberación se produce igualmente bien a 30° como a 100°, se pensó que podía tratarse de dos efectos. A temperatura menor, actuaría una enzima solubilizante endógena mientras que a ebullición sería una unión relativamente lábil que se degradaría químicamente. Para probar esto se hizo el experimento que se describe en la figura 44 y que parece indicar justamente la existencia de dos efectos. Por pretratamiento con calor el enzimático se pierde mientras que el químico no se modifica.

Sin embargo, una observación efectuada paralelamente con microscopio, demostró que por efecto del aumento de pH las partículas del extracto enzimático que se encontraban en parte agrupadas, se disgregan. Si el manano estuviera ocluido en material aglomerado, podría ser que se trate de un efecto físico.

Se estudió entonces, aprovechando que se disponía de un pretratamiento que evitaba que el manano se solubilizara a pH mayor que 7, el efecto de diferentes enzimas hidrolíticas (ver tabla XXVI). Esta solubilización del manano la interpretamos tentativamente en base a 1) lo que se conoce de la estructura del manano, 2) su posible asociación a otros com

ponentes de la pared que surge del estudio de la ubicación del manano (ver "introducción") y 3) la acción específica de cada enzima ensayada. En la figura 46 están indicados los distintos componentes de la pared celular cómo podrían estar ordenados y los sitios donde actuarían las enzimas hidrolíticas. En un ensayo que no está en la tabla se comprobó que ribonucleasa no actúa solubilizando al manano.

Para poder confirmar este esquema habrá que encontrar un método para identificar a los mananos obtenidos por los tratamientos con las distintas enzimas.

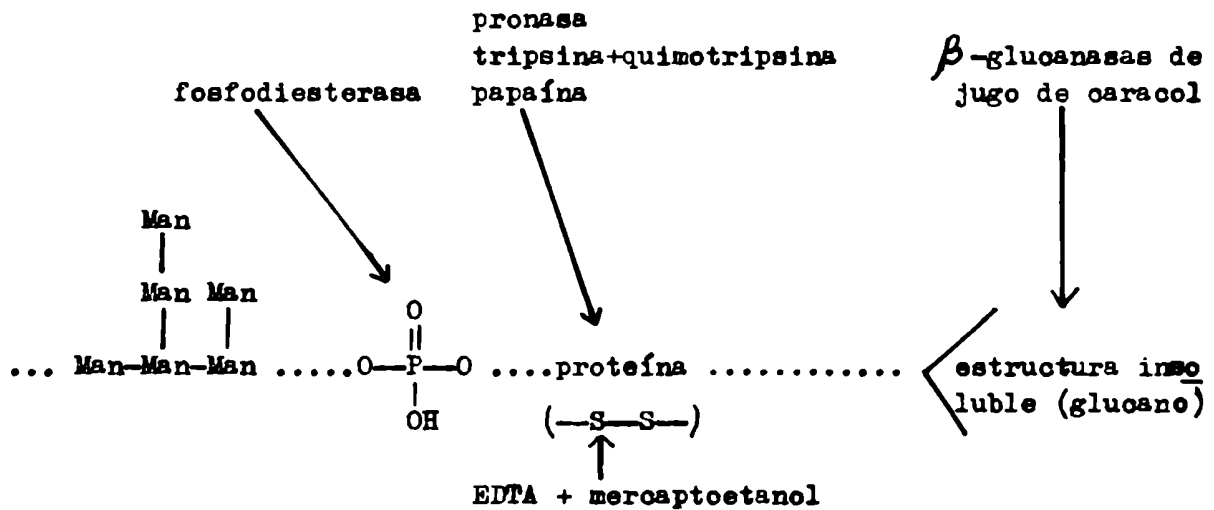


Figura 46: Posible sitio de acción de las enzimas hidrolíticas que actúan solubilizando al manano. La proteína que se aísla como complejo manano-proteína, contiene puentes di-sulfuro sensibles a reducción, también por una enzima mitocondrial (39). El fosfato representa el 10% que aproximadamente contiene el manano aislado con álcali (12), pero podría ser que hubiera uno que actúa de puente entre el manano y la proteína y que no se haya detectado. La unión entre el manano y la proteína puede ser mediante una unión éster (26).

B I B L I O G R A F I A

1. Algranati, I.D., Carminatti, H. y Cabib, E. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 12, 504 (1963).
2. Vitols, E., North R.J. y Linnane, A., *J. Cell Biol.* 9, 689 (1961)
3. Duell, E.A., Inoue, S. y Utter, M.F., *J. Bacteriol.* 88, 1762 (1964)
4. Northcote, D.H. y Horne, R.W., *Biochem. J.*, 51, 232 (1952)
5. Eddy, A.A., *Exp. Cell Res.*, 17, 447 (1959)
6. Robertson, J.D., *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, 3, 1043 (1957)
7. Moor, H. y Mühlethaler, K., *J. Cell Biol.* 17, 609 (1963)
8. Mortimer, R.K. y Johnston, J.R., *Nature*, 183, 1751 (1959)
9. Bacon, J.S.D., Davidson, E.D., Jones, D., y Taylor, I.F., *Biochem. J.*, 101, 36 c (1966)
10. Northcote, D.H. y Horne, R.W., *Biochem. J.*, 51, 232 (1952)
11. Eddy, A.A., *Proc. Roy. Soc. B*, 149, 425 (1958)
12. Mill, P.J., *J. gen. Microbiol.*, 44, 329 (1966)
13. Roelofsen, P.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 477 (1953)
14. Trevelyan, W.E. y Harrison, J.S., *Biochem. J.*, 50, 298 (1952)
15. Jansen, H.E., en *Chemistry and Biology of Yeasts*, A.H. Cook (Ed.), Academic Press, New York
16. Masschelein, C.A. y Devreux, A., *J. Inst. Brew.*, 69, 332 (1963)
17. Eddy, A.A. y Williamson, D.H., *Expl. Cell. Res.*, 17, 447 (1959)
18. Wickerham, L.J. y Burton, K.A., *Bacteriol. Rev.*, 26, 382 (1962)
19. Haworth, W.N., *J. Chem. Soc.*, 784 (1937)
20. Haworth, W.N., Heath, R.L. y Peat, S.J., *J. Chem. Soc.*, 833 (1941)
21. Peat, S.J., Turvey, J.R. y Doyle, D., *J. Chem. Soc.*, 29 (1961)
22. Peat, S.J., Whelan, W.J. y Edwards, T.E., *J. Chem. Soc.*, 3918 (1961)
23. Lee, Y.C. y Ballou, C.E., *Biochemistry*, 4, 257 (1965)
24. Stewart, T.S., Memdershausen, P., y Ballou, C.E., *Fed. Proceed.*, 25, 410, (1966)
25. Ball, D.J. y Northcote, D.H., *J. Chem. Soc.*, 1944 (1950)

26. Nickerson, W.J., *Bacteriol. Rev.*, 27, 305 (1963)
27. Agar, H.D. y Douglas, H.C., *J. Bacteriol.*, 70, 427 (1955)
28. Bartholomew, J.W. y Levon, R., *J. gen. Microbiol.*, 12, 473 (1955)
29. Bartnicki-García, S., *Bacteriol. Rev.*, 27, 293 (1963)
30. Mundkur, B., *Expl. Cell Res.*, 20, 28 (1960)
31. Hashimoto, T., Conti, S.F. y Taylor, H.B., *J. Bacteriol.*, 77, 344 (1959)
32. Backer, J.R., en *Cytological Technique*, Methuen & Co., Londres, (1945)
33. Eddy, A.A., y Rudin, A.D., *Proc. Roy. Soc. B.*, 148, 419 (1958)
34. Bacon, J.S.D., Milne, Beatrice D., Taylor, Irene F y Webley, D.M., *Biochem. J.*, 95, 28 c (1965)
35. Mundkur, B., *Expl. Cell Res.*, 20, 28 (1960)
36. Nagasaki, S., Neumann, N.P., Arnow, F., Schnable, L.D. y Lampen, J.O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 25, 158 (1966).
37. Sharon, N., *Ann. Rev. Biochem.*, 35, 485 (1966)
38. Nickerson, W.J., y Falcone, G., *Science*, 124, 722 (1956)
39. Falcone, G. y Nickerson, W.J., *Science*, 126, 272 (1956)
40. Brock, T.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54, 1104 (1965)
41. Brock, T.D., *J. Bacteriol.*, 90, 1019 (1965)
42. Neumann, N.P. y Lampen, J.O., *Federation Proc.*, 25, 588 (1966)
43. Suomalainen, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 219 (1967)
44. Leloir, L.F., De Fekete, María A., y Cardini, C.E., *J. Biol. Chem.*, 236, 636 (1961)
45. Mordoh, J., Leloir, L.F. y Krisman, C.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53, 86 (1965)
46. Martin, H., *Ann. Rev. Biochem.*, 35, 457 (1966)
47. Croft Hill, *J. Chem. Soc.*, 643 (1898)
48. Cori, C.F., Schmidt, G. y Cori, G.T., *Science*, 89, 464 (1939)
49. Kiessling, W., *Naturwiss.*, 27, 129 (1939)
50. Doudoroff, M., Barker, H.A. y Hassid, W.Z., *J. Biol. Chem.*, 168, 725 (1947)
51. Marechal, I.R. y Goldemberg, S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 13, 106 (1963)
52. Marechal, I.R., *Biochim. Biophys. Acta*, en prensa

53. Leloir, L.F., Harvey Lectures, 1961, pág. 23
54. Larner, J., Villar Palasi, C. y Richman, D.J., Arch. Biochem. Biophys., 86, 56 (1960)
55. Sutherland, E.W. y Cori, C.F., J. Biol. Chem., 188, 531 (1951)
56. Cardini, C.E., Paladini, A.C., Caputto, R. y Leloir, L.F., Nature, 165, 191 (1950)
57. Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini, C.E. y Paladini, A.C., J. Biol. Chem. 184, 333 (1950)
58. Ginsburg, V., Advances in Enzymology, 26, 35 (1964)
59. Leloir, L.F., Arch. Biochem. Biophys., 33, 186 (1951)
60. Dutton, G.J. y Storey, I.D.E., Biochem. J., 59, 279 (1955)
61. Glaser, L. y Brown, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 41, 253 (1955)
62. Leloir, L.F. y Cabib, E., J. Am. Chem. Soc., 75, 5445 (1953)
63. Niemeyer, H., en Metabolismo de los Hidratos de Carbono, Universidad de Chile, 1955
64. Leloir, L.F. y Cardini, C.E., J. Am. Chem. Soc., 79, 6340 (1957)
65. Leloir, L.F., Olavarría, J.M., Goldemberg, S. y Carminatti, H., Arch. Biochem. Biophys., 81, 508 (1959)
66. Neufeld, E.F. y Hassid, W.Z., en Advances in Carbohydrate Chemistry Wolfrom, K.L. (Ed.), Academic Press, New York, Volumen 18, pág. 309.
67. Cabib, E., Ann. Rev. Biochem., 32, 321 (1963)
68. Warren, L. y Blacklow, R.S., Biochem. Biophys. Res. Comm., 7, 433 (1962)
69. Leloir, L.F., en Proceed. of the 6th Internatl. Congress of Biochem. New York, 1964
70. Glaser, L. Biochim. Biophys. Acta, 71, 237 (1963)
71. Burger, M.K. y Glaser, L., Biochim. Biophys. Acta, 64, 575 (1962)
72. Anderson, J.S., Matsubashi, M., Haskin, Mary A. y Strominger, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 881 (1965)
73. Anderson, J.S., Matsubashi, M., Haskin, M.A. y Strominger, J.L., J. Biol. Chem. 242, 3180 (1967)
74. Cabib, E. y Leloir, L.F., J. Biol. Chem., 206, 779 (1954)
75. Munch-Petersen, A., Acta Chem. Scand., 10, 928 (1956)

76. Kornberg, A., en *Horizons in Biochemistry*, Kasha y Pullman (Ed.), Academic Press, N.York, 1962
77. Pontis, H.G., Cabib, E. y Ieloir, I.F., *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 146 (1957)
78. Ashwell, C., comunicación personal
79. Mac Donald, D., *J. Org. Chem.*, 27, 1107 (1962)
80. Moffat, J.G. y Khorana, H.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 649 (1961)
81. Roseman, S., Distler, Moffat, J.G. y Khorana, H.G., *ibid.*, 83, 659 (1961)
82. Recondo, E., Dankert, M. y Fasseron, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 107, 129 (1965)
83. Michelson, A.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 91, 1 (1964)
84. Vogel, A.I., en *Practical Organic Chemistry*, Longmans & Co., Londres, 1964, pág. 168.
85. Cabib, E., Carminatti, H., y Woykovsky, N.M., *J. Biol. Chem.*, 240, 2114, (1965)
86. Cifonelli, J.A., y Smith, F., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 5682 (1955)
87. Okada, H. y Halvorson, H.O., *J. Bacteriol.*, 86, 966
88. Trevelyan, W.E., Procter y Harrison, J.S., *Nature*, 166, 444 (1950)
89. Myers, F.L. y Northcote, D.H., *J. Exptl. Biol.*, 35, 639 (1958)
90. Myers, F.L. y Northcote, D.H., *Biochem. J.*, 71, 749 (1959)
91. Wickerham, L.J., *Bull. U.S. Dept. Agric.* N° 1029 (1951)
92. *Methods in Enzymology* (Colowick y Kaplan, eds.), volumen I, (16)
93. Markham, R. y Smith, J.D., *Nature*, 168, 406 (1951)
94. Sutherland, E.W. y Wosilait, W.D., *J. Biol. Chem.*, 218, 459 (1956)
95. Walker, Gwen J. y Whelan, W.J., *Biochem. J.*, 67, 548 (1957)
96. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F., *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
97. Fiske, C.H. y Subbarow, Y., *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925)
98. Bier, M., en *Methods in Enzymology* (Colowick y Kaplan, eds.), volumen I, pág. 627
99. Burrows, S., Grylls, F.S.M. y Harrison, J.S., *Nature*, 170, 800 (1952)
100. Bray, G., *Anal. Biochem.*, 1, 279 (1960)

101. Eddy, A.A. y Williamson, D.H., *Nature*, 179, 1252 (1957)
102. Ottolenghi, P. y Holter, H., *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.*, 31, 409 (1960)
103. Svihla, G., Schlenk, F. y Dainko, J.L., *J. Bacteriol.*, 82, 808, (1962)
104. Burger, M., Bacon, E. y Bacon, J.S.D., *Biochem. J.*, 78, 504 (1961)
105. Lineweaver, H. y Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934)
106. Dowd, J.E. y Riggs, D.S., *J. Biol. Chem.*, 240, 863 (1965)
107. Bate-Smith, E.C. y Westall, R.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 4, 427 (1950)
108. Leloir, L.F. y Goldemberg, S., *J. Biol. Chem.*, 235, 919 (1960)
109. Ottolenghi, P., *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.*, 35, 363 (1966)
110. Rodbell, K., *J. Biol. Chem.*, 239, 375 (1964)
111. Birdsall, D.C. y Cota-Robles, E.H., *J. Bacteriol.*, 93, 427 (1967)
112. Neville, D.M., *J. Cell Biol.*, 8, 413 (1960)
113. French, C.S. y Milner, H.W., en *Methods in Enzymology*, Colowick y Kaplan (ed.), Academic Press, N.York, pág. 64
114. Conway, E.J., Downey, Mary, *Biochem. J.*, 47, 355 (1950)
115. Blumson, N.L. y Baddiley, J., *Biochem. J.*, 81, 114 (1961)
116. Kundig, W., Kundig, F.D., Anderson, B. y Roseman, S., *J. Biol. Chem.*, 241, 3243 (1966)
117. Pogell, B.M., Maity, B.R., Frumkin, S. y Shapiro, Susan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 406 (1966)
118. Aibel, A., Grunberg-Manago, M. y Szulmeister, J., *Compt. Rend.*, 228, 715 (1949)
119. Dankert, M., Wright, A., Kelley, W.S. y Robbins, P.W., *Arch. Biochem.*, 116, 425 (1966)
120. Weiner, I.M., Higuohi, T., Rothfield, L., Saltmarsh-Andrew, K., Osborn, M.J. y Horecker, B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54, 228, (1965)
121. Dankert, M., comunicación personal
122. Northcote, D.H. y Pickett-Heaps, J.D., *Biochem. J.*, 98, 159 (1966)
123. Pickett-Heaps, J.D. y Northcote, D.H., *J. Expl. Bot.*, 17, 20 (1966)
124. Cabib, E. y Carminatti, H., 236, 883 (1961)
125. Lerner, J., *J. Biol. Chem.*, 202, 491 (1953)