

Tesis de Posgrado

Estructura de un lípido intermediario en la biosíntesis de glicoproteínas

Tábora, Eduardo

1976

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

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

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

Cita tipo APA:

Tábora, Eduardo. (1976). Estructura de un lípido intermediario en la biosíntesis de glicoproteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1506_Tabora.pdf

Cita tipo Chicago:

Tábora, Eduardo. "Estructura de un lípido intermediario en la biosíntesis de glicoproteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1976.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1506_Tabora.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTRUCTURA DE UN LIPIDO INTERMEDIARIO
EN LA BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS"

Autor : Eduardo Tábora
Director : Dr. Nicolás H. Behrens
Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones
Bioquímicas, "Fundación Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

1976

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nicolás H. Behrens por la generosa dirección que me brindó, sin la cual no hubiera podido realizar este trabajo.

Al Dr. Luis F. Leloir por haber permitido incorporarme a su grupo de trabajo, su paciente ayuda, consejos y constante apoyo.

A los Dres. Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por su colaboración y críticas, en especial a los Dres. Carlos E. Cardini, Marcelo Dankert, Héctor Carminatti, Héctor N. Torres, Rafael Pont Lezica, Luis R. Marechal y Armando J. Parodi.

A mis compañeros de laboratorio: Clara R. Krisman, René Baren-go, Roberto Staneloni y Christopher Brett por brindarme su afectuoso estímulo.

A Margarita Mazzardi y Francisco Irusta por su eficiente colaboración.

A la Universidad Nacional Autónoma de Honduras por haberme concedido una beca durante el período de realización de esta tesis.

A los Dres. Francisco Alvarado, Juan Almendares y Pablo Cámbar por su interés y apoyo.

A la memoria de mi padre

A mi madre

A Nelva

A mis hijos

INDICE

	<u>Pág.</u>
Abreviaturas	VI
<u>INTRODUCCION</u>	1
Glicoproteínas: estructura, funciones y biosíntesis	1
Uniones glicopeptídicas	1
Tipos de cadenas de carbohidratos	5
Función de los carbohidratos en las glicoproteínas	9
Biosíntesis	11
Poliprenol-azúcares	14
Procariotes	15
Eucariotes	16
Poliprenoles	23
El aceptor endógeno glucosilado (GEA)	24
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	28
Enzimas, compuestos y mezclas de solventes usados	28
Dolicolfosfato	28
Preparación de GEA ¹⁴ C	30
Preparación de microsomas de hígado	30
Mezclas de solventes	30
Aislamiento y purificación del lípido intermediario	31
Extracción	31
Esquema de la preparación del GEA crudo	32
Cromatografía en DEAE-celulosa	33
Cromatografía en ácido silícico	34
Cromatografía analítica en TEAE-celulosa	34
Cromatografía analítica en DEAE-celulosa	34
Cromatografía en Sephadex LH-20	35
Precipitación	35

	<u>Pág.</u>
Hidrólisis ácida suave del lípido intermediario	35
Medio acuoso	36
Solventes orgánicos	36
Cromatografía en capa delgada	36
Dosaje del dolicol fosfato	37
Cromatografía y electroforesis en papel	38
Cromatografía en fase gaseosa	38
Metanólisis del oligosacárido	38
N-acetilación	39
Sililación	39
Cromatografía	39
Purificación del oligosacárido	40
Reducción del oligosacárido	41
Métodos analíticos	41
 <u>RESULTADOS</u>	 44
Purificación del lípido intermediario	44
Columna analítica de TEAE-celulosa	44
Columna analítica de DEAE-celulosa	45
Columna de Sephadex LH-20	46
Precipitación	46
Columna analítica de DEAE-celulosa después de precipitación	47
Purificación del oligosacárido	51
Análisis del oligosacárido	58
Cromatografía en papel	58
Cromatografía en fase gaseosa	58
Identificación del extremo reductor	63
Análisis de la molécula lipídica	72
Esquema de purificación del GEA crudo	81

	<u>Pág.</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	83
Aislamiento y purificación del GEA	83
Estructura del oligosacárido del GEA	84
La molécula lipídica del GEA	93
<u>CONCLUSIONES</u>	99
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	102

ABREVIATURAS

Pi	Fósforo inorgánico
Pt	Fósforo total
Pl	Fósforo lábil
Tris	Tris-(Hidroximetil)- amino metano
Dol	Dolicol
DolMP	Dolicol monofosfato
DolDP	Dolicol difosfato
Gal	Galactosa
Glu	Glucosa
Man	Manosa
NAcGlu	N-acetilglucosamina
NAcGal	N-acetilgalactosamina
Gm OH	Glucosaminitol
NAcGmOH	N-acetilglucosaminitol
NAcGalmOH	N-acetilgalactosaminitol
NAN	Acido N-acetilneuramínico
Sial	Acido sialico
Fu	Fucosa
Xil	Xilosa
Ram	Ramnosa
Ser	Serina
Tre	Treonina
Gli	Glicina
Leu	Leucina
(OH)Lis	Hidroxilisina
Arg	Arginina
AspN	Asparacina
GEA	Aceptor endógeno glucosilado
UDPGlu	5' Uridina difosfato glucosa
GDPMan	5' Guanosinadifosfato manosa

UDPGal	5' Uridina difosfato galactosa
UDPNacGlu	5' Uridina difosfato N-acetilglucosamina
DEAE	Dietil-amino-etil
TEAE	Trietil-amino-etil
TCA	Acido tricloroacético
umoles	micromoles
nmoles	nano moles
Rf	Relación de la movilidad de la substancia con el frente del solvente.
Rglu	Relación de la movilidad de la substancia a la movilidad de la glucosa.
cpm	cuentas/minuto
RER	Retículo endoplásmico rugoso
REL	Retículo endoplásmico liso
$^3\text{HNaBH}_4$	$[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$

INTRODUCCION

Glicoproteínas: estructura, funciones y biosíntesis.

Gran parte de las proteínas sufren una modificación importante al unírseles covalentemente oligosacáridos de diversos tipos; en base a lo cual se les denomina glicoproteínas. En este grupo quedan incluidas proteínas que pueden funcionar desde moléculas estructurales en los tejidos de sostén, hasta enzimas, hormonas, anticuerpos o receptores celulares, encontrándoseles en todos los seres vivos.

Uniones glicopéptidicas. Es una característica relevante en la estructura de estas proteínas el tipo de unión que se establece entre la cadena de azúcares y el polipéptido; encontrándose que hay tres variedades (Fig. 1). En la primera, unión glicosilamina, el oligosacárido está unido al grupo amido de la asparragina, siempre a través de la N-acetilglucosamina del extremo reductor. La unión O-glicosídica a la serina o treonina, puede ocurrir a través de la N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa o xilosa; mientras que con la hidroxilisina únicamente ocurre con la galactosa (Tabla I)

Cada tipo de unión presenta un comportamiento distinto al tratamiento alcalino (2). La unión a la serina o treonina es lábil al alcalí 0,1 N a temperatura ambiental, la unión a la asparragina requiere un tratamiento con alcalí 2N a 100°C; mientras que la unión a hidroxilisina es estable en estas condiciones.

Se ha planteado si existe alguna secuencia específica de aminoácidos rodeando al aminoácido sustituido por las cadenas de azúcares, dado que esta secuencia podría ser una señal para que ocurra dicha sustitución. Del estudio de muchas glicoproteínas se llegó a establecer que la secuencia AspN-X-Ser(Tre), siendo X cualquier aminoácido, se encuentran en todos los casos que la asparragina está glicosilada, con excepción de la fosvitina, esta proteína se caracteriza por tener un gran número de residuos de fosfoserina en la vecindad de la

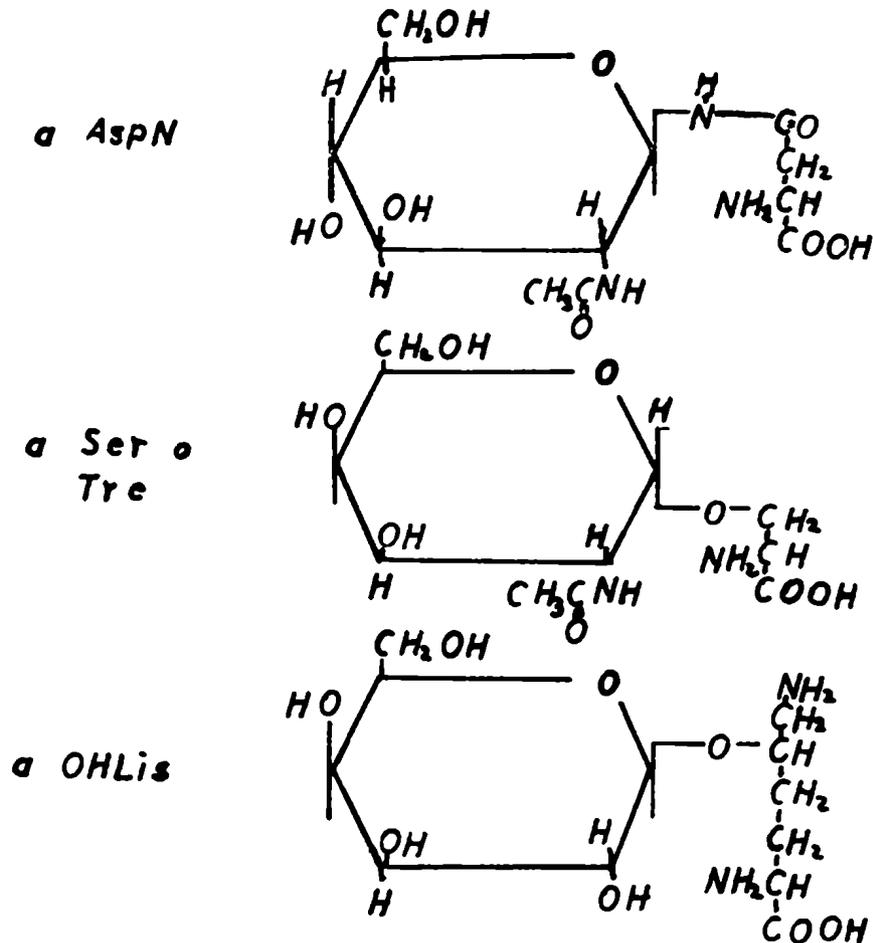


Figura 1. Tipos mas importantes de unión glicopeptídica (1).

unión glicopeptídica (1). Esta secuencia característica es hacia el ex tremo C-terminal de la asparragina glicosilada; para el extremo N-terminal no se ha detectado ninguna secuencia especial.

Jackson y Hirs (3) sugirieron del estudio de varias glicoproteínas, que cuando X es un residuo polar la cadena de azúcares es compleja, es decir que además de N-acetilglucosamina y manosa tiene otros azúcares, como galactosa, fucosa y ácido siálico; en cambio cuando X

Tabla I. Uniones glicopeptídicas en glicoproteínas(1)

Aminoácido sustituido	Azúcar unido al aminoácido	Glicoproteínas
Asparragina	N-acetilgluco-	Proteínas plasmáticas, hormonas, inmunoglobulinas, enzimas, ovoalbúmina, membrana basal, membrana plasmática, queratán sulfato de la córnea.
Serina, treonina	N-acetilgalactosamina	Secreciones mucosas, inmunoglobulinas, fetuinas, membranas plasmáticas, gonadotropina coriónica, queratán sulfato del cartílago, glicoproteína depresora del punto de fusión en el pez antártico.
Serina, treonina	Galactosa	Colágeno de la cutícula de los anélidos.
Serina,	Manosa	Pared celular e invertasa de la levadura, glucosamilasa del <i>Aspergillus niger</i> , colágeno de la cutícula de la almeja.
Serina	Xilosa	Proteoglicanos
Hidroxilisina	Galactosa	Colágenos, membranas basales
Hidroxi-prolina	Arabinosa	Paredes celulares de las plantas.
Hidroxi-prolina	Galactosa	Paredes celulares en algas verdes.

es un residuo ~~apálar~~ la cadena únicamente lleva N-acetilglucosamina y manosa. Sin embargo cuando se tuvo la secuencia de aminoácidos de un número mayor de glicoproteínas, se encontró que tal hipótesis no era aplicable en todos los casos. Es más se ha determinado que la secuencia AspN-X-Ser(Tre) no es condición suficiente para que ocurra la glicosilación de la asparragina. Hunt y Dayhoff (4) encontraron en 264

proteínas, 101 secuencias AspN-X-Ser (Tre), de las cuales solamente 20 tenían oligosacárido unido. Esto estaría indicando que la glicosilación no ocurre en algunos casos por no disponerse de las enzimas necesarias, o bien porque existe un impedimento estérico que previene tal glicosilación. Un ejemplo es el de la ovoalbúmina, que lleva unido un oligosacárido a la asparragina en una secuencia AspN-X-Ser(Tre); pero tiene otro tripéptido (AspN-Leu-Ser) que no se encuentra glicosilado (5). Otro ejemplo es el de las ribonucleasas pancreáticas A y B de bovino. La B está glicosilada en la asparragina que ocupa la posición 34; mientras que la A, teniendo idéntica secuencia de aminoácidos, no lo está. No puede descartarse que la forma A haya estado originalmente glicosilada y que la cadena fue removida posteriormente (6).

Hay muy poca información sobre la secuencia de aminoácidos que rodea a la unión O-glicosídica a la serina o treonina, encontrándose que en la zona donde se ubica la cadena de azúcares hay muchos residuos de prolina. Hagopian et al. (7) encontraron que una N-acetilglucosaminil transferasa de glándulas submaxilares de bovino transfiere el 80% de la N-acetilgalactosamina a una sola treonina de la proteína A1 de la mielina, la cual en estado nativo no es una glicoproteína. La treonina glicosilada tiene hacia el extremo C-terminal 3 residuos consecutivos de prolina, semejante a la que ocurre en la inmunoglobulina G, donde la treonina glicosilada tiene 3 prolinas hacia el extremo C-terminal, si bien el adyacente es cistina. Sin embargo en la glicoproteína depresora del punto de fusión del pez antártico, el aminoácido que rodea a la treonina glicosilada es alanina, ya que esta proteína se encuentra formada únicamente de alanina y treonina(1).

Del estudio secuencial de colágenos de varias fuentes se desprende de que las hidroxilisinas glicosiladas están en la secuencia Gli-X-(OH)Lis-Gli-Y-Arg, en la cual X e Y son aminoácidos variables (1). Sin embargo en los colágenos no se glicosilarían todas las hidroxilisinas que se encuentran en la secuencia adecuada (8). Se da también el caso

de que existiendo la secuencia apropiada para la glicosilación de la hidroxilisina, esta no ocurre por falta de las enzimas correspondientes; por ejemplo el colágeno del *Nematus ribessi* contiene 37 residuos de hidroxilisina y ninguno está glicosilado, lo cual hace que funcione como buen aceptor con la galactosiltransferasa de riñón para formar la secuencia galactosil-hidroxilisina (9).

Tipos de cadenas de carbohidratos. Las cadenas que se unen a la asparagina pueden ser de dos clases, una simple que consiste solamente de N-acetilglucosaminas y manosas; y otra compleja, que lleva además N-acetilglucosaminas externas, galactosa, fucosa, y ácidos siálicos y en un caso (bromelina) xilosa (Tabla II).

Cuando se trata de oligosacáridos simples el peso molecular está en un rango de 1200 a 2000, en el caso de los complejos es de 2000 a 3000. En ambos casos la N-acetilglucosamina que se une a la asparagina lleva unida otra N-acetilglucosamina, formando el residuo de di-N-acetilquitobiosa, es decir N-acetilglucosaminil (1²→4)-N-acetilglucosamina. Esto se encuentra en casi todos los casos, como se ve en la Tabla II. Se han descrito excepciones, como el de la inmunoglobulina E que tiene un oligosacárido unido sin formar el residuo de di-N-acetilquitobiosa (11).

El número de cadenas de azúcares varía de una glicoproteína a otra. Para el caso de la ovoalbúmina hay una sola, en la 2-microglobulina hay 31 por molécula. En algunos casos en la misma molécula se encuentran los dos tipos, el simple y el complejo, como en la tiroglobulina humana (1).

Los oligosacáridos unidos a la serina o treonina por medio de la N-acetilgalactosamina, llevan además ácidos siálicos, fucosa, galactosa y N-acetilgalactosamina (Tabla III). En general estos oligosacáridos están más densamente distribuidos que los unidos a asparagina.

Tabla III. Estructura de algunos oligosacáridos unidos a serina o treonina(10).

Glicoproteína	Estructura
Antígeno MN del eritrocito humano	$\text{NAN}2 \xrightarrow{\alpha} 3\text{Gal} 1 \xrightarrow{\beta} 3\text{NacGal} \xrightarrow{\alpha} \text{Ser(Tre)}$ $\text{NAN} \uparrow \alpha 2,6$
Glicoproteína A submaxilar	$\text{NacGal} 1 \xrightarrow{\alpha} 3\text{Gal} 1 \xrightarrow{\beta} 3\text{NacGal} \xrightarrow{\alpha} \text{Ser(Tre)}$ $\text{Fu} \uparrow \alpha 1,2 \quad \text{NAN} \uparrow \alpha 2,6$
Glicoproteína anticongelante	$\text{Gal} 1 \xrightarrow{\beta} 4\text{NacGal} \xrightarrow{\alpha} \text{Tre}$

En colágenos de la cutícula de los anélidos se encuentran unidades de carbohidrato unidas a serina o treonina por medio de la galactosa. Estas unidades son muy simples y consisten de 3 residuos de galactosa unidos entre si por uniones (1→2). También la unión a serina o treonina puede ser a través de la manosa, como ocurre en la pared de la levadura o invertasa y en la glucoamilasa del *Aspergillus niger* (1).

Las cadenas de azúcares de los proteoglicanos condroitin sulfato, dermatán sulfato, heparina y heparán sulfato, están unidos por medio de la xilosa. Estas cadenas son más largas que las anteriores, llegando a tener un peso molecular de 13.000 a 29.000. Su estructura básica son unidades repetitivas de disacáridos, en los cuales alternan ácidos urónicos y N-acetilhexosaminas, con grados variables de N y O sulfatación.

A la hidroxilisina solamente se une galactosa, siendo la unidad más compleja el disacárido que se forma al agregarse una glucosa en el C-2 de la galactosa. Los colágenos de poca organización, como el de membrana basal, están más densamente glicosilados que aquellos que presentan una estructura fibrilar (12).

Algunas glicoproteínas tienen en su molécula oligosacáridos de

diferente tipo de unión al aminoácido y también de distinto grado de complejidad (Tabla IV).

Tabla IV. Algunas glicoproteínas con más de un tipo de oligosacárido(1)

Glicoproteína	Simple ^a	Complejo ^b	Unido a Ser o Tre	Unido a (OH)Lis
Tiroglobulina (bovina)	+	+		
Tiroglobulina (humana)	+	+	+	
Inmunoglobulina M (humana)	+	+		
Inmunoglobulina A (humana)	+	+	+	
Fetúina		+	+	
Gonadotropina coriónica (humana)		+	+	
Membrana basal glomerular (humana)		+		+
Cápsula del cristalino		+		+
Proteoglicano de la córnea		+	+	

a. Cuando solamente hay N-acetilglucosaminas internas y manosas.

b. Tiene además N-acetilglucosaminas externas, galactosa, siálicos y fucosa.

Por otro lado un oligosacárido en particular puede presentar microheterogeneidad en su composición, lo cual ocurre tanto en glicoproteínas que tienen varias unidades o en aquellas que solamente tienen

una cadena (Tabla V). Esta microheterogeneidad se ha querido explicar en base a una determinación genética, sin embargo las diferencias existen aún en una glicoproteína determinada proveniente de un mismo individuo. La explicación podría estar en el mecanismo de biosíntesis o en la acción posterior de glicosidasas.

Tabla V. Heterogeneidad en los oligosacáridos de algunas glicoproteínas(1).

Glicoproteína	Oligosacárido	Variación
α2 macroglobulina humana ^a	(NAN-Gal-NacGlu) _n -(Man) ₃ -Nacglu)-NacGlu-AspN	n=0-4
Tiroglobulina (bovina y humana)	(Man) _n - NacGlu-NacGlu-AspN	n=5-11
Colágenos (Piel, tendón)	Glu-Gal-(OH)Lis	también Gal-(OH)Lis
Colágenos de cutícula (Lumbricus Nereis)	(Gal) _n -Tre(Ser)	n=1-3
Glicoproteína glándula submaxilar (cerdo)	NacGal-Gal-NacGal-Ser(Tre) / / Fu NAN	desde NacGal hasta el pentasacárido
Fetuína ^b	NAN-Gal-NacGal-Ser(Tre) / NAN	hay sin el NAN unido a la NacGal

a.- Ocurre una heterogeneidad similar en otras glicoproteínas plasmáticas, membrana basal del glomérulo, en las cadenas complejas de la tiroglobulina y la ribonucleasa porcina.

b.- Hay una heterogeneidad similar en la glicoproteína del eritrocito.

Función de los carbohidratos en las glicoproteínas. Aún cuando la función biológica de muchas glicoproteínas está bien demostrada, muy poco se sabe sobre la función intrínseca de las cadenas de azúcares. Muchas funciones han sido propuestas, pero muy pocas han sido demostradas.

(Tabla VI). En varios casos se ha encontrado que la cadena de azúcares no interviene en la función específica de la glicoproteína. La ribonucleasa pancreática A bovina, que está desprovista de azúcares, tiene la misma actividad enzimática que la B, la cual sí lleva un oligosacárido. Ambas formas tienen, como se mencionó anteriormente, la misma secuencia de aminoácidos.

Tabla VI. Funciones demostradas de los carbohidratos en las glicoproteínas (12).

Función	Ejemplos
Aumenta la viscosidad de las secreciones mucosas	Glicoproteína submaxilar ovina
Baja el punto de fusión del suero sanguíneo	Glicoproteínas séricas del pez antártico.
Regulación hepática del catabolismo de las proteínas circulantes	Glicoproteínas plasmáticas y hormonas
Sitios receptores de virus	Glicoproteína del eritrocito receptora del virus influenza
Antígenos de la superficie celular	Glicoproteínas M y N de los eritrocitos.

La actividad de anticuerpo de las inmunoglobulinas, no se encuentra asociada a su cadena de azúcares. La remoción parcial de azúcares de la inmunoglobulina M no afecta sus propiedades inmunológicas, aunque sí afecta su solubilidad (13). Si los carbohidratos participan en la antigenicidad de los aleantígenos no se debería a los azúcares periféricos, pues la remoción enzimática del ácido siálico y la galactosa no cambia la actividad del antígeno H2 (14). En el caso de los tipos sanguíneos sí es evidente que los azúcares determinan su capacidad antigénica.

La remoción enzimática del ácido siálico de varias hormonas, hace que pierdan su acción específica in vivo, debido a que desaparecen

rapidamente de la circulación, siendo captadas por los hepatocitos (15). La captación hepática de las asialoglicoproteínas se ha demostrado para el orosamucido, la gonadotropina coriónica humana, ceruloplasmina, haptoglobulina, α_2 macroglobulina, tiroglobulina, fetuina, hormona foliculo estimulante, siendo una excepción la transferrina. Dicha captación es inhibida por los asialoglicopéptidos, lo que indica que la determinante es para el carbohidrato y no para toda la molécula. Cuando además del siálico se elimina enzimáticamente la galactosa, la vida media en la circulación vuelve a su valor normal (16). El receptor para las asialoglicoproteínas es a su vez una glicoproteína de la membrana plasmática del hepatocito. Dicha glicoproteína contiene ácido siálico, si éste es removido con neuraminidasa desaparece su función de receptor (17).

Se ha sugerido que los azúcares agregados a la proteína constituyen una señal para su secreción celular; pero la albúmina sérica, tripsina, quimiotripsina, elastina y ribonucleasa A salen de la célula sin ser glicoproteínas (10). En el caso de la inmunoglobulina M (79), se encontró que para ser secretada y formar el pentámero (198) se requiere el agregado de azúcares periféricos (18).

El colágeno tiene la capacidad de agregar las plaquetas, pero si es previamente tratado con galactosa oxidasa desaparece dicha función. Como la membrana de las plaquetas tiene una UDP-glucosa: galactosilhidroxilisina (colágeno) glucosiltransferasa y el colágeno tiene galactos_{as} solas unidas a hidroxilisina, se ha sugerido que la base de la interacción colágeno-plaquetas es una interacción enzima-substrato (1). Esto sería un caso especial del mecanismo propuesto por Roseman (19) según el cual la glicosiltransferasa de una superficie celular se fija al acceptor apropiado de la superficie de otra célula, formándose un complejo enzima-substrato y que explicaría a nivel molecular el fenómeno de la adhesión celular.

Biosíntesis. Se ha propuesto, en base a una serie de evidencias experi-

mentales, la ruta que seguirá la síntesis en una célula secretoria de una glicoproteína del tipo asparagina (Fig. 2). El primer evento (a) sería la síntesis del polipéptido en los ribosomas unidos a membrana en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Cioli y Lennox (20) han demostrado que solamente los ribosomas unidos a membrana sintetizan inmunoglobulina en células de mieloma, usando marcadores radioactivos de membranas para asegurarse que los ribosomas libres no están contaminados con membranas.

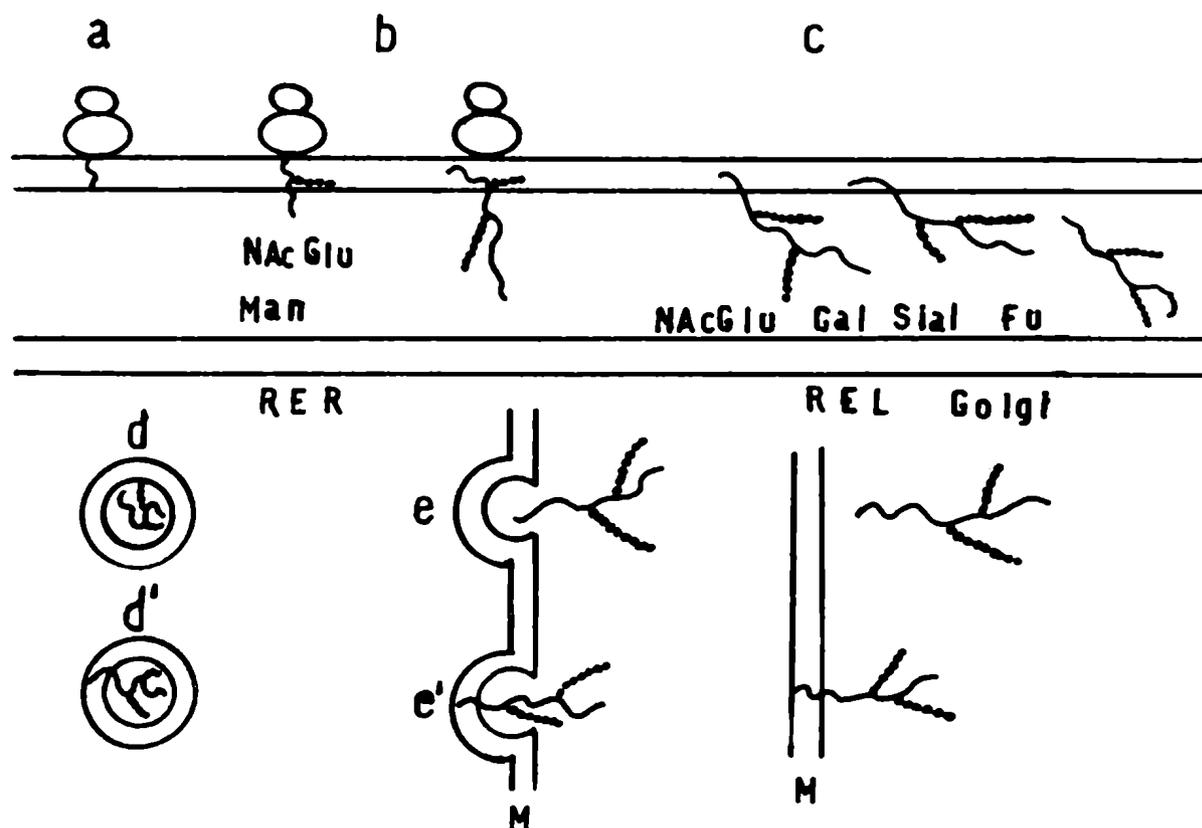


Figura 2. Modelo de la síntesis y transporte de una glicoproteína.

RER: retículo endoplásmico rugoso; REL: retículo endoplásmico liso, M: membrana plasmática.

Los azúcares internos se incorporarían en el RER (b), según se ha visto al marcar células in vivo con glucosamina radioactiva y luego hacer un fraccionamiento subcelular (21). También se ha encontrado estudiando una glicoproteína específica, p.e. la inmunoglobulina M, que la N-acetilglucosamina y la manosa se incorporan en el RER (22, 23). Hay evidencias de que la glicosilación se iniciaría en el péptido nascente, pues ha sido posible obtener dichos péptidos marcados con glucosamina. Si bien nunca se ha demostrado que se incorpore una sola N-acetilglucosamina como sería de esperar si el agregado fuera secuencial (24-27). Como no se ha encontrado AspN-NAcGlu-tRNA o NAcGlu-t RNA, no hay fundamentos para pensar que la formación de la unión NAcGlu-AspN esté codificada directamente a nivel de RNA mensajero (28,29).

A medida que la glicoproteína se desplaza en el retículo endoplásmico recibiría los azúcares restantes (c). La glucosamina se incorpora también en el retículo liso y correspondería a N-acetilglucosaminas externas (21). Un gran número de glicoproteínas tienen la secuencia terminal Sial→ Gal→ NAcGlu, habiendo sido posible preparar el sustrato respectivo para cada glicosiltransferasa tratando una glicoproteína de este tipo secuencialmente con neuraminidasa, -galactosidasa y N-acetilglucosaminidasa. Al hacer un fraccionamiento subcelular de estas transferasas se encontró que se acumulan en la fracción rica en aparato de Golgi (30). La proteína del mieloma aislada de retículo liso tiene glucosamina, manosa y galactosa, mientras que la del retículo rugoso solamente tiene glucosamina y manosa (31). Existe una concentración de una fucosil transferasa en el aparato de Golgi (32). Por radioautografía también se ha encontrado que la galactosa (33) y la fucosa (34) se acumulan en el Golgi y luego con el tiempo pasan a las vesículas de secreción.

En la fase final las glicoproteínas completas se empacarían en vesículas (d) y serían transferidas a la circulación al fundirse las vesículas con la membrana plasmática (e) (35,36). Cabe señalar que la

albúmina sin ser una glicoproteína sigue las mismas etapas (27,37).

Las glicoproteínas que van a la membrana se cree que seguirían una ruta semejante (38), pero en vez de salir quedarían incorporadas a la membrana (d',e'). Esto no se ha demostrado por ser difícil aislar una glicoproteína de membrana específica y poderla seguir en las diferentes etapas como se ha hecho con las proteínas solubles.

La transferencia de la N-acetilgalactosamina a la proteína en glicoproteínas que llevan unida la cadena de azúcares a serina o treonina, tendría lugar en el retículo liso en las células He La y en las membranas plasmáticas en la glándula submaxilar. Esto se ha demostrado con aceptor exógeno preparado por la remoción enzimática de los azúcares (39).

Poliprenol-azúcares.

Hasta ahora se ha aceptado que las glicosilaciones que se describieron anteriormente, ocurren por transferencia directa desde los nucleótido-azúcares y que el agregado de y que el agregado de azúcares es secuencial. Esto último ha sido demostrado para los azúcares externos al disponer de aceptores adecuados, como se describió antes. Sin embargo no se dispone de aceptores para la incorporación de las N-acetilglucosaminas internas y las manosas. Recientemente se ha descrito la glicosilación de la ribonucleasa A con UDPNAcGlu, catalizada por preparaciones de hígado de conejo (40). La transferasa estaría localizada en el RER. En este caso no se ha determinado que ocurra la transferencia de una sola N-acetilglucosamina, como tampoco ha sido posible demostrarlo en cadenas polipeptídicas nacientes marcadas con glucosamina, existiendo la impresión de que no se incorpore un solo residuo (22).

Por otro lado, como veremos después, se ha determinado la transferencia a proteínas de oligosacáridos unidos a poliprenoles, lo cual indicaría que la glicosilación puede ocurrir por un mecanismo distinto al de la transferencia directa y secuencial a partir de los nucleótido-

azúcares.

La formación de prenil-azúcares se ha encontrado en toda la esca la biológica, desde bacterias hasta mamíferos; lo cual indica la universalidad de sus funciones.

Procariotes. En bacterias fue donde por primera vez se determinó que los poliprenol-azúcares son capaces de transferir unidades de carbohidrato en la biosíntesis de heteropolisacáridos. En la síntesis del polisacárido O de varias especies de Salmonella, se encontró una serie de reacciones en las cuales intervienen poliprenol-azúcares (40-45). La figura 3 esquematiza la biosíntesis del antígeno O en la Salmonella newington (44).

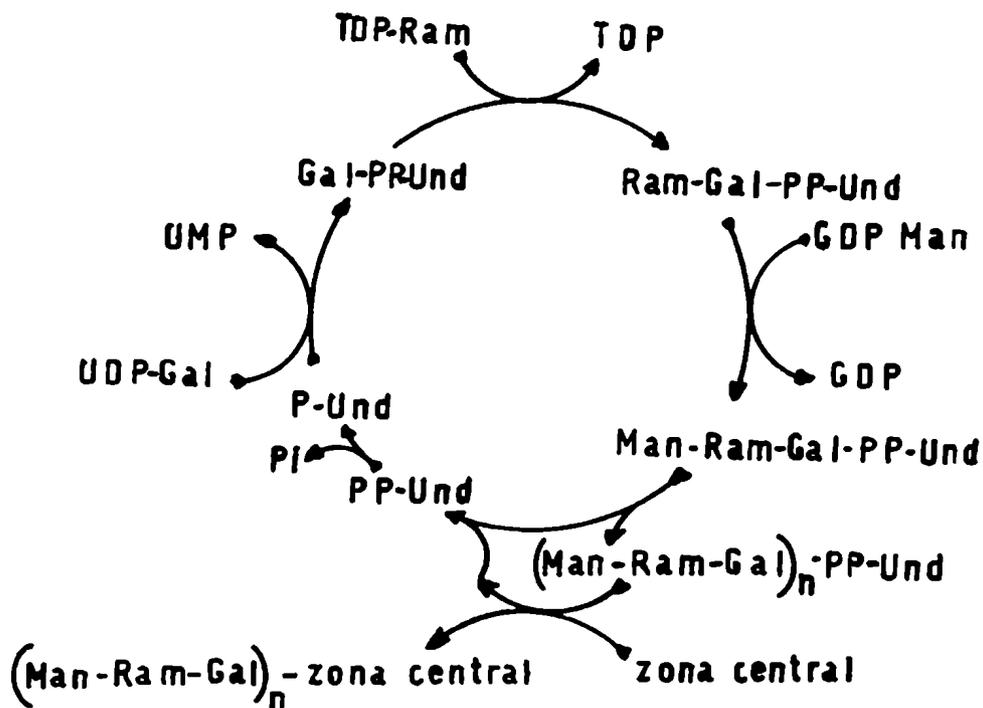


Figura 3. Esquema de la biosíntesis del antígeno O en Salmonella newington (44); Und: Undecaprenol.

La primera reacción es la transferencia de la galactosa-1-fosfato del UDPGal al prenol, formándose prenol difosfato galactosa, al cual en la segunda reacción se le transfiere ramosa del TDPramosa. En una tercera reacción se forma prenol-PP-Gal-Ram-Man, al transferirse manosa del GDPMan. El antígeno O queda formado al polimerizarse estas unidades, transfiriéndose finalmente a la zona central para constituir el lipopolisacárido. Estas dos últimas etapas liberan prenol difosfato, que para reciclarse pierde el fosfato por acción de una fosfatasa (46). La estructura del lípido quedó determinada como undecaprenol (47)(ver Tabla VII).

También se ha llegado a un esquema semejante con el *S. thyphimurium*, donde la unidad repetitiva es Abe-Ram-Man-Gal-PP-Prenol (48,49). En la biosíntesis del peptidoglicano de pared de *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus lysodeikticus* interviene un poliisoprenol de 11 isoprenos (50,51).

Se ha demostrado la intervención de prenol-azúcares en la biosíntesis de polimano en bacterias (52,53). Colvin (54) describió la formación de lípido-intermediarios en el *Acetobacter xilinum*, sin ser bien identificada su naturaleza. Dankert et al. (55) describieron la formación de lípido azúcares en una preparación enzimática cruda de *Acetobacter xilinum*. El mismo grupo (56) ha descrito más ampliamente estos lípido-azúcares. En este sistema se ha encontrado la formación de lípido difosfato glucosa, lípido difosfato celobiosa y lípido monofosfato galactosa. La formación del heteropolisacárido capsular de la *Klebsiella aerogenes* también requiere la intervención de poliprenol-azúcares (57); lo mismo que la de los ácidos teicoicos de las bacterias gram (58, 59).

Eucariotes. Demostrar la existencia de poliprenol-azúcares en tejidos de mamíferos semejantes a los de bacterias, ha sido objeto de mucha investigación en los últimos años. Con las evidencias presentadas por Behrens y Leloir (60) se determinó que una pequeña parte del dolicol

se encuentra como dolicol fosfato, siendo en esa forma capaz de aceptar azúcares de los nucleótido-azúcares en reacciones catalizadas por microsomas de hígado. A diferencia de los prenolfosfato de bacterias, la unión del dolicol al fosfato es ácido estable por tener saturado el isopreno (ver Tabla VII).

Se han encontrado 3 tipos de compuestos que se formarían con el dolicol: dolicol monofosfato monosacáridos, dolicol difosfato monosacáridos y dolicol difosfato oligosacáridos. Al incubar UDPGlu¹⁴C con microsomas de hígado se forma un lípido-azúcar, que por tratamiento ácido suave libera glucosa; su formación se estimula con el agregado de un aceptor lipídico extraído del hígado que tiene idénticas características que el aceptor obtenido de la fosforilación química del dolicol (60). Posteriormente se encontró que era posible obtener un compuesto semejante si la incubación se hace con GDPMan (61,62), quedando demostrado en forma directa que el lípido que interviene es el dolicol fosfato (63). Anteriormente se había detectado la formación de un manolípido semejante, sin llegar a su completa identificación (64,65). El dolicol fosfato manosa se ha obtenido por síntesis química y tiene propiedades idénticas al compuesto natural (66, 67,68). La unión que se establece tanto en el derivado de glucosa y de manosa es β (60,69,70).

Las membranas de oviducto de gallina sintetizan un lípido-xilosa, a partir de UDPXil; su formación se estimula con el agregado de dolicol fosfato, lo que sugiere que se trata de dolicol fosfato xilosa (71). Al incubar UDPGal¹⁴C y UDPNacGal¹⁴ se encontró que la transferencia al dolicol fosfato es prácticamente nula (61). En una publicación reciente se sostiene que incubando UDPGal¹⁴C con una fracción microsomal de hígado, en presencia de ATP como inhibidor de la nucleótido pirofosfataza, hay incorporación de la radioactividad en un lípido soluble en cloroformo-metanol que tiene propiedades semejantes al dolicol fosfato manosa y por tratamiento ácido suave libera galactosa (72).

La formación de dolicol difosfato monosacáridos solamente se ha demostrado con la N-acetilglucosamina. Tetas (73) describió que la in-

incubación de UDPNac Glu¹⁴C con microsomas de hígado da lugar a la formación de un lípido extraíble con una mezcla de cloroformo y metanol que libera N-acetilglucosamina por hidrólisis ácida suave. Posteriormente Molnar (74) empleando en la incubación ³²P UDPNacGlu¹⁴C, encontró que al lípido se incorporaban juntos ³²P y ¹⁴C; sugiriendo que la unión al lípido era difosfato. Además la elución del lípido-N-acetilglucosamina de una columna de DEAE celulosa requería un rango de sales semejante al necesario para eluir el pirofosfolípido de N-acetilglucosamina del *Staphylococcus lactis*. Behrens et al. (61) encontraron que al agregar dolicol fosfato natural o sintético, se estimula la formación del lípido-N-acetilglucosamina por microsomas de hígado. Lo mismo se ha encontrado empleando microsomas de páncreas bovino y las propiedades del compuesto formado son idénticas a las del dolicol difosfato N-acetilglucosamina obtenido por síntesis química (75).

El primer lípido difosfato oligosacárido se obtuvo al incubar dolicol fosfato glucosa¹⁴C con microsomas de hígado. Encontrándose que la glucosa se transfiere a un lípido que por tratamiento ácido suave libera un oligosacárido de 16 a 18 unidades (76,77). A este compuesto se le llamó aceptor endógeno glucosilado (GEA) y a él nos referiremos posteriormente con mayor detalle.

Al incubar microsomas con UDPNacGlu¹⁴C y someter a hidrólisis ácida suave el lípido marcado, se vio que además de N-acetilglucosamina se liberaba en menor proporción otro compuesto con un Rglucosa de 0,85 (77). Posteriormente se encontró que el segundo compuesto era di N-acetilquitibiosa y que su formación se incrementa al agregar un extracto lipídico crudo de hígado que parecía tener dolicol difosfato N-acetilglucosamina fría. También se obtenía su formación reincubando el dolicol difosfato N-acetilglucosamina¹⁴C con UDPNacGlu frío, indicando las evidencias que la segunda N-acetilglucosamina es transferida directamente del nucleótido-azúcar (78).

Incubando microsomas con GDPMan¹⁴C se forman, además de dolicol fosfato manosa, otros compuestos lipídicos que por hidrólisis ácida

suave dan lugar a la formación de oligosacáridos de 8 a 15 unidades (77). Su formación es estimulada con el agregado de dolicol fosfato. Agregando lípidos aceptores contenidos en un extracto orgánico de hígado, la formación de estos compuestos fue aún mayor. Ha sido posible de mostrar la transferencia de manosa del dolicol fosfato manosa ^{14}C a alguna de estos aceptores (79).

La formación de compuestos semejantes se ha determinado en preparaciones microsomales de mieloma de ratón (80). También en preparaciones de membranas de oviducto se forma un dolicol difosfato oligosacárido, en el cual el oligosacárido tiene de 7 a 9 unidades, llevando en su extremo reductor N-acetilglucosamina (81). Por tratamiento con α y β manosidasas se ha propuesto que el oligosacárido tiene la estructura $(\text{Man})_n - \text{Man}(1 \xrightarrow{\beta} 4) \text{NacGlu}(1 \xrightarrow{\beta} 4)\text{NacGlu}$ (82).

El dolicol difosfato de N-acetilquitobiosa ^{14}C incubado con GDPMan frío y microsomas de hígado u oviducto pasa a formar un dolicol difosfato trisacárido, al recibir una manosa, la cual se uniría en β , según lo demuestra el tratamiento del oligosacárido con glicosidasas (83). La transferencia de esta manosa ocurre exclusivamente a partir de GDPMan. El dolicol difosfato trisacárido en presencia de dolicol fosfato manosa y microsomas incorpora manosas, pasando a formar un oligosacárido de 7 a 9 unidades.

El dolicol difosfato de N-acetilquitobiosa obtenido por síntesis química es capaz de estimular la incorporación de manosa por membranas de linfocitos en un lípido-oligosacárido que contiene más de 4 monosacáridos (84). Si la incubación se hace solamente con dolicol fosfato manosa el compuesto no se forma.

Las membranas de oviducto son capaces de transferir el probable dolicol fosfato xilosa ^{14}C a un oligosacárido unido a lípido. El oligosacárido formado tiene de 7 a 9 unidades y por hidrólisis ácida total, ya sea reducido o no, libera xilosa ^{14}C . Esto indica que la xilosa no se incorpora en el extremo reductor (71).

Los dolicol difosfato oligosacáridos son capaces de transferir el oligosacárido a una proteína aceptora endógena, cuando se incuban con preparaciones microsomales. La primer evidencia de esta reacción se demostró para el GEA (85). Posteriormente se encontró lo mismo para los dolicol difosfato monosilados (79), usando también microsomas de hígado. También se ha determinado en membranas de oviducto (81) y fracciones microsomales de mieloma (80).

Estas reacciones han llevado a proponer un esquema de la biosíntesis del oligosacárido y su transferencia a proteína (86). En la figura 3, se da el esquema de tales reacciones para el caso del GEA. Lo mismo ocurriría con los dolicol difosfato oligosacáridos monosilados.

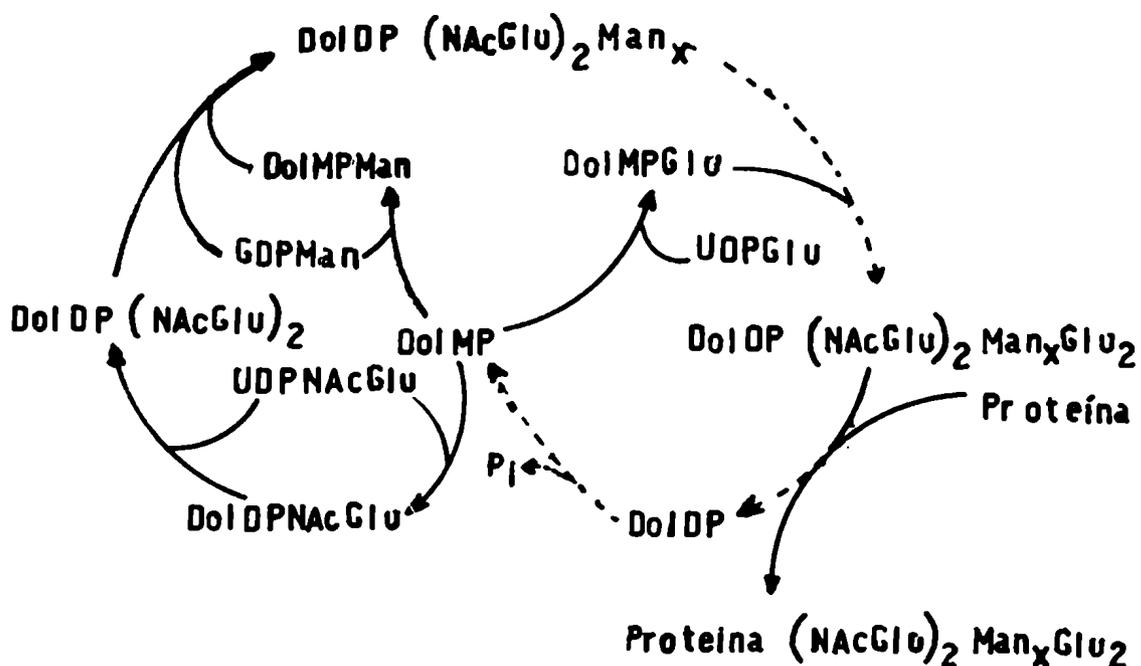


Figura 4. Biosíntesis del $\text{DoIDP - (NACGlu)}_2 \text{Man}_x \text{Glu}_2$ (GEA) y de una glicoproteína (85).

Se ha intentado demostrar la transferencia a una proteína conocida, empleando tejidos que secretan una glicoproteína predominante. En una preparación de una línea de células de mieloma que sintetizan predominantemente cadenas livianas kappa de inmunoglobulina, se encontró que la radioactividad incorporada a proteína a partir de dolicol difosfato oligosacárido (Man^{14}C), del 10 al 20% precipitó con el anticuerpo específico (80). La incorporación en el sistema se incrementa agregando cadenas kappa no glicosiladas obtenidas haciendo crecer las células del mieloma en presencia de 2-deoxiglucosa (87).

En las preparaciones de oviducto se encontró que de la proteína glicosilada a partir del dolicol difosfato oligosacárido (Man^{14}C), menos del 10% precipitó con suero anti-ovoalbúmina (81). Además por electroforesis en geles de poliacrilamida se encontró que la radioactividad se distribuye en bandas que no migran con la ovoalbúmina fría de control (88). Por otro lado quedó demostrado que el oligosacárido transferido a la proteína es el mismo que se encuentra en el dolicol difosfato oligosacárido (82). La dificultad de demostrar esta reacción para una glicoproteína en particular podría residir en que hay muy poco aceptor presente en las preparaciones empleadas (89).

En levaduras se ha encontrado la formación de compuestos semejantes a los descritos anteriormente. Preparaciones particuladas de *Saccharomyces cerevisiae* sintetizan a partir de GDPMan, un manolípido ácido lábil, cuya formación se estimula con el agregado de dolicol fosfato aislado de hígado de cerdo (90,91). Posteriormente se demostró que el lípido que interviene es un dolicol de 14 a 18 isoprenos (92) (Tabla VII). Este dolicol fosfato manosa es capaz de transferir la manosa a una proteína en la serina o treonina (93,94,95). También se ha descrito la formación en este sistema de dolicol difosfato N-acetilglucosamina, dolicol difosfato di N-acetilquitobiosa y dolicol difosfato di N-acetil quitobiosa-Man- Man (96).

En plantas se encontró la formación de un lípido azúcar ácido

lábil, incubando una enzima particulada con $\text{GDPMan}^{14}\text{C}$, con propiedades semejantes al poliprenol fosfato manosa sintetizado por el *Micrococcus lysodeiticus* (97,98,99). En este sistema se encontró que el betulaprenol (ver Tabla VII) funciona como aceptor de manosa, sin que ello signifique que sea el aceptor fisiológico (100). Forsee y Elbein (101) encontraron que agregando un extracto orgánico de fibras de algodón, parcialmente purificado, estimula la formación de lípido-azúcar ácido lábil por una enzima particulada del mismo origen, previamente extraída con acetona e incubada con $\text{UDPGlu}^{14}\text{C}$. Este aceptor migró en capa delgada como ficaprenol fosfato y no pudo ser sustituido por fosfatidilcolina o fosfatidil etanolamina, pero sí por ficaprenol fosfato. Los mismos autores (102) han descrito la formación de lípido-oligosacáridos manosilados ácido lábiles con un tamaño de 4 a 9 azúcares. Reduciendo estos oligosacáridos con $(3\text{H})\text{KBH}_4$ y sometiéndoles después a hidrólisis ácida total, se detecta la liberación de glucosaminitol 3H.

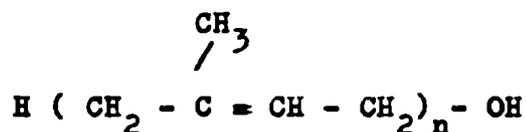
Pont Lezica et al. (103) encontraron que el aceptor en las plantas es ácido estable y tiene propiedades cromatográficas en capa delgada semejantes a las del dolicol fosfato de hígado, sugiriéndose que se trataba de un poliprenol α -saturado (ver Tabla VII).

En un protozooario la *Tetrahimena piriformis*, se han detectado compuestos semejantes a poliprenol-azúcares (104). Quezada et al. (105) encontraron en un extracto orgánico de insectos un aceptor de glucosa y N-acetilglucosamina, al incubar alícuotas del extracto con microsomas de hígado de rata y el nucleótido-azúcar respectivo. ($\text{UDPGlu}^{14}\text{C}$). Este aceptor tiene propiedades de un poliprenol fosfato α -saturado, semejante al dolicol fosfato de mamíferos.

Existen algunas evidencias de que en mamíferos se forman retinol fosfato monosacáridos. El retinol es un tetradehidro tetraprenol ciclado (106). Se describió la formación de este tipo de compuestos por transferencia de galactosa del $\text{UDPGal}^{14}\text{C}$ (107) y con manosa del $\text{GDPMan}^{14}\text{C}$ (108). Sin embargo el agregado de retinol fosfato obtenido por síntesis química,

estimuló muy poco la formación enzimática del manolípido, encontrándose se sí, que hay trazas de un compuesto que en placa delgada corre menos que el dolicol fosfato manosa (68). Un mejor estímulo se obtuvo al agregar junto con el retinol fosfato, α -L lecitina y se determinó que el retinol fosfato manosa después de hidrólisis suave libera retinol, como es de esperar para un compuesto que es α -insaturado (109). No está bien demostrada una ulterior transferencia a proteína u otros lípido-azúcares de los retinol intermediarios (106). También se ha descrito la formación de retinol glicosidos (110).

Poliprenoles. De todo lo anterior se concluye que además de los nucleótido-azúcares hay otro tipo de compuestos que transfieren restos de glicosilo. La parte lípídica de estos compuestos, los poliprenoles, corresponden a la fórmula general:



El número n de isoprenos varía entre 5 y 24, habiendo mucha variación en las dobles ligaduras que pueden ser cis o trans, o estar en parte saturadas, lo que hace que existan muchos isómeros posibles. En general, en la naturaleza se encuentran dos grupos: los todo trans y los cis-trans poliprenoles; aislándose los últimos usualmente como mezclas o familias de poliprenoles, distinguiéndose uno del otro solamente en el número de residuos cis. En la Tabla VII se sumarizan datos estructurales y la fuente de donde han sido obtenidos.

Se acostumbra llamar dolicoles en general a aquellos poliprenoles que tienen el isopreno α -saturado. La literatura parece indicar que los fosfatos de prenoles alílicos son los fisiológicamente activos en sistemas procariotes. En cambio los fosfatos de dolicoles serían los activos en levaduras, plantas, insectos y animales.

La presencia de un isopreno α -saturado en un poliprenol se detecta por espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y espectrometría en infrarrojo (105). Sin embargo en los intermediarios

fosforilados es muy sencillo determinar esta saturación, pues esta hace que la unión del fosfato al prenol sea estable al tratamiento ácido.

Tabla VII. Poliisoprenoles de varias fuentes (106).

Nombre Trivial	Fuente	n	Uniones trans(a)	Isoprenos saturados(b)
Betulaprenoles	Abedul	6-9	2(IV,V)	0
Prenoles bacterianos	Bacterias	10-12	2(VIII,IX)	0
Dolicoles	Levadura,	14-18	2(XII,XIII)	1 (I)
	maníferos	17-21	2(XV,XVI)	1 (I)
Ficaprenoles	Hojas verdes	9-13	3(VI,VII,VIII)	0
Hexahidroprenoles	Aspergillus	19-23	2(XVI,XVII)	3 (I,XVII XIX)
Solanesol	Hojas verdes	9	8	0

(a) Los números romanos se refieren a la posición del isopreno trans, contando a partir del isopreno que tiene el OH.

(b) Los números romanos se refieren a la posición del isopreno saturado.

El aceptor endógeno glucosilado (GEA). Anteriormente se mencionó que al incubar dolicol fosfato glucosa con una preparación microsomal de hígado, la glucosa se transfiere a un compuesto que por su insolubilidad en agua y en algunos solventes orgánicos se creyó que se trataba de una glicoproteína (60). Posteriormente se encontró que era soluble en una mezcla de cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3) (76). La hidrólisis ácida suave del compuesto liberó un oligosacárido neutro que por cromatografía en papel se determinó que corre como un multooligosacárido de 16-18 unidades (77). Por filtración en columna de Sephadex se determinó que el oligosacárido tiene un peso molecular de 3550.

El oligosacárido del GEA se sometió a acetólisis, deacetilación y cromatografía en papel, observándose varios picos como cuando se degrada un oligosacárido. El producto de metanolisis del GEA se trató varios períodos de tiempo con α y β amilasa, no observándose por cromatografía en papel ningún producto de degradación.

El oligosacárido del GEA, obtenido por hidrólisis ácida suave, se redujo con borohidruro de sodio y luego se sometió a una hidrólisis ácida total. Observándose que toda la radioactividad migró como glucosa en cromatografía en papel, indicando que la glucosa transferida del dolicol fosfato glucosa no lo hace al extremo reductor del oligosacárido, (111). El porcentaje de radioactividad liberada como ácido fórmico, al tratar el oligosacárido con periodato, indica que se ha incorporado más de una molécula de glucosa y que por lo menos una de ellas es interna en la cadena del oligosacárido.

El tratamiento alcalino del metil- oligosacárido neutro, obtenido por metanolisis del GEA, dio lugar a la formación de dos compuestos cargados positivamente. Estos compuestos se neutralizan después de N-acetilación, lo cual sugiere la presencia de dos hexosaminas en el oligosacárido (111).

El oligosacárido del GEA se une a la concanavalina A, la cual como se sabe se combina con polisacáridos que tiene residuos terminales de α -D-manosa o α -D-glucosa (112).

La formación del GEA ocurre en varios tejidos, encontrándose en todos los casos que el oligosacárido liberado por hidrólisis ácida suave co-cromatografió con el obtenido de microsomas de hígado de rata. Los tejidos en los cuales se ha encontrado la formación de GEA son: cerebro y riñón de rata, linfocitos humanos, hígado y tiroides de cerdo. La acetólisis del oligosacárido del GEA de hígado de ratón y cerdo dieron el mismo patrón en cromatografía de papel (111).

Hay evidencias de que la unión entre el lípido y el oligosacárido en la molécula del GEA es un pirofosfato. Entre estas evidencias está

el comportamiento del GEA en columnas de DEAE celulosa, donde se ha encontrado que para eluir al GEA hace falta una concentración de sales un poco mayor que la correspondiente para un lípido difosfato trisacárido sintetizado por el *Acetobacter xilinum*. Este necesita más sales que un lípido monofosfato glucosa en la misma bacteria (76).

Otra evidencia de que la unión en el GEA sea difosfato, estaría en que el tratamiento alcalino de este compuesto produce un oligosacárido cargado que se neutraliza por acción de la fosfatasa alcalina de la *E. coli* (76). Idéntico tratamiento del dolicol monofosfato glucosa da lugar a la formación del 1-6 anhidroglucosano (60). Sin embargo el tratamiento con fenol caliente que descompone a los undecaprenil pirofosfatos, no afecta al GEA (76).

Cuando se corrió GEA en una columna de DEAE- celulosa, se encontró una coincidencia entre el pico de la radioactividad del GEA y el dolicol fosfato liberado por el tratamiento ácido de las fracciones. El dolicol fosfato se midió por su capacidad aceptora de glucosa para formar dolicol fosfato glucosa, al incubar las fracciones con microsomas de hígado de rata y UDPGlu¹⁴C. Esta coincidencia también se encontró en cromatografía en capa delgada(113). Midiendo en Sephadex el peso molecular del GEA y del dolicol fosfato glucosa, en forma de compuestos de inclusión con doxicolato, se encontró para el primero un valor de 14.300 y para el segundo 11.300. La diferencia corresponde a proximadamente al peso molecular del oligosacárido, concluyéndose que el residuo lipídico en ambos casos tiene el mismo peso molecular (76). Todos estos hechos estarían indicando que el lípido al cual se une el oligosacárido por una unión difosfato en el GEA, es el dolicol (Tabla VII).

De lo anterior se concluye que el dolicol fosfato glucosa, cuando se incuba con microsomas, transfiere la glucosa a un aceptor endógeno, formándose el GEA. Este tendría un oligosacárido de 20 unidades, de las cuales dos serían hexosaminas, unido por unión difosfato a un

lípido que probablemente sea dolicol. Esta imagen de la estructura del GEA proviene de estudios realizados con el compuesto marcado con glucosa radioactiva. En este trabajo se obtuvieron cantidades de GEA en esca la preparativa, lo cual permitió hacer otro tipo de estudios de su estructura.

Materiales y Métodos

Enzimas, compuestos y mezclas de solventes usados.

Los siguientes compuestos se obtuvieron de fuentes comerciales:

DEAE-celulosa y TEAE-celulosa de Serva; ácido silícico Mallinckrot de malla 100 a 200; Sephadex LH-20 de Pharmacia; Silica gel G, tipo 60 de Merck; Kieselguhr de Merck; α -Naftol y Anisaldehído de Merck; Cl H analítico Sintorgan; Trimetiltriclorosilano de Fluka; hexadimetil-silano, bistrimetilsililtrifluoroacetamida, Anakrom ABS de malla 80-90, silicona SE-30, lana de vidrio silanizada, agente sili-lante Sylon, todos Supelco, anhídrido acético de Sintorgan; EDTA de Sigma; mercaptoetanol de Serva; arabitól, manitol, manosa, glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa de Sigma; KBH_4 de Serva; Antrona de Sigma; verde de malaquita de Hartman-Leddon. De los compuestos radioactivos usados el $^3\text{H NaBH}_4$ se obtuvo de New England Nuclear con una actividad específica de 140 Uci/ μmol . El UDPGlu- ^{14}C uniformemente marcado se obtuvo por el método de Thomas et al. (114), con una actividad específica de 309 Uci/ μmol .

Dolicol Fosfato. Se obtuvo de dos fuentes, el compuesto natural y el obtenido por fosforilación química del dolicol. Para preparar el Dol-MP natural, se corta en trozos hígado de cerdo recién sacrificado o bien, almacenado a -90°C y se extrae en licuadora con 0,5 volúmenes de acetona. Luego se filtra por Buchner y el residuo se deja secar al aire. Este residuo se extrae durante una noche con 0,33 volúmenes de metanol más 0,66 volúmenes de cloroformo. Nuevamente se filtra, siendo este filtrado la preparación cruda de Dol MP. Esta se saponifica con 45 ml de metanol más 11 ml de Na OH 10N por litro de extracto

durante 20' a 37°C. A algunas preparaciones se las sometió posteriormente a un tratamiento ácido. El cual consiste en reflujar el extracto saponificado bajo nitrógeno por 20' con 95 ml de ClH concentrado. Luego se someta a una partición según Folch et al. (115) hasta eliminar el ácido. Finalmente se lava el menisco de la interfase con cloroformo-metanol-agua (12;192:188) para eliminar las sales. La fase inferior se siembra en una columna de DEAE-celulosa en forma de acetato (ver cromatografía en DEAE-celulosa) de 4x40 cm. El DolMP se eluye con 2,3 l de cloroformo-metanol-acetato de amonio 1M en metanol-ácido acético-agua (1500:525:225:12,5;11,25). Durante la elución se observa la migración de una o más bandas amarillas, que habían estado adsorbidas en el origen. Se determina la presencia de DolMP en la zona en que eluyen esas bandas, mediante dosaje enzimático del DolMP en alícuotas de las fracciones (ver adelante dosaje del DolMP).

El dolicol que se utiliza para ser fosforilado químicamente se prepara según una modificación de la técnica descrita por Burgos et al. (116). Hígado de cerdo (2 kg) guardado a -90°C se corta en trozos pequeños y se refluja 2,5 horas con 25 g de ptrogalol en 1 l de etanol-agua (1:1). Se extrae con agua y éter etílico y la fase etérea se lava con agua hasta eliminar el álcali. Se seca el éter con SO_4Na_2 y se concentra al vacío a temperatura del ambiente. Se toma con 500 ml de éter de petróleo y se filtra en frío por Whatman 1. La presencia de dolicol se determina por cromatografía en capa delgada de sílica gel G con cloroformo como solvente. El dolicol tiene un Rf de 0,7 que se observa al revelar con anisaldehído (ver cromatografía en capa delgada). Luego de secar exhaustivamente con SO_4Na_2 se siembra en una columna de 4,5x15 cm de alúmina Brockman (grado II), se lava con éter de petróleo y se eluye con concentraciones crecientes de éter etílico en éter de petróleo.

Para preparar el DolMP sintético, se toma dolicol purificado por alúmina proveniente de 8 gr de hígado y se trata durante 3 horas a

temperatura ambiente con la siguiente mezcla: 2 ml de éter de petróleo-éter etílico (94:4), 2 ml de benceno, 0,5 ml tricloroacetonitrilo, 2 ml de solución saturada de fosfato de di-trietilamina y 4,5 ml acetonitrilo. Se concentra bajo una corriente de nitrógeno, se toma con cloroformo-metanol (2:1) y se lava por partición de acuerdo a Folch et al. (115).

Preparación de GEA¹⁴C. Se obtiene con la siguiente mezcla de reacción: 20 nmoles de fósforo total de DolMP natural se secan al vacío en presencia de 50 ul de EDTA-Mg 0,1 M en Cl₂Mg 0,1 M. Se toma con 0,1 ml de tris maleato 0,5 M pH 7,7, 0,15 ml de agua, 0,02 ml de β-mercaptoetanol 1M, 5x10⁵ cpm de UDPglu¹⁴C y con 0,15 ml de enzima microsomal (ver más adelante). Se incuba durante 20' a 30°C. Se extrae una vez con 0,8 ml de metanol, y 1,2 ml de cloroformo; dos veces con 0,2 ml de Cl₂Mg 4mM, 0,4 ml de metanol y 0,6 ml de cloroformo y tres veces con 1 ml de fase superior teórica: Metanol-agua-Cl₂Mg 1 M-cloroformo (48:47:0,168:3) (115). El residuo proteico desnaturalizado se extrae finalmente tres veces con 1 ml de solvente A (ver adelante). El GEA¹⁴C se obtiene en estas extracciones con solvente A.

Preparación de microsomas de hígado. La técnica utilizada es una modificación de la descrita por Moulé et al. (117). Se utilizan ratas ayunadas 24 horas a las cuales se les inyecta 20 unidades de insulina por vía intraperitoneal 1 hora antes de sacrificarlas. Se homogeneizan en un homogeneizador Potter-Elvehjem (vidrio-teflon) con 1-2 volúmenes de sacarosa 0,88 M que contiene 5 mM EDTA-Na. Se centrifuga 10' a 10.000 rpm y el sobrenadante se centrifuga 90' a 40.000 rpm. El sedimento de esta última centrifugación se toma con tampon tris-maleato 0,005 M pH 7,7; utilizando un volumen tal que se obtiene una concentración de proteína de 100-150 mg/ml. La enzima se conserva a -20°C y es estable por varias semanas.

Mezclas de solventes. La mayoría de los solventes se destilaron una

vez en destilador de vidrio. Se usaron las siguientes mezclas:

Solvente A: cloroformo-metanol-agua (1: 1:0,3) (118)

Solvente B: cloroformo-metanol-agua (60:25:4) (119)

Solvente C: isopropanol-amoníaco concentrado-agua (6:3:1) (120)

Solvente E: n-propanol-nitrometano-agua (5:2:3) (121)

Solvente F: n-butanol-piridina-agua (40:36:24) (122)

Solvente G: n-butanol-piridina-agua (40:30:28) (122)

Solvente H: n-butanol-piridina-agua (4:3:4) (77)

Solvente I: n-butanol-piridina-agua (6:4:3) (123)

Solvente J: cloroformo-metanol-ácido fórmico-agua (140:37:16:1)(124)

Solvente K: cloroformo-metanol-agua (1:2:0,8) (125)

Solvente D: diisobutilcetona-ácido acético-agua (20:15:2)

Aislamiento y purificación del lípido intermediario.

Extracción. Se hicieron dos preparaciones, usando un total de 19 kg de hígado de cerdo obtenidos en un matadero local. Los hígados se conservaron sobre hielo seco hasta el momento de su procesamiento.

Preparación A. En esta se extrajeron 6 kg de hígado con los siguientes solventes:

Acetona. Los hígados se cortaron en pedazos pequeños y luego se homogeneizaron en una licuadora de acero en 2 l de acetona por cada kg de hígado. Se agregó 6 l más de acetona al total de la mezcla y se dejó extrayendo durante una noche. Se filtró por un filtro Buchner haciendo succión y al sólido se le pasó 2 l más de acetona. Se dispersó el sólido y se secó bajo una corriente de aire hasta que casi desapareció el olor a acetona.

Cloroformo-metanol (2:1). Se suspendió el sólido en 12 l de cloroformo-metanol (2:1) y se dejó en extracción durante una noche. Luego de filtrar el residuo se resuspendió en 9 l de la misma mezcla, se extrajo una noche más y se filtró.

Metanol-agua. (1:1). Usando 6 l de metanol-agua (1:1) se suspendió el sólido y se filtró. Esta operación se repitió 3 veces, obteniéndose una disminución importante en el color amarillo del filtrado.

Cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3) (Solvente A). El sólido húmedo se suspendió en 6 l de cloroformo-metanol (1:1) y se le agregó agua hasta aproximarlo a saturación. Para calcular la cantidad de agua necesaria se filtró una pequeña alícuota de la suspensión y se fue agregando agua al filtrado hasta obtener dos fases. El residuo se extrajo sucesivamente con 6,9 l y 4,5 l del solvente A. A la combinación de estos tres filtrados se le agregó un total de 3×10^5 cpm de GEA¹⁴C.

Preparación B. Se partió de 13 kg de hígado y se procedió a extraerlos con los siguientes solventes:

Acetona. Los hígados se cortaron en pequeños pedazos y se homogeneizaron en 1 l de acetona/kg de hígado. A la mezcla se le agregó 13 l más de acetona y se dejó extrayendo durante una noche. Se filtró y el residuo se resuspendió en 13 l de acetona, se dejó una noche más. Se filtró y el sólido se dispersó y la acetona se removió bajo una corriente de aire.

Cloroformo-metanol (2:1). El sólido se extrajo con 24 l de cloroformo-metanol (2:1) durante una noche y se filtró. La extracción se repitió con 12 l de cloroformo-metanol (2:1).

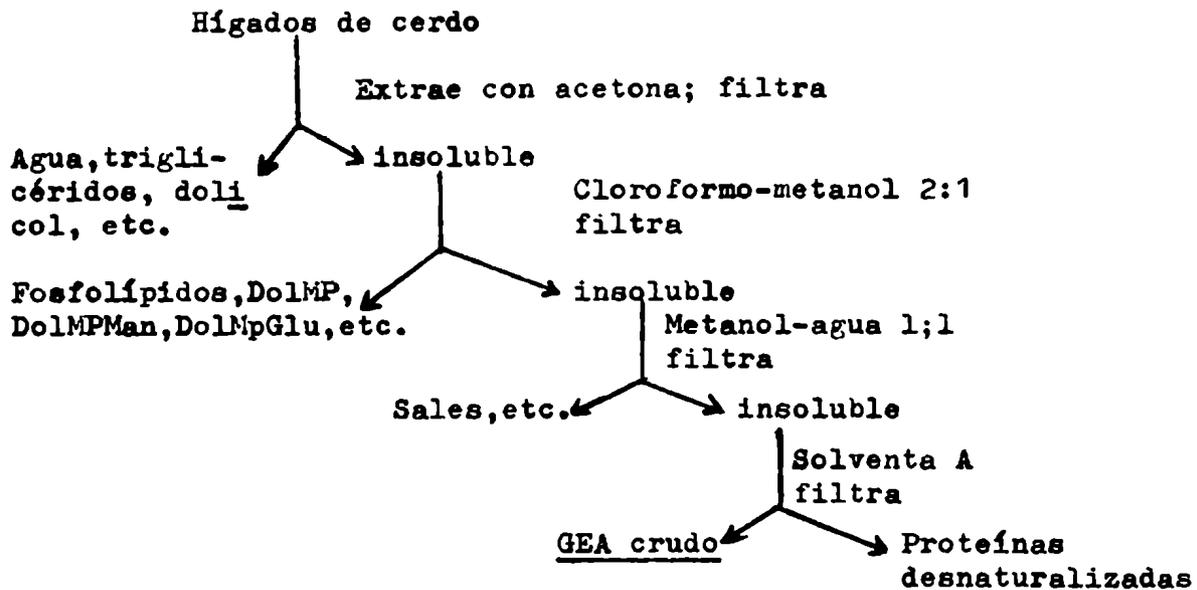
Metanol-agua (1:1). El sólido residual fue extraído cuatro veces con 12 l de metanol-agua (1:1).

Solvente A. El sólido húmedo se suspendió en 8 l de cloroformo-metanol (1:1) y se llevó casi a saturación con agua, tal como se hizo en la preparación A. Después de extraerlo por una noche se filtró y se reextrajo sucesivamente con 9,2 l y 4,5 l de solvente A. A la combinación de estos filtrados se les agregó 6×10^5 cpm de GEA¹⁴C.

Esquema de la preparación de GEA crudo. Las diferentes etapas de la extracción del GEA crudo descritas anteriormente se resumen en el esquema 1. En este esquema se anotan algunos de los compuestos que se extraen con la acetona, cloroformo-metanol (2:1) y el metanol-agua (1:1) que fueron descartados. Finalmente el extracto en el solvente A es el

que contiene al GEA crudo, quedando un residuo final de proteínas desnaturalizadas.

Esquema 1. Preparación del GEA crudo.



Cromatografía en DEAE-celulosa. El extracto en el solvente A se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa en forma de acetato (4,3x 46 cm). Para prepararla se toma DEAE-celulosa comercial (forma Cl^-) en HONa 1N, se lava exhaustivamente con agua y se seca con metanol. Se toma con ácido acético glacial, se filtra y se lava con el solvente A hasta neutralidad. Una vez sembrado el extracto del solvente A, la columna se eluyó con un gradiente lineal de formiato de amonio obtenido con 1,5 l de solvente A en la cámara mezcladora y 1,5 l de formiato de amonio 0,133M en el mismo solvente en la otra cámara. Se colectaron fracciones de 50 ml y se les midió la radioactividad. Esta se eluyó entre las fracciones 45-55, con ligeras variaciones en cada columna. En todas las columnas la radioactividad apareció ligeramente después, pero aún mezclada con una sustancia amarilla. Las fracciones que contenía a la radioactividad se combinaron y luego se secaron al vacío en un evaporador rotatorio.

El extracto de la preparación A se pasó todo por una sola columna

mientras que el de la preparación B se dividió en dos volúmenes iguales que se pasaron por la columna separadamente.

Cromatografía en ácido silícico. En la preparación A el material seco del paso anterior se suspendió en 30 ml de cloroformo-metanol (1:1) y se transfirió a una columna de ácido silícico de 4 cm de diámetro por 7 cm de altura, equilibrada con el mismo solvente. El sólido que no fue suspendido en la primera suspensión con cloroformo-metanol (1:1), fue tomado con 30 ml más del mismo solvente. La columna se eluyó con cloroformo-metanol (1:1), colectándose fracciones de 10 ml, hasta que pasaron en total 100 ml. Luego se cambió al solvente A y la radioactividad emergió entre las fracciones 13-15, mezclada con una sustancia amarilla.

La preparación B se continuó procesando dividida en mitades, tal como se hizo en la columna DEAE celulosa. Se usaron columnas de ácido silícico idénticas a la anterior, excepto que la elución inicial con cloroformo-metanol (1:1) llegó a totalizar 25 fracciones de 10 ml cada una. Cuando se cambió al solvente A la radioactividad se eluyó entre las fracciones 28-32, mezclada con una sustancia amarilla. Se combinaron las fracciones donde apareció la del GEA radioactivo.

Cromatografía analítica de TEAE-celulosa. La TEAE-celulosa se trató con NaOH 1 N, se lavó exhaustivamente con agua, luego se secó con metanol. Luego se toma con el solvente A y se pasó a una columna de 1,3x33 cm. El material de la preparación A obtenido en la etapa anterior se sembró en esta columna y se eluyó con un gradiente lineal preparado con 150 ml de solvente A en la cámara mezcladora y 150 ml de formiato de amonio 0,133M en el mismo solvente en la otra cámara. Se colectaron fracciones de 5 ml.

Cromatografía analítica en DEAE-celulosa. Una de las mitades de la preparación B se transfirió a una columna de DEAE-celulosa (1,3x41cm) y se eluyó con un gradiente lineal de formiato de amonio igual al descrito

para la columna de TEAE-celulosa. También se colectaron fracciones de 5 ml.

Cromatografía en Sephadex LH20. Alicuotas del pico radioactivo obtenido en la columna de DEAE-celulosa analítica se sembraron en una columna de Sephadex LH-20 de 0,8x25 cm, previamente equilibrada en el solvente A. Se eluyó con dicho solvente. Se colectaron fracciones de 0,5 ml y la radioactividad emergió en las fracciones 7 a 9, mezclada con la sustancia amarilla. Una columna igual se usó con el solvente K y la radioactividad emergió en la misma forma.

Precipitación. Alícuotas de las fracciones que contenían la radioactividad de la columna analítica de DEAE celulosa se llevaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se disolvieron en propanol-agua (65:35). Luego se fue agregando propanol y al llegar éste a constituir un 60% del volumen original o sea una proporción n- propanol-agua (125:35) la solución se tornó turbia. Centrifugando a 2000 r.p.m. se obtuvo un precipitado en el cual se encontraba el 90% de la radioactividad, mientras que la mayor parte de la sustancia amarilla quedó en el sobrenadante.

La otra mitad de la preparación B después de pasar por el ácido silícico, en vez de sembrarla directamente en DEAE-celulosa, se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio y se tomó en 8 ml de propanol-agua (65:35). Según lo descrito anteriormente se precipitó con el agregado de 4,8 ml de propanol. El precipitado se retomó en 8 ml de propanol-agua (65:35) y para disolverlo bien se dejó una noche a temperatura del ambiente. La precipitación se hizo en total 3 veces. El precipitado final se tomó en 20 ml del solvente A y se transfirió a una columna de DEAE-celulosa analítica igual a la descrita anteriormente.

Hidrólisis ácida suave del lípido intermediario.

Se usaron dos tipos de condiciones para el tratamiento ácido suave, en medio acuoso y en solventes orgánicos.

Medio acuoso. La muestra se seca y luego se suspende en solución acuosa de ClH a pH2, usando como indicador timol azul. La suspensión se incuba 10' a 100°C. Se hace una partición con una mezcla de cloroformo metanol-agua (3:2:1) de acuerdo a Folch et al. (115). La fase superior (acuosa) se removió y la fase inferior se extrajo con un volumen de fase superior teórica: metanol-agua-Cl₂Mg 1M-cloroformo (48:47:0,168:3). Estas fases superiores se combinaron y se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio; se retomaron en agua para evaporar de nuevo hasta que se removió el ClH. Esto se corroboró con timol azul. Para utilizar la fase inferior se extrajo varias veces más con fase superior teórica hasta que esta era neutra.

Solventes orgánicos. Para la hidrólisis en medio orgánico las muestras se tomaron en el solvente A y se les agregó metanol-ClH concentrado (1:1) para obtener una concentración 1N. Se incubaron 3 horas a 37°C y se llevaron a cloroformo-metanol-agua (3:2:1). Las fases superior e inferior se procesaron en la forma descripta anteriormente.

El putativo dolicol difosfato obtenido en la fase inferior después del tratamiento a pH2 (ver resultados), se trató también con ácido en medio orgánico. Con la diferencia de que en vez de hacerlo en el solvente A, se hizo en cloroformo-metanol (3:2) y se agregó ClH concentrado para obtener una concentración final de 1N.

Cromatografía en capa delgada.

Se trabajó con cuatro tipos de placas: preparadas con sílica gel G activadas en estufa a 110°C durante 30' antes de ser usadas (placas de sílica). Placas preparadas igualmente que las anteriores, pero desarrolladas previamente en metanol-ClH concentrado (9:1). Este método es sugerido por Stahl (126) para remover el hierro contenido en la sílica; pues presumiblemente este sea la causa de la menor recuperación del dolicol fosfato cuando se usa sílica no lavada (60). Después de desarrollar con metanol-ClH las placas, se secaron bajo una corriente de aire caliente durante 30' y se guardaron en ese estado. Cuando se usaron se

activaron previamente a 110°C durante 30'. Para asegurarnos de que todo el ClH había sido removido se aplicó una gota de timol azul en una zona marginal de la placa. A este tipo se les llamó placas lavadas.

Mezclando silica gel G y kieselguhr en proporción de 3:1 (121) se prepararon placas que se usaron sin activar (placas silica: kieselguhr). También se usaron placas preparadas con kieselguhr sin activar por calor (placas kieselguhr).

Cuando los diferentes tipos de placas se usaron con fines analíticos se les dio un espesor de 0,45 mm y en caso de preparativos de 0,9 mm.

Para visualizar azúcares las placas se revelaron con naftol y H_2SO_4 (127). Con este revelado los azúcares dan un color violeta específico. Para revelar prenoles se usó el reactivo a base de anisaldehído con el cual los prenoles dan un color verde (128).

Dosaje del dolicol fosfato.

Para medir el dolicol fosfato se empleó el método descrito por Behrens y Leloir (60). Consiste en incubar microsomas de hígado de rata con UDPGlu* y medir el incremento en la formación de DolMPGlu*. Para ello el lípido se seca al vacío con EDTA-Mg para una concentración final 14 mM. Luego se incuba en una mezcla que contiene 0,6 mgs de proteína microsomal, 14 mM Cl_2Mg , 0,8% triton X-100, 14 mM mercaptoetanol y 150 mM de tampón tris-maleato pH 7,7. La incubación se hace 20' a 37°C y la reacción se detiene con el agregado de cloroformo-metanol- Cl_2Mg 4mM (3:2:1) con lo cual se separan dos fases (115). La fase orgánica se extrae 3 veces con un volumen de fase superior teórica. Finalmente la fase inferior se secó sobre cazoletas de aluminio y se midió la radioactividad en un contador de flujo gaseoso.

Cuando el DolMP se midió en placas de silica lavadas, se separó en bandas de 1 cm de ancho y se volcaron en tubos. La silica se suspendió en cloroformo-metanol (3:2) con el agregado de ClH concentrado

suficiente para obtener una concentración 0,6N (60). Se hizo una partición llevando a cloroformo-metanol-agua (3:2:1) y la fase orgánica se extrajo varias veces hasta llevarla a neutralidad. Después se secó bajo nitrógeno y vacío. El dolicol fosfato se mide como se indicó antes.

Cromatografía y electroforesis en papel.

La cromatografía se hizo en papel Whatman 1, siempre descendente. Cuando se analizaron monosacáridos, antes de aplicar la muestra, la primera parte del papel, unos 8 cm después del origen, se sumergió en una solución acuosa de 0,1M SO_4Zn . En esta forma se consigue una buena separación entre la galactosa y la glucosamina con el solvente I (129).

La electroforesis se hizo sobre el mismo papel y se usaron como electrolitos:

L: Molibdato de sodio, 2% pH5 (130)

M: Acido fórmico al 5% (131)

Los azúcares en el papel se revelaron con el reactivo de plata y álcali (132).

Cromatografía en fase gaseosa.

Para realizar esta cromatografía primero se hace una metanolisis del oligosacárido, luego se practica una N-acetilación y finalmente se preparan los silil-derivados. A continuación describiremos las diferentes etapas.

Metanólisis del oligosacárido. Se tomaron en ampollas de vidrio alícuotas del oligosacárido del GEA que contienen 6,4 ugr de azúcar total medido por el método de la antrona (ver métodos analíticos). A dichas alícuotas se les agregó 7,6 ugr de arabitol y 7,6 ugr de manitol como testigos internos. Se les dejó una noche en desecador al vacío con pastillas de KOH y otra noche con P_2O_5 . A cada muestra se le agregó 0,5 ml de metanol- ClH 1N. El metanol- ClH se obtuvo haciendo burbujear ClH al metanol anhidro (133); midiéndose su normalidad por titulación con KOH. A las ampollas se les hizo una atmósfera de nitrógeno y se sellaron a la

llama, incubándoseles luego en estufa a 100°C durante 24 horas (134).

Finalizada la incubación las ampollas se enfriaron a temperatura del ambiente y antes de abrirlas se dejaron 5' a 0°C . El contenido se transfirió a tubos de ensayo que fueron previamente lavados generosamente con mezcla sulfocrómica. Las ampollas fueron igualmente lavadas antes de ser usadas. El metanol- ClH se evaporó bajo una corriente de nitrógeno seco, el cual se obtuvo haciendo pasar el nitrógeno comercial por una columna de sílica gel. Las muestras se retomaron en 0,5 ml de metanol anhidro y se estimó su acidez en placa de toque. Aquellas que eran ácidas se evaporaron de nuevo hasta que la solución estaba completamente neutra.

N-acetilación. Se hizo según el método de Etchinson y Holland (135), tomando las muestras en 0,5 ml de metanol anhidro y se les agregó sucesivamente 0,15 ml de piridina anhidra y 0,1 ml de anhídrido acético. Se agitaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura del ambiente. Las muestras se evaporaron con nitrógeno seco y se dejaron durante una noche en desecador al vacío sobre P_2O_5 .

Sililación. Se usó la mezcla sililante recomendada por Clamp (134), consistente de trimetiltriclorosilano-hexametildisilazano-piridina anhidra (1:1:5). Después de hecha la mezcla sililante se centrifugó y del sobrenadante se tomaron alícuotas de 50 μl que se agregaron a cada muestra. Estas se dejaron incubando 1 hora a temperatura del ambiente. Finalizada la incubación se centrifugaron las muestras para remover las sales formadas y del sobrenadante se inyectaron 2-4 μl en el cromatógrafo.

Cromatografía. Se usó un cromatógrafo Packard serie 7400, provisto de detector de llama. Las columnas empleadas son de vidrio en espiral de 6 pies de longitud por $1/8$ de pulgada de diámetro, empacada con 3% de SE-30 sobre un soporte de Anakrom ABS de malla 80-90. Para prepararla se disolvieron 1,5 gr de sílica SE-30 en 250 ml de cloroformo, agregando luego 50 gr del soporte Anakrom ABS. La mezcla se agita suavemente con una espátula para no romper el soporte y luego se seca bajo una corriente de aire caliente y cuando ya casi estaba seca se pasó a una

estufa a 175°C donde se mantuvo por 4 horas.

La columna de vidrio fue silanizada haciéndole pasar 10 ml de Syton, eliminando el exceso con tolueno y finalmente se secó en una corriente de nitrógeno. Para empacarla se le aplicó succión en uno de los extremos sometién dosele a vibración continua. En los extremos se introdujo un tapón de lana de vidrio silanizada de 3 cm aproximadamente. La columna se acondicionó en el cromatografo teniéndola a 250°C durante 3 días con un flujo de 25 cc/minuto e inyectándole diariamente 25 ul de bistrimetilsilitrifluoroacetamida.

Haciendo uso de columna compensadora las corridas se hicieron en las siguientes condiciones:

Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del detector	260°C
Flujo del gas portador(nitrógeno)	30 cc/minuto
Flujo de hidrógeno	25 cc/minuto
Flujo de aire	250 cc/minuto

La temperatura en la columna se programó con una temperatura inicial de 130°C durante 10' y luego se incrementó 1°C/minuto hasta llegar a una temperatura final de 210°C, permaneciendo así 10'. La velocidad del registrador se mantuvo en 1 pulgada/5 minutos. El área de los picos se determinó por triangulación y pesada. Los monosacáridos testigos fueron sometidos al mismo procedimiento que el usado con el oligosacárido de GEA.

Purificación del oligosacárido.

Las fases acuosas obtenidas después del tratamiento a pH 2 de las fracciones que contenían el pico radioactivo en la columna de TEAE-celulosa analítica o bien en las de DEAE-celulosa analíticas, se cromatografiaron en placas de sílica: kieselguhr con el solvente E y se revelaron con α -naftol. Cuando se hicieron placas preparativas se reveló una zona marginal y las distintas bandas se suspendieron en igual volumen de agua, se centrifugaron y se colectó el sobrenadante. La extracción

se repitió dos veces con medio volumen de agua.

Reducción del oligosacárido.

Del oligosacárido del GEA purificado por capa delgada, se tomó una alícuota de 360 nanomoles de azúcar total en 50 μ l de agua y se le agregó 50 μ l de una solución 0,04M de H^3NaBH_4 en KOH 1N. Considerando que el oligosacárido tiene 20 azúcares, se tendrían 18 nanomoles de oligosacárido a los cuales se les agregó 2000 nanomoles de H^3NaBH_4 . Esta relación daría un exceso de 100 veces en el H^3NaBH_4 con respecto al grupo reductor, con lo cual se asegura una reducción cuantitativa (136). La mezcla se incubó durante 48 horas a $4^\circ C$ y la reacción se paró con el agregado de 150 μ l de ClH 1N bajo campana de vacío. La muestra se llevó a sequedad con el evaporador rotatorio, se retomó con 0,5 ml de metanol y se evaporó de nuevo; repitiendo la operación 3 veces. Finalmente se tomó en agua y se pasó por una columna de MB-3 de 0,5x5 cm en forma de hidrógeno y acetato. El eluido se concentró y se corrió en papel Whatman 1 con el solvente H durante 68 horas. Después de pasar la tira por el radiocromatografo, el pico radioactivo se eluyó con agua y este fue el material usado como oligosacárido del GEA reducido 3H .

Métodos analíticos.

Azúcares. El contenido de azúcar total de las muestras se midió por el método de la antrona (137) o el del fenol- H_2SO_4 (138).

Fósforo. Para la determinación de fósforo se empleó el método de Cheng et al. (139). Cuando se trataba de cantidades muy pequeñas se empleó el método del verde malaquita (140) modificado en la siguiente forma:

Fósforo inorgánico. La muestra se toma en 0,35 ml de agua y se le agrega sucesivamente 50 μ l de SO_4H_25N , 50 μ l de molibdato de amonio al 2%, 50 μ l de Tween 20 al 1,5%, se agita y luego se agrega 50 μ l de una solución acuosa de verde malaquita al 0,1%. Se deja en reposo 30' a temperatura del ambiente y se lee en espectrofotómetro a 660 nm. Con este método 1 nmol de fósforo da una lectura de 0,120 de densidad óptica; mientras que con

el método de Cheng et al. (139) esa misma lectura se obtiene con 5 nano moles.

Fósforo total. La muestra seca se suspende en 50 ul de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{5N}$ y 20 ul de ácido perclórico al 70%, haciendo luego una digestión a la llama ase^gurándose de eliminar totalmente al perclórico. Después de enfriar los tubos se les agrega 0,2 ml de agua, se dejan 10' en baño de 100°C y se llevan a un volumen final de 0,4 ml. Se continúa igual que con el Pi.

Fósforo lábil. Se siguieron dos métodos. En un caso al lípido seco se suspende en 0,2 ml de agua, se le agrega 50 ul de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{5N}$ y se incuba 10' en un baño a 100°C . Se lleva a 0,4 ml y se prosigue como en el Pi. Cuando la cantidad de lípido en la muestra daba absorción por turbidez se corrigieron con blancos que se hicieron tomando otra alícuota a la que se le agregaron todos los reactivos, excepto que no se calentó en el baño y se le mantuvo a una temperatura menor de 10°C hasta el momento de su lectura para evitar la hidrólisis posible.

El otro método para medir Pi consistió en someter el lípido a tratamiento ácido suave en solventes orgánicos (ver hidrólisis ácida suave del lípido intermediario). Después de hecho el tratamiento ácido suave se hizo una partición y se midió el Pi liberado a la fase acuosa. Con los dos métodos la medida de Pi dio resultados semejantes.

Radioactividad. Los compuestos que tenían ^{14}C se secaron sobre planchetas de aluminio y la radioactividad se midió en un contador de flujo gaseoso. Cuando la muestra se quiso recuperar se usaron planchetas de vidrio.

El ^3H en solución se midió en la mezcla de Bray (141) en un contador de centelleo líquido Packard, con una ventana de 30 a infinito y 60% de ganancia. En estas condiciones setiene una eficiencia del 50%.

Cuando en las cromatografías en papel se tenía ^3H y ^{14}C , se cortó la tira en bandas de 0,5 a 1 cm de ancho, se les agregó 100 ul de agua y aproximadamente 3,5 ml de solución de Bray. El ^{14}C se midió en un canal con ventana de 250 a infinito y 25% de ganancia, en estas condiciones no se mide ^3H . En el segundo canal se midió la mezcla de ^3H y

^{14}C con una ventana de 30-250 y 60% de ganancia. Para determinar qué cantidad del ^{14}C medido en el primer canal penetra en el segundo, se pusieron cantidades conocidas de ^{14}C sobre papeles de las mismas dimensiones que en los problemas. Se midieron en el primer y segundo canal; y se dedujo el porcentaje de la medida del primer canal que aparece en el segundo. De esta manera a cada muestra se le calcula el porcentaje de la lectura del primer canal y se resta a la lectura del segundo canal, obteniendo así la medida del ^3H con una eficiencia del 17%.

La ubicación de la radioactividad en un cromatograma de placa delgada, papel o bien electroforesis en papel se obtuvo por medio de un radiocromatógrafo Packard.

Resultados

Purificación del lípido intermediario.

Columna analítica de TEAE-celulosa. El extracto que se purificó en las columnas preparativas de DEAE-celulosa y luego de ácido silícico, se pasó por una columna de TEAE-celulosa. Se analizaron sus fracciones y los

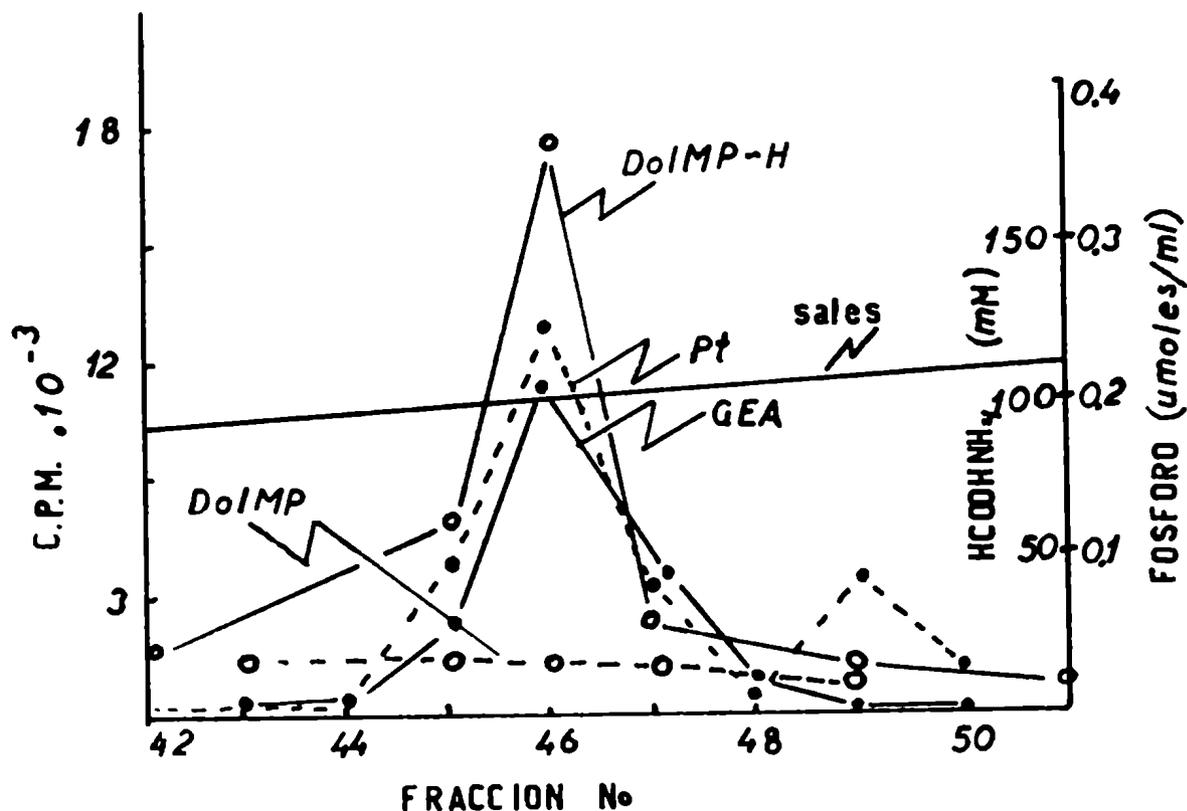


Figura 5. Columna analítica de TEAE-celulosa. El eluido que contenía al GEA radioactivo, que pasó sucesivamente por las columnas de DEAE-celulosa y ácido silícico, se cromatografió en una columna de TEAE-celulosa que se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,133M de formiato de amonio en el solvente A. Se colectaron 60 fracciones de 5ml. En alícuotas de las fracciones se midió la radioactividad del GEA (●—● ; corresponde a cpm/ml); el dolicol fosfato antes (○---○) y después (○—○) de hidrólisis a pH2 en alícuotas de 50 ul (la enzima sólo incorporó 1850cpm); fósforo total (●---●).

resultados aparecen en la Fig. 5; en la cual se puede ver que la radioactividad se eluyó con un pico en la fracción 46, correspondiente a una concentración de aproximadamente 100 mM de formiato de amonio. La radioactividad

apareció mezclada con una substancia amarilla que tuvo su máximo en las fracciones 45-46.

La medida del Pt por el método de Chen et al. (139) reveló un pico que coincidía con radioactividad del GEA. Sin embargo al hacer la medida del fósforo lábil en alicuotas semejantes no fue posible detectarlo con este método. Esto sugería que la mayor parte del P total medido provenía de contaminantes, pues si todo tuviera origen en derivados difosfato del dolicol, la mitad del Ptotal debió ser ácido lábil. En un DolDP-oligosacárido, la unión entre el azúcar y el fósforo β es muy lábil al ácido. La unión entre ambos fosfatos también lo es aunque necesita condiciones un poco más enérgicas que la anterior; mientras que la unión del dolicol al fósforo α es estable a un tratamiento ácido que rompe las dos uniones anteriores (106).

Los azúcares detectados cualitativamente por el fenol SO_4H_2 dieron un máximo en las fracciones 45 y 46. El DolMP se midió por su capacidad de incrementar la formación de DolMPGlu al incubar microsomas de hígado con UDPGlu ^{14}C . Cuando se ensayó directamente, sin previa hidrólisis a pH 2, no se detectó ningún estímulo; mientras que después de la hidrólisis apareció un pico de actividad en la fracción 46.

Columna analítica de DEAE-celulosa. La mitad de la preparación B, después de pasar por la columna de ácido silícico, fue cromatografiada en una columna analítica de DEAE-celulosa. Esta columna también fue eluida con un gradiente lineal de 0 a 0,133M de formiato de amonio. Los resultados de medir en alicuotas de las fracciones el GEA radioactivo, los azúcares liberados a la fase acuosa después de tratamiento ácido suave y el DolMP aparecen en la Figura 6.

El GEA radioactivo emergió con un pico en la fracción 42, donde la concentración de formiato de amonio es de aproximadamente 90 mM. Igual que en la columna de TEAE-celulosa (Fig.5) el GEA estaba mezclado con una substancia amarilla que tuvo un máximo en las fracciones 41-42-43.

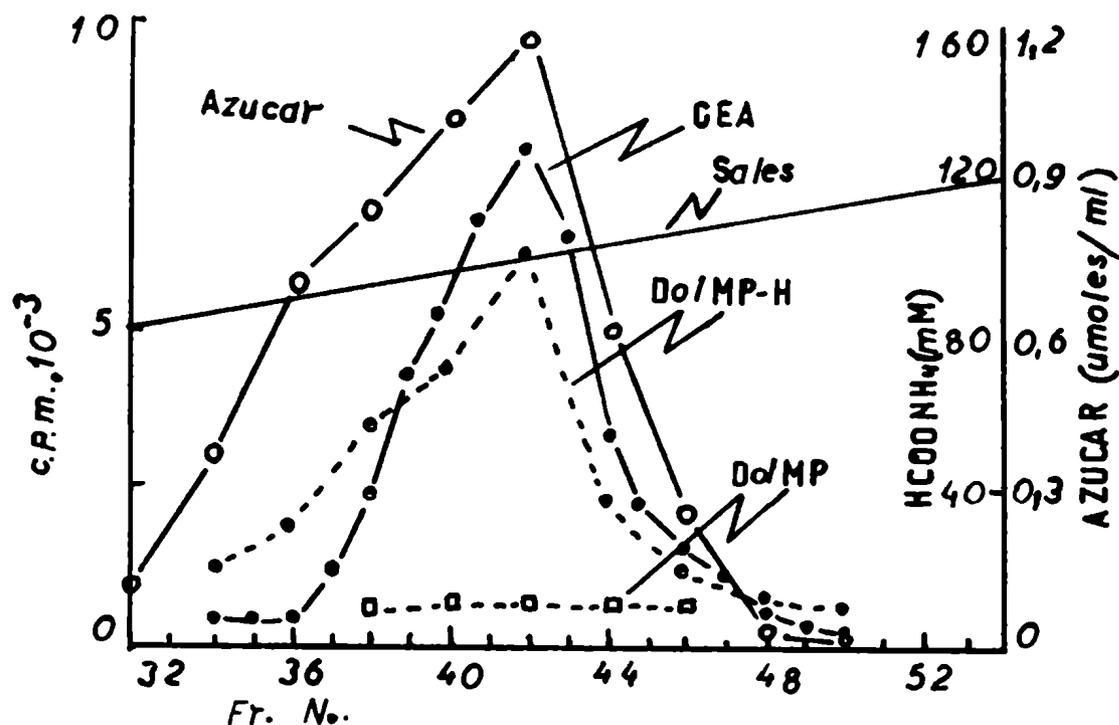


Figura 6. Columna analítica de DEAE-celulosa. El eluido que contenía al GEA radioactivo que se cromatografió sucesivamente por DEAE-celulosa y ácido silícico, se pasó por una columna de DEAE-celulosa que se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,133M de formiato de amonio. Se colectaron 60 fracciones de 5ml. En las fracciones se midió la radioactividad (●—●; expresada en cpm/ml); el Do/MP antes (□—□) y después (●—●) de hidrólisis a pH2 en alícuotas de 50 ul (la enzima sola incorporó 480 cpm); y los azúcares liberados a la fase acuosa después de hidrólisis a pH 2 en alícuotas de 20 ul, expresadas en umoles/ml (○—○).

El ensayo de la actividad de DolMP después de hidrólisis a pH 2 dio un pico en la fracción 42, pero con un hombro hacia la fracción 38. El azúcar ácido lábil medido por el método de la antrona en la fase acuosa siguió un perfil semejante al DolMP. Al igual que en la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5), el ensayo directo del DolMP no evidenció ningún estímulo.

En las tablas VIII y IX se muestra el grado de purificación alcanzado hasta esta etapa; obteniéndose una relación Pt/Pl de 5,41 (Tabla X) o sea más alta de la esperada. Esto hizo que se intentara mejorar la purificación por otros medios. El fósforo lábil se llegó a medir con el método del verde malaquita que es más sensible que el Cheng et al. (ver métodos analíticos). En estas fracciones no se detectó P inorgánico.

Columna de Sephadex LH-20. Una alicuota de la combinación de las fracciones 41-42-43 de la columna de DEAE-celulosa (Fig. 6), se pasó por una columna de Sephadex LH-20, previamente equilibrada con el solvente A y eluyéndose con el mismo solvente. La radioactividad apareció de nuevo mezclada con la sustancia amarilla y en el pico radioactivo la relación de Pt/Pl fue de 5,28. Resultados semejantes se obtuvieron empleando el solvente K.

Precipitación. Siendo conocido que el GEA migra en cromatografía en capa delgada en n-propanol-agua (7:3) (113), se ensayó su solubilidad en este solvente. De la combinación de las fracciones 41-43 de la columna de DEAE-celulosa (Fig. 6) se secó una alicuota y se tomó en una mezcla de n-propanol-agua (65:35) en la cual se logró solubilizar todo el material. Después se fue agregando propanol y al completar un 60% del volumen original, la solución se tornó turbia. Se centrifugó y se obtuvo un precipitado en el cual se recuperó el 90% de la radioactividad. La mayor parte de la sustancia amarilla quedó en el sobrenadante. Se repitió la precipitación dos veces y el precipitado final se disolvió en el solvente A. Al medir P_{total} y P_{lábil} se les encontró en una relación 2,81/1. Inicialmente esta relación, como se mencionó anteriormente, era

de 5,28.

Columna analítica de DEAE-celulosa después de precipitación. En vista del resultado anterior, la segunda mitad de la preparación B, después de eluida del ácido silícico, se le practicaron 3 precipitaciones y se pasó por una columna analítica de DEAE-celulosa igual a la descrita anteriormente. La radioactividad emergió en la fracción 37, correspondiendo a una concentración de formiato de amonio 84 mM (Fig. 7-A). En la Fig. 7-A se muestran los resultados de medir DolMP y azúcar ácido lábil. El ensayo directo del DolMP de nuevo fue negativo. El obtenido después de hidrólisis a pH2 tiene un pico principal en la fracción 37 y uno secundario en la fracción 31. El azúcar ácido lábil tiene un perfil semejante. En la Fig. 7-B aparecen los resultados de medir el Pt y el Pl. El Plábil dio un perfil semejante al del DolMP después de tratamiento ácido suave y al azúcar liberado por el mismo tratamiento. El P total presentó dos máximos, el mayor en la fracción 29 y el menor en la 37. Esto hace que en la última fracción la relación Pt/pl sea 2,37 y en la fracción 31 dicha relación sea de 4, lo cual significaría la persistencia de contaminantes que contienen P total.

En la Tabla VIII aparece la purificación del GEA en función de la medida en alicuotas de P total en cada etapa de purificación. No aparecen datos para la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) pues ésta se hizo con la preparación A (ver métodos) y siendo la primer preparación que se hizo no se dejaron alicuotas para confeccionar tabla de purificación. En la Tabla VIII, se observa que el máximo de purificación se obtuvo con la columna analítica de DEAE-celulosa después de precipitación (Fig. 7). Cuando la purificación se expresa en función de P lábil (Tabla IX) también a esta columna corresponde el máximo de purificación. Si bien la diferencia con la DEAE-celulosa analítica sin precipitación previa (Fig. 6) no es considerable. Este hecho estaría indicando que la precipitación con n-propanol purificó fundamentalmente de sustancias que contienen P orgánico. El número de veces que se purificó por P lábil es menor que el número de veces que se purificó por P total. Esto

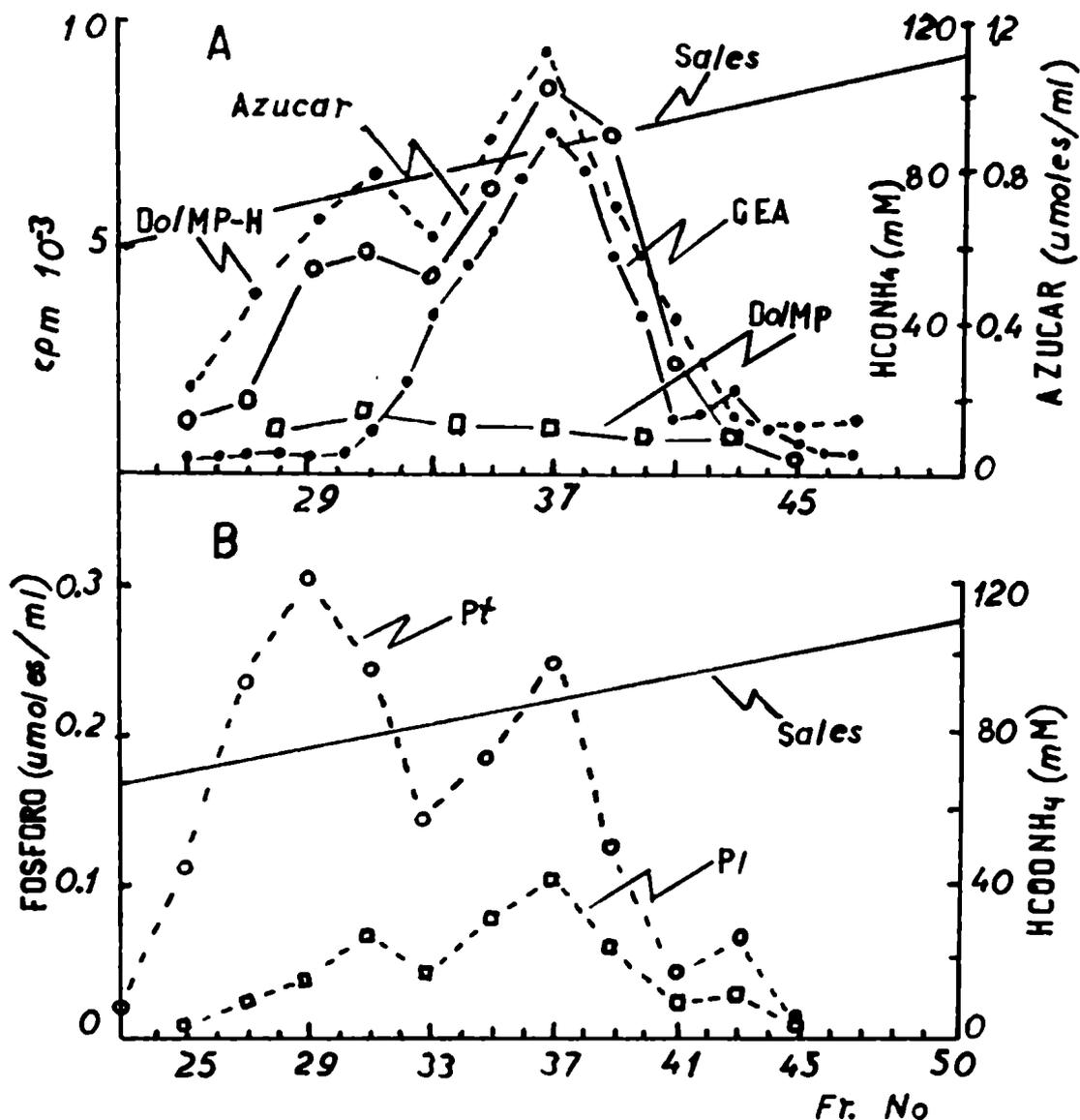


Figura 7. Columna analítica de DEAE-celulosa después de precipitación.

El eluido de la columna de ácido silícico que contenía el GEA radioactivo, se tomó en n-propanol-agua(65:35) y se le agregó un 60% de n-propanol con lo cual precipitó la radioactividad (ver métodos). La precipitación se hizo tres veces y el precipitado final se pasó en el solvente A por una columna idéntica a la descrita en la Fig.6. En las fracciones se midió:

A. El GEA radioactivo(●—●; aparece en cpm/ml); el Do/MP antes (□—□) y después(○- - -○) de hidrólisis a pH2 en alícuotas de 50 ul (la enzima sola incorporó 1210 com); los azúcares liberados a la fase acuosa después de hidrólisis a pH2 en alícuotas de 20 ul, expresados en μmoles/ml (○—○).

B. P total(○- - -○) y P lábil (□- - -□) aparece en μmoles/ml.

es debido a que la contaminación original por material que contiene P lábil es menor que la contaminación por P total (Tablas VIII y IX).

Tabla VIII. Purificación del GEA en función del P total

Fracción	GEA ¹⁴ C cpm totales x 10 ³	Pt en la fracción (umoles)	GEA ¹⁴ C/Pt cpm/umol de P total	No de purifi- cacio- nes	Recu- pera- ción ¹⁴ C (%)
Extracto	300	14300	21	1	100
DEAE-celu- losa pre- parativa	216	196	1102	52	72
Ac.Silícico	180	29	6206	294	60
DEAE-cel. analítica(a)	110	9,7	11340	540	36
DEAE-cel. analítica(b)	37	1,4	26428	1258	12

El extracto crudo de la preparación B se dividió en dos volúmenes iguales y se purificó a través de las etapas que aparecen (ver Métodos). En cada etapa se midió en alícuotas el P total y la radioactividad del GEA ¹⁴C.

(a). Se refiere a la combinación de las fracciones 41-42-43 de la columna DEAE-celulosa analítica (Fig. 6).

(b). Es la columna de DEAE-celulosa analítica hecha después de precipitación con propanol y los datos son para la fracción No 37 (Fig. 7). El No de purificaciones es el cociente entre el valor de cada fracción y el del extracto crudo.

Como se mencionó anteriormente en un DolDP-oligosacárido la relación Pt/Pl es de 2. En la purificación del GEA debería observarse que esta relación se aproxima al valor teórico esperado. Para determinar si esto ocurre se elaboró la Tabla X que muestra cómo se acerca a la relación Pt/Pl de 2 a medida que se purifica el GEA. El valor más próximo es

en la columna de DEAE-celulosa analítica (Fig.7) que se hizo después de precipitación con n-propanol. Sin embargo se ve aún la persistencia de material con P orgánico. En estas fracciones no se detectó la presencia de P inorgánico.

Tabla IX. Purificación del GEA por P lábil.

Fracción	GEA ¹⁴ C cpm totales x 10 ³	P lábil en la fracción(umoles)	GEA ¹⁴ C/P1 cpm/umol de P lábil	No. de purifi- cacio- nes	Recu- pera- ción ¹⁴ C%
Extracto	300	1181	254	1	100
DEAE-cel. prepar.	216	8,1	26684	105	72
Ac.Silícico	180	4,25	43352	170	60
DEAE-cel. anal.(a)	110	1,79	61523	242	36
DEAE-cel. anal.(b)	37	0,59	62711	246	12

En las diferentes etapas se tomaron alicuotas en las cuales se midió el P lábil (ver métodos) (a). y (b). corresponden a lo mismo de la Tabla VIII.

Otro parámetro en la purificación del GEA es la medida del DolMP liberado por hidrólisis ácida suave en las diferentes etapas.

En la Tabla XI aparecen los resultados de medir DolMP en alicuotas tomadas en las diferentes etapas de purificación del GEA que fueron previamente tratadas con ácido en condiciones suaves. El DolMP como se describió antes se mide por su capacidad aceptora de glucosa al incubar las fracciones con microsomas y UDPGlu. Al valor obtenido así se le

Tabla X. Relación P total/P lábil en la purificación del GEA.

Fracción	P total en la fracción (umoles)	P lábil en la fracción (umoles)	Relación Pt/Pl
Extracto	14300	1181	12,11
DEAE-celulosa prep.	196	8,1	24,12
Ac. silícico	29	4,25	6,82
DEAE cel. anal. (a)	9,7	1,79	5,41
DEAE-cel. anal. (b)	1,4	0,59	2,37

En base a los datos que aparecen en las tablas VIII y IX se calcula la relación P total/P lábil. (a). y (b). significan lo mismo que en la Tabla VIII.

resta el de un blanco obtenido al incubar la enzima con una alícuota igual que no fue previamente sometida a hidrólisis ácida suave. En la Tabla XI se aprecia que también en este caso el mayor grado de purificación corresponde a la columna de DEAE-celulosa después de precipitación con n-propanol (Fig. 7). El grado de purificación alcanzado para el DolMP es menor que el obtenido para el GEA (Tabla VIII); 756 y 1258 veces respectivamente. Esto estaría indicando que el DolMP presente no pertenece todo al GEA. Por la misma razón la recuperación del DolMP es menor que la del GEA¹⁴C (ver discusión).

Purificación del oligosacárido.

Las fracciones de las columnas analíticas de TEAE- y DEAE-celulosa se analizaron por cromatografía en capa delgada. Cuando se corrieron

Tabla XI. DolMP liberado por tratamiento ácido en las etapas de purificación del GEA.

Fracción	DolMP(c) nmoles de glucosa in- corporados	Ptotal en la frac- ción (u- moles)	DolMP/Pt nmoles de glu/umol de Pt	Puri- fica- ciones	Recupera- ción DolMP (%)
Extracto	94,6	14300	0,006	1	100
DEAE-cel.	70,6	196	0,36	60	74
Ac. silíci- co	39,0	29	1,34	233	41
DEAE-cel. (anal. (a))	19,5	9,7	1,89	315	20
DEAE-cel. (anal. (b))	6,5	1,4	4,54	756	7

En alicuotas tomadas en las diferentes etapas de purificación se midió el DolMP después de tratamiento ácido suave. La medida se hizo por incremento en la formación de DolMPGlu* al incubar cada fracción con microsomas y UDPGlu* (ver métodos). En cada fracción se restó el valor de la glucosa incorporada por la enzima incubada con una alicuota igual que no fue previamente tratada con ácido. (a) y (b) corresponden a lo mismo que en la Tabla VIII.(c), es el valor de la glucosa incorporada para formar DolMPGlu. Se midió simultáneamente todas las fracciones con la misma enzima microsomal.

alicuotas de la fracción 46 de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) en placas de sílica-kieselguhr con el solvente E, el revelado con vapores de yodo y/o con α -naftol-SO₄H₂ mostró una mancha difusa entre un Rf 0,39 y 0,58, con un máximo de intensidad en Rf 0,5. La radioactividad tenía un Rf de 0,46.

El hecho de que se revelara una mancha difusa que no coincidía toda con la radioactividad, estaba indicando la presencia de otros compuestos además del GEA. Se intentó obtener una mejor separación con otros solventes, pero los resultados fueron insatisfactorios. En cambio cuando

corrió el material de la fase acuosa después de hidrólisis a pH 2 de alicuotas de las fracciones, el revelado con α -naftol presentó dos manchas violeta. Una con Rf 0,16 y la otra con Rf 0,47. La primera de dichas manchas, tal como se muestra en la Tabla XII, tiene su máximo en la fracción 46. Además se encontró que tiene la misma movilidad que el pico radioactivo del GEA. La segunda de las manchas tiene un máximo en la fracción 47.

Tabla XII. Oligosacáridos liberados por tratamiento ácido suave de las fracciones de la columna de TEAE.

No. de fracción	43	45	46	47	49
Oligosacárido Rf 0,16	-	±	++	-	-
Oligosacárido Rf 0,47	-	-	++	+++	-

Las fracciones de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) fueron tratadas a pH 2, 10' a 100°C. Los oligosacáridos liberados a la fase acuosa se separaron en una placa delgada de sílica-kieselguhr con el solvente E. Las cruces significan la intensidad relativa del revelado con α -naftol. La radioactividad del oligosacárido del GEA ¹⁴C coincidió con el oligosacárido de Rf 0,16.

Cuando se analizaron cantidades mayores aparecieron otras bandas que se muestran en sus cantidades relativas en la 4a columna de la Tabla XIII. Para poder comparar mejor distintas cromatografías, además del Rf se muestra la movilidad relativa de cada banda con respecto a la movilidad del oligosacárido del GEA. Esto aparece tabulado como R_{rel}. En el fraccionamiento preparativo de los oligosacáridos las bandas se eluyeron con agua.

También se analizó el perfil de oligosacáridos después de hidrólisis ácida suave de la combinación de las fracciones 41-42-43 de la columna analítica de DEAE-celulosa (Fig. 6). En la Tabla XIV se dan las cantidades relativas de las diferentes bandas. Se ve que en esta corrida

Tabla XIII. Cromatografía en papel de los azúcares de los oligosacáridos.

Banda No.	Rgea(a)	Rf	Oligosa- cárido	Glu	Man	Hexosa- minas	Gal	Desco- nocado
0	0	0	+	-	+	-		-
1	0,33	0,06	+	++	++	+	+	-
2	1,0	0,18	++++	++++	++++	++	-	-
3	2,0	0,36	±	±	±	±	++	-
4	2,83	0,51	++	±	-	++	+	-
5	3,60	0,65	+	±	-	-	-	++

El material acuoso soluble después de hidrólisis a pH 2 de la fracción 46 de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) se fraccionó a escala preparativa en una placa de sílica-kieselguhr con el solvente E. Las bandas se revelaron con α -naftol en una zona marginal y el resto se eluyó con agua. El eluido se hidrolizó con ClH 3N a 100 °C durante 3 horas y se analizaron los monosacáridos por cromatografía en papel con el solvente I.

a. Corresponde a la movilidad de cada banda/movilidad del oligosacárido del GEA.

no apareció la banda No. 1. La banda No. 3 apareció proporcionalmente en mayor cantidad que la obtenida en la fracción 46 de la columna de TEAE-celulosa (Tabla XIII). Por lo demás ambos perfiles de oligosacáridos son muy semejantes.

El material hidrosoluble después de tratamiento ácido suave de las fracciones de la columna analítica de DEAE-celulosa después de precipitación, también se analizó como en los casos anteriores. Los resultados aparecen en la Tabla XV. Si bien en este caso las bandas aparecen distribuidas en varias fracciones, en definitiva el perfil de oligosacáridos tomados en conjunto es igual al observado en las columnas anteriores.

Tabla XIV. Oligosacáridos obtenidos de la columna de DEAE-celulosa (Fig.6) por hidrólisis a pH 2.

Banda No.	0	1	2	3	4	5
Rgea	0	0,33	1	2,10	2,83	3,30
Cantidad	+	-	+++	++	+	+

A la combinación de las fracciones 41-42-43 de la columna analítica de DEAE-celulosa (Fig.6), se le hizo tratamiento ácido suave y la fase acuosa se cromatografió en capa delgada en la misma forma que se indica en Tabla XII. Aparece únicamente el Rgea (ver Tabla XIII) porque la placa se desarrolló dos veces. La radioactividad correspondió a la banda No. 2.

Cuando se fraccionaron los oligosacáridos a escala preparativa, para asegurarse de la pureza de la banda No. 2 que corresponde al oligosacárido del GEA radioactivo, se cromatografiaron alicuotas del eluido

Tabla XV. Oligosacáridos obtenidos en la columna de DEAE-celulosa (Fig.7) por hidrólisis a pH 2.

Banda No.	Rf	Rgea	Fracción 31	Fracción 37	Fracción 39
0	0	0	-	+	+
1	0,06	0,33	-	-	+
2	0,19	1,00	-	++	±
3	0,44	2,31	++	+	±
4	0,55	2,89	++	+	±
5	0,66	3,47	±	+	+

Alicuotas de las fracciones de la columna de DEAE-celulosa (Fig. 7), que fuera efectuada con material purificado previamente por precipitación con propanol, fueron sometidas a hidrólisis ácida suave. Los oligosacáridos liberados a la fase acuosa se cromatografiaron en capa delgada tal como se indica en la Tabla XII.

con agua en diferentes solventes y placas. En todos los casos apareció una mancha única que coincidió con el pico radioactivo. En la Tabla XVI aparecen los distintos Rf obtenidos en cada sistema. Las placas lavadas que aparecen en la tabla, se refiere a que previamente se desarrollaron con metanol-ClH (ver métodos: cromatografía en placa delgada).

Tabla XVI. Cromatografía en capa delgada del oligosacárido del GEA.

Tipo de placa	Solvente	Rf
Silica-kieselguhr	E	0,18
Silica-kieselguhr lavada	H	0,46
Silica-kieselguhr lavada	G	0,30

Alicuotas del oligosacárido del GEA (banda No.2) del fraccionamiento preparativo de los oligosacáridos, se corrieron en los sistemas indicados. El azúcar se detectó con α -naftol y la radioactividad por el radiocromatógrafo. En todos los sistemas se visualizó una sola mancha que coincidió con el pico radioactivo.

Después de remover el ClH se usaron sin activar. También se corrió una alicuota en una placa de kieselguhr con el solvente F, el resultado no aparece en la Tabla XVI porque se desarrolló dos veces la placa. El revelado mostró una sola mancha ligeramente difusa que coincidió totalmente con la radioactividad. Los resultados que aparecen en la Tabla XVII muestran el grado de purificación alcanzado hasta la segunda capa delgada en función del azúcar ácido lábil. Este corresponde al grado de purificación del oligosacárido del GEA, en el cual corre como una sustancia homogénea que coincide con la radioactividad (Tabla XVI). Comparando con las Tablas VIII y IX se observa que el número de veces que se purifica por azúcar es menor que cuando la purificación se expresa por Ptotal o Plábil. Este hecho está indicando que el material contaminante que contiene azúcar ácido lábil es menos abundante que el

que contiene fósforo. El grado de purificación alcanzado con la DEAE-celulosa analítica hecha después de precipitación es semejante al alcanzado con la misma columna sin precipitación previa (a y b, Tabla XVII).

Tabla XVII. Purificación del oligosacárido del GEA.

Fracción	GEA ¹⁴ C cpm totales x 10 ³	Azúcar en la fracción (umoles)	GEA ¹⁴ C/a- zúcar(cpm/ umol)	No. de puri- ficaciones	Recu- pera- ción ¹⁴ C,%
Extracto	300	3000	100	1	100
DEAE-cel. prep.	216	313	690	7	72
Ac. silí- cico	180	45,8	3930	39	60
DEAE-cel. anal.(a)	110	16,81	6540	65	36
DEAE-cel. anal.(b)	37	5,4	6851	68	12
1er capa fina (c)	60	3,41	17540	175	20
2a. capa fina (d)	37	2,07	17852	178	12

Alicuotas de las diferentes fracciones se sometieron a hidrólisis a pH 2 y después de partición se midió el contenido de azúcares en la fase acuosa por el método de la antrona (ver métodos). En los casos de las capas finas se midieron alicuotas del eluido. (a) y (b) corresponden a lo mismo de la Tabla VIII. (c).- es la corrida en placa de sílica kieselguhr a escala preparativa de los oligosacáridos con el solvente E. Los oligosacáridos fueron obtenidos de la DEAE-celulosa analítica (Fig. 6), fracciones 41-43 combinadas (d). - El eluido de la banda correspondiente al oligosacárido del GEA de la capa delgada anterior, se recromatografió con el solvente G en una placa de sílica-kieselguhr lavada. El No. de purificaciones corresponde al cociente entre el valor de cada fracción y el del extracto.

Análisis del oligosacárido.

Cromatografía en papel. El material hidrosoluble obtenido después de hidrólisis a pH 2 de la fracción 46 de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) se fraccionó en una capa delgada preparativa de sílica-kieselguhr con el solvente E. Se reveló una zona marginal de la placa y las bandas se eluyeron con agua. Estos eluidos se sometieron a hidrólisis total y los hidrolizados se cromatografiaron en papel con el solvente I. Los monosacáridos se revelaron con plata y alcalí.

Los resultados obtenidos se suman en la tabla XIII. La banda No. 2, que corresponde al oligosacárido del GEA, dio manosa y glucosa en cantidades semejantes y una pequeña cantidad de hexosaminas. Para control se desarrolló con el mismo solvente una placa idéntica a la usada para el fraccionamiento de los oligosacáridos. Se dividió en las bandas correspondientes y a los eluidos se les practicó hidrólisis total. Estos hidrolizados se corrieron en papel con el mismo sistema. En varios casos apareció una mancha de glucosa, por lo cual las cantidades de glucosa están afectadas de incertidumbre en cuanto a su valor real. El compuesto de la banda 0 reveló únicamente manosa. El No. 1 dio los mismos azúcares de la banda No. 2 y además galactosa. El compuesto No. 3 dio únicamente hexosaminas y su cantidad era muy poca. El No. 4 tenía hexosaminas, galactosa y trazas de glucosa. Como el compuesto No. 5 presentaba en la placa delgada un Rf casi igual al de la glucosa, se le corrió en papel directamente y después de hidrólisis total. En ambos casos corrió un compuesto único con un Rglu de 0,26. En papel no impregnado con SO_4Z se obtuvo el mismo resultado.

Cromatografía en fase gaseosa. Dado que no se tenía seguridad en cuanto a la cantidad real de los azúcares en el oligosacárido del GEA, se repitió el análisis por cromatografía gaseosa. Para lo cual se hizo una combinación de las fracciones 41-42-43 de la columna analítica de DEAE-celulosa (Fig. 6) y se sometió a hidrólisis a pH 2. La fase acuosa que contiene a los oligosacáridos liberados se cromatografió en una placa de sílica-kieselguhr, tal como se describió anteriormente. Las diferentes

bandas se eluyeron y la correspondiente al oligosacárido del GEA (banda No. 2, Tabla XIV) se cromatografió de nuevo con el solvente G en una placa de sílica-kieselguhr lavada. El objeto de usar placas lavadas fue para introducir la menor cantidad de impurezas en el cromatógrafo. Al revelar con α -naftol apareció una sola banda con Rf 0,30 que coincidió con la radioactividad. Esta banda se eluyó con agua, como también en 4 bandas del mismo ancho de la del oligosacárido, dos anteriores y dos posteriores a la misma. Estas bandas sirven como controles. En los eluidos de las bandas se midió azúcar total por el método de la antro-na, siendo únicamente positivo en la banda radioactiva.

A los eluidos de la banda del oligosacárido y de los controles se les agregó arabitol y manitol como testigos internos y se sometieron a metanolisis durante 24 horas. Después de ser N-acetiladas y sililadas se pasaron por el cromatografo de gases. Previamente se calibró la columna sometiendo una mezcla de azúcares testigos al mismo tratamiento, es decir metanólisis, N-acetilación y sililación. La Fig. 8 muestra los tiempos de retención del arabitol, manosa, galactosa, glucosa, manitol, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina.

La Fig. 9-A corresponde al cromatograma de las 4 bandas control. En todos los casos los resultados fueron idénticos. El pico 1 corresponde al arabitol y los picos 7 y 8 al manitol. Este pico 8 apareció también cuando se cromatografió manitol directamente. Como el pico 8 también corresponde a un pico secundario de la N-acetilglucosamina, se tomó como área total de ésta al pico principal o sea al No. 11 (Fig. 8), Tanto en los problemas como en los testigos.

La Fig. 9-B muestra el cromatograma obtenido con los azúcares del oligosacárido del GEA. Apareciendo manosa, glucosa y N-acetilglucosamina. Las cantidades de cada azúcar presente en este cromatograma se cuantificaron según el método de Clamp et al. (134). Los resultados aparecen en la Tabla XVIII, en la cual se puede ver que la relación Man:Glu es 6:2:1. Cuando se hizo con el oligosacárido purificado solamente hasta

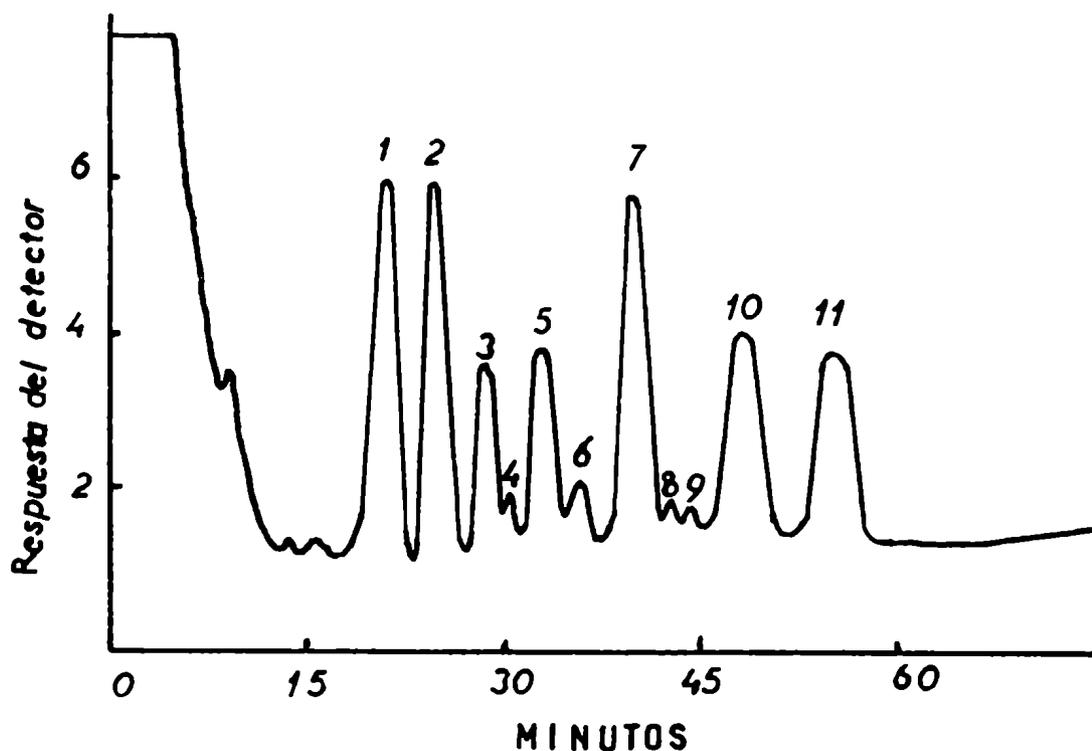


Figura 8. Cromatografía gaseosa de azúcares conocidos. Muestras de azúcares comerciales fueron sometidas a metanólisis, N-acetilación y sililación como se describió en métodos. Luego se corrieron en el cromatografo de gases. Los picos aparecen anumerados en orden creciente de los tiempos de retención: 1, arabitol; 2, manosa; 3,4, galactosa; 5, 6, glucosa; 7, manitol; 9,10, N-acetilgalactosamina; 8,11, N-acetilglucosamina. Los picos de cada azúcar fueron identificados en cromatografías previas efectuadas con cada azúcar por separado en presencia de arabitol y manitol.

la primer capa delgada se obtuvieron resultados semejantes. Esta relación es la misma si se hace en la columna de relación del área total ajustada (columna 4 de la Tabla XVIII). Esto hace que dicha relación

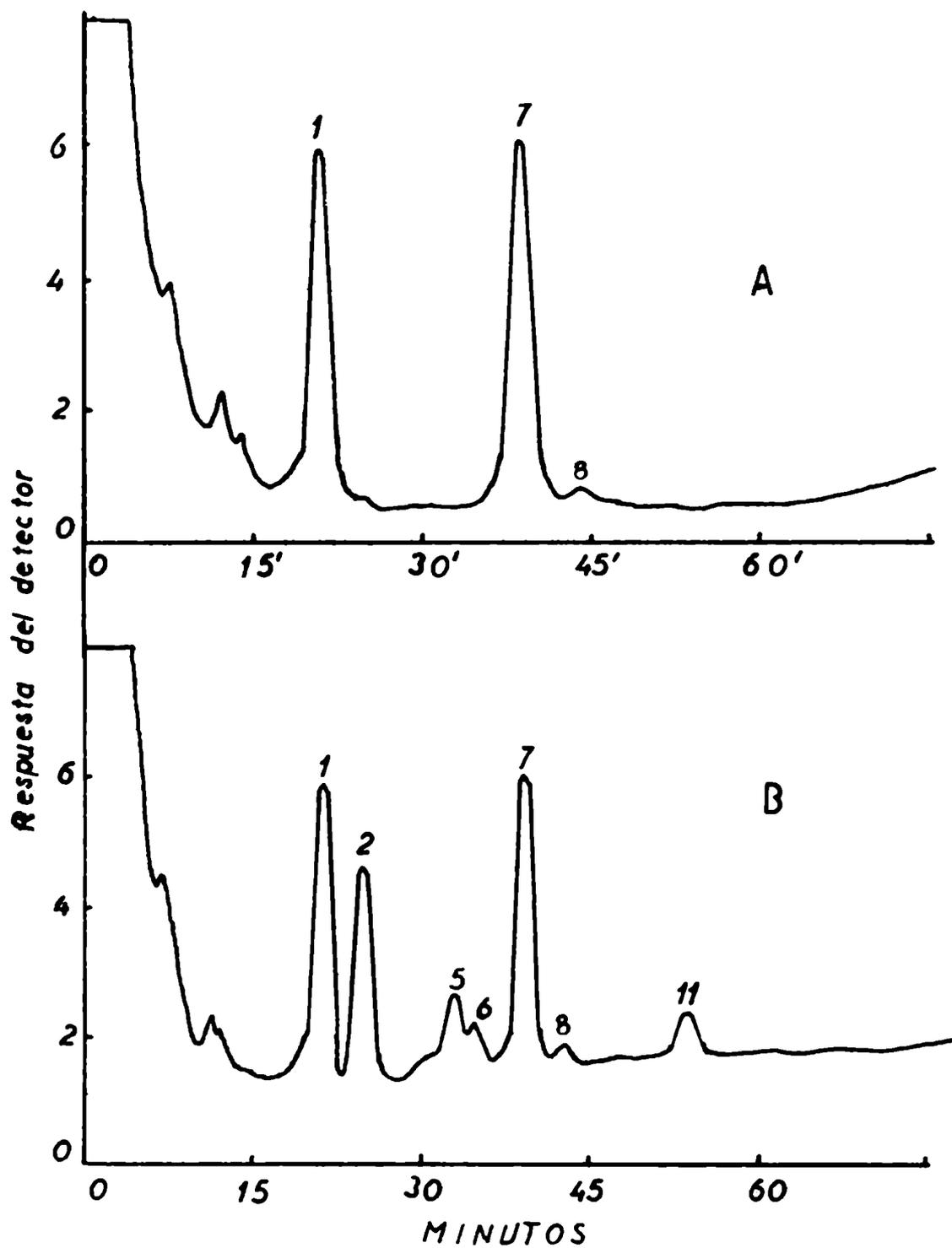


Figura 9. Cromatografía en fase gaseosa de los azúcares del GEA. (cont. Pág. siguiente)

Figura 9. (Continuación). Los oligosacáridos se fraccionaron a escala preparativa en una placa de sílica-kieselguhr con el solvente E y se eluyeron con agua las diferentes bandas. El eluido de la banda del oligosacárido del GEA (banda No. 2) se recromatografió con el Solvente G en una placa de sílica-kieselguhr lavada. El revelado con α -naftol mostró una sola mancha que coincidió con el pico radioactivo. Se eluyó esta banda y dos anteriores y posteriores como controles. A los eluidos se les agregó manitol y arabitol, para luego someterlos a metanólisis, N-acetilación y sililación. Finalmente se corrieron en el cromatógrafo de gases.

A.- Muestra el resultado de las bandas de control.

B.- Corresponde a la banda que contiene al oligosacárido del GEA. El número de los picos corresponde al orden creciente en el tiempo de retención como se describe en la fig. 8.

Tabla XVIII. Cálculo del contenido de azúcares en el oligosacárido del GEA.

Monosacárido	Area total de los picos (mm^2) (a)	Relación del área total (b)	Relación del área total ajustada (c)	nmoles de monosacárido/ugr de oligosacárido (d)	Relación aproximada de los azúcares (e)
Manosa	547	0,608	0,547	4,24	6
Glucosa	183	0,203	0,183	1,42	2
N-acetilglucosamina	48	0,053	0,095	0,74	1

(a) Suma del área de los picos obtenidos para cada azúcar en el cromatograma de la Fig. 9-B.

(b) Area total de cada monosacárido dividida por el área del arabitol testigo (900 mm^2)

(c) Relación del área total multiplicada por el factor de ajuste molar. Para la manosa y glucosa fue de 0,9 y para la N-acetilglucosamina de 1,8. Estos factores se calcularon a partir de cromatogramas en los cuales se corrieron cantidades conocidas de cada monosacárido.

(d) Relación del área total ajustada multiplicada por nmoles de arabitol/ugr de muestra (7,75 nmoles/ugr)

(e) Es la relación aproximada al número entero más cercano.

sea independiente de la cantidad de oligosacárido estimada por la antrona.

En las muestras se agregó 7,6 ugr de arabitol por 6,4 ugr de azúcar total de oligosacárido medido por la antrona (ver métodos: cromatografía en fase gaseosa). Esto hace que la cantidad de azúcar del oligosacárido represente un 84% de la cantidad de arabitol presente. Esta proporción puede medirse independientemente en el cromatografo, midiendo la proporción del área total de los monosacáridos en relación al área de arabitol. La suma de las áreas ajustadas de los monosacáridos es de 0,825 (suma de los valores de la columna 4 de la Tabla XVIII), y la del arabitol es 1. Esto significa que el área de todos los monosacáridos es un 82,5% del área del arabitol, lo cual es muy próximo al 84% estimado en base a la antrona.

Identificación del extremo reductor. Una alicuota del oligosacárido del GEA purificado hasta la primer capa delgada (ver Tabla XVIII) se redujo con $^3\text{H NaBH}_4$ y se corrió en papel con el solvente H. Al radiocromatografiar la tira se observó un solo pico con una movilidad semejante al oligosacárido del GEA. El pico se eluyó con agua y este será el oligosacárido del GEA reducido ^3H al cual se hará mención en los próximos experimentos.

Para comparar el oligosacárido frío que se redujo con el marcado con glucosa ^{14}C , se corrió una alicuota del oligosacárido del GEA reducido ^3H en papel con el solvente H. La tira se pasó por el radiocromatografo, apareciendo un pico único, luego se cortó en bandas de 0,5 cm y se midió diferencialmente ^3H y ^{14}C . Los resultados aparecen en la Fig. 10, donde se observa que el trazado de la radioactividad del ^3H coincide practicamente todo con el trazado del ^{14}C , quedando el pico entre un tamaño de maltooligosacáridos de 16 a 17 unidades.

En la Tabla XIX aparecen los datos sobre la cantidad de ^3H incorporado en el pico de la Fig. 10 en relación a la cantidad de oligosacárido expresada como azúcar total. Esta relación indica el número de

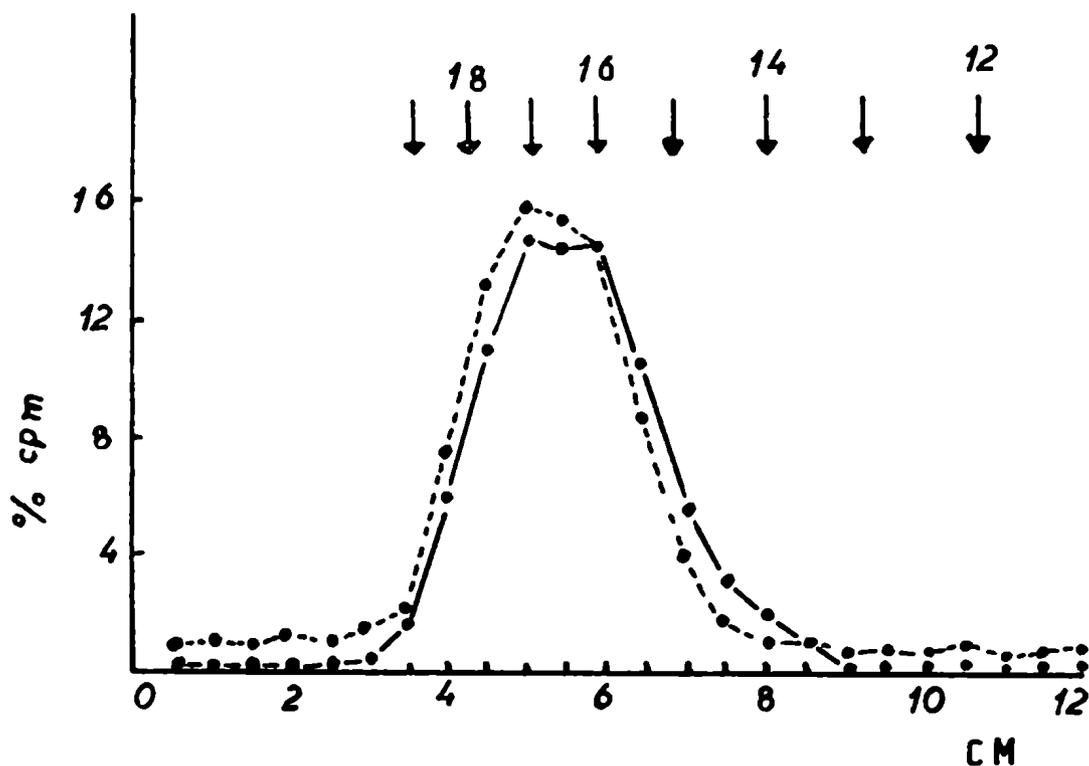


Figura 10. Cromatografía en papel del oligosacárido del GEA reducido con $^3\text{HNaBH}_4$. Una alicuota del oligosacárido del GEA reducido con $^3\text{HNaBH}_4$ se corrió en papel con el solvente H. La tira pasó por el radiocromatografo para ubicar la radioactividad y luego esa zona se cortó en bandas de 0,5cm de ancho. En las bandas se midió diferencialmente el contenido en ^3H (●—●) y ^{14}C (○---○). Las flechas en la parte superior indican la posición de maltoligosacáridos con el número de unidades. Estos maltoligosacáridos de tamaños crecientes se obtuvieron por hidrólisis ácida parcial de la amilosa. Como la glucosa escapó del papel el tamaño de los maltoligosacáridos se determinó por comparación con la migración de un testigo de inositol que corre entre maltoligosacáridos de 3 y 4 unidades.

azúcares presentes por extremo reductor o sea el tamaño del oligosacárido. Por esta relación se establece que el oligosacárido del GEA tendría de 18-19 azúcares (ver discusión).

Tabla XIX. Cantidad de ^3H incorporado al extremo reductor.

Azúcar Total (nmoles)	^3H en cpm	natomos de ^3H incorporados	Azúcar total/ / ^3H (nmoles/ /natomos)
2,28	1603	0,123	18,54

En la alicuota de oligosacárido del GEA reducido ^3H que corrió en papel (Fig. 10) se mide la cantidad total de ^3H presente. En base a que el ^3H se contó en esas condiciones con una eficiencia del 17% se determina el número de natomos de ^3H , presentes en la alicuota. Sabiendo que la alicuota de oligosacárido corresponde a 2,28 nmoles de azúcar total medidos por el método de la antrona se hace la relación de azúcar total a ^3H presente en el extremo reductor del oligosacárido.

Para identificar el monosacárido que se redujo con el $^3\text{HNaBH}_4$ se tomó una alicuota del oligosacárido ^3H y se sometió a una hidrólisis en $\text{ClH } 3\text{N}$ a 100°C durante 3 horas. El hidrolizado se cromatografió en papel con el solvente I. Al obtener el radiocromatograma (Fig. 11-A) se vieron dos picos, uno que coincide con el testigo frío de glucosaminitol y otro con el de glucosa. Al medir diferencialmente ^3H y ^{14}C (Fig. 11-B) se encontró que toda la radioactividad del glucosaminitol es ^3H y la del pico de glucosa es ^{14}C . El pico de glucosaminitol de otro cromatograma igual fue eluido del papel con agua, luego fue N-acetilado y cromatografiado en papel con el mismo solvente (Fig. 12). Toda la radioactividad pasó a tener una movilidad igual a la del N-acetilglucosaminitol.

Como en el solvente I no se separan la glucosamina de la galactosamina (123), se pensó que tampoco se separarían los correspondientes alditoles. Se buscó entonces un sistema en el cual fuera dado conseguir dicha separación. Se ha descrito la separación de varios alditoles por electroforesis en papel con molibdato de sodio al 2% pH 5 (130). En este sistema se corrió el pico de N-acetilglucosaminitol eluido del cromatograma descrito en la Fig. 12, obteniendo una buena separación del n-acetilgalactosaminitol (Fig. 13).

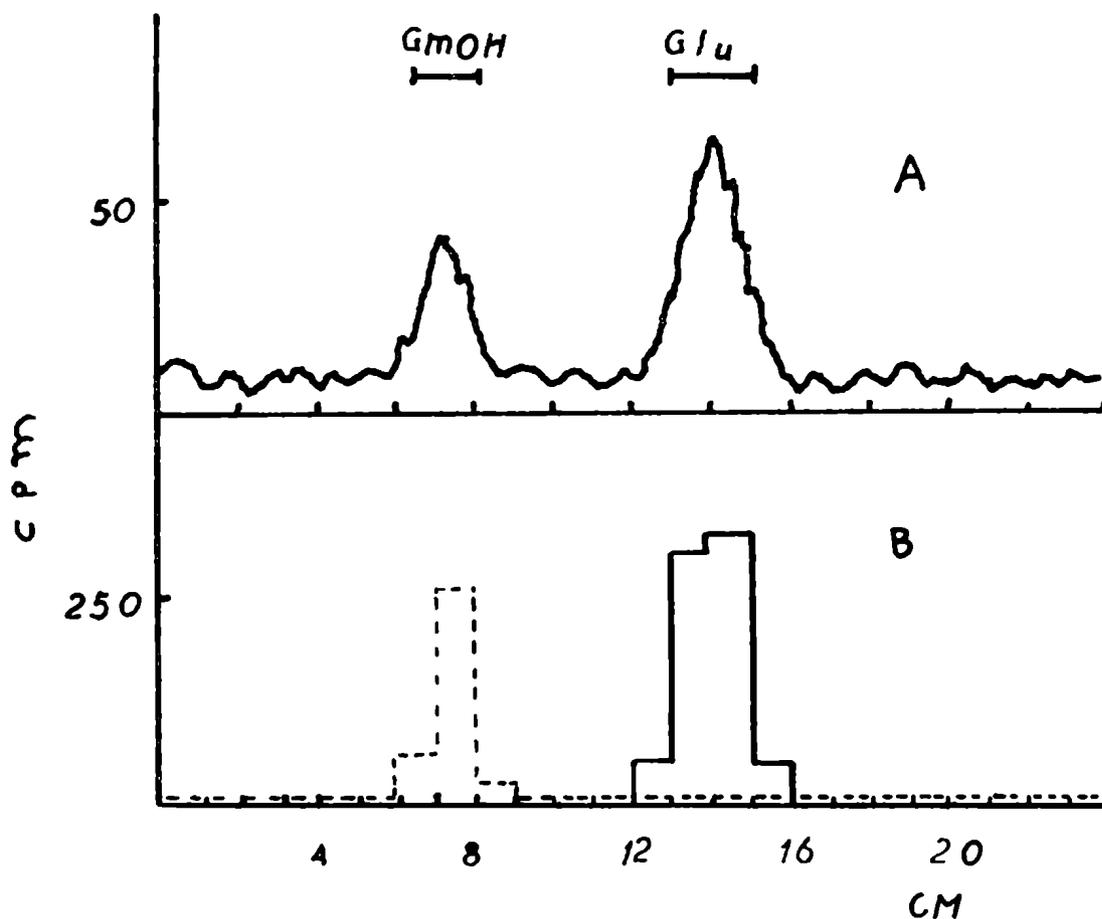


Figura 11. Hidrólisis total del oligosacárido del GEA reducido con $^3\text{HNaBH}_4$. Una alicuota del oligosacárido del GEA reducido se hidrolizó en $\text{ClH } 3\text{N}$, 3 horas a 100°C y se corrió con el solvente I. A.- Radiocromatograma de la tira. B.- La tira se cortó en bandas de 1cm y se midió diferencialmente ^3H (----) y ^{14}C (—). Los azúcares fríos corridos como testigos internos se revelaron con plata y alcali.

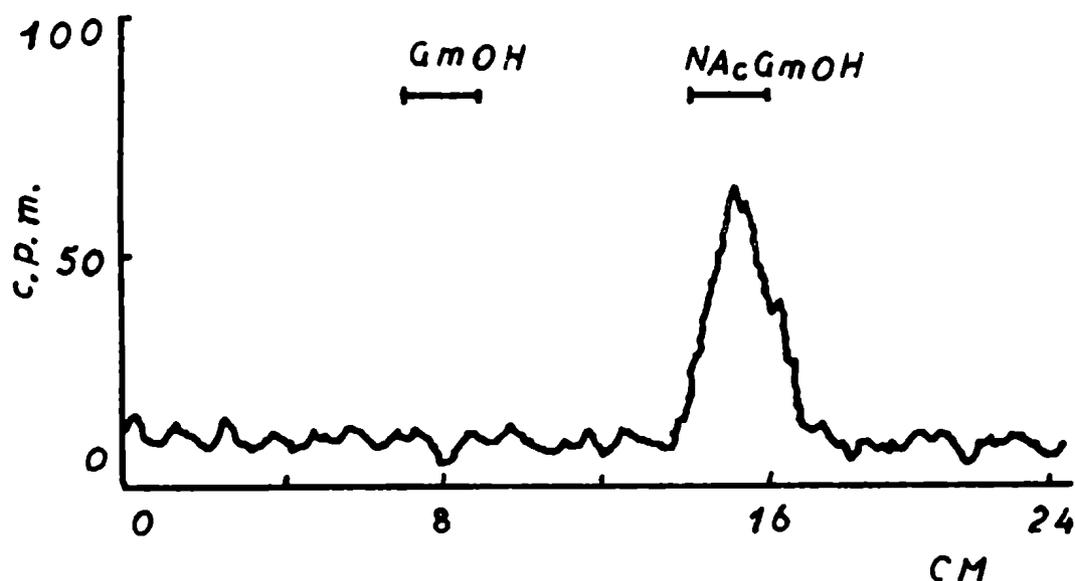


Figura 12. N-acetilación del glucosaminitol ^3H . El pico que corre como glucosaminitol después de la hidrólisis total del oligosacárido del GEA reducido ^3H (Fig. 11) se eluyó del papel y se N-acetiló (142). Se corrió de nuevo en papel con el solvente I y la radioactividad se ubicó con el radiocromatografo (~~~~~). Los azúcares se revelaron con plata y alcali.

El oligosacárido del GEA reducido ^3H se desacetiló por tratamiento con KOH 2N a 100°C durante 2 horas. Después se eliminó el KOH por precipitación con ácido perclórico y se hidrolizó con ClH 1, 5 N, 2 horas a 100°C . El hidrolizado se corrió en papel con el solvente I. Al pasar la tira por el radiocromatografo se vio que la radioactividad no corrió igual al glucosaminitol como en el caso anterior (Fig. 11), sino que pasó a migrar con un pico cercano al origen y otro muy chico sobre el origen mismo (Fig. 14). Este último posiblemente corresponde a oligosacárido no hidrolizado completamente. El pico que se movió lo hizo con un Rglu de 0,11. Dolicol difosfato di-N-acetilquitobiosa ^{14}C obtenido por síntesis enzimática según lo describen

Leloir et al. (78), se hidrolizó a pH 2 con lo cual se obtiene di-N-acetilquitobiosa. Esta se redujo con KBH_4 y se desacetiló por tratamiento alcalino. El compuesto así obtenido es quitobiosa reducida (quitobitol) y la serie de reacciones y tratamientos que se hicieron para obtenerlo se esquematizan en la Fig. 15. Este compuesto, el quitobitol ^{14}C se corrió en papel con el solvente I, mostrando un Rglu de 0,09.

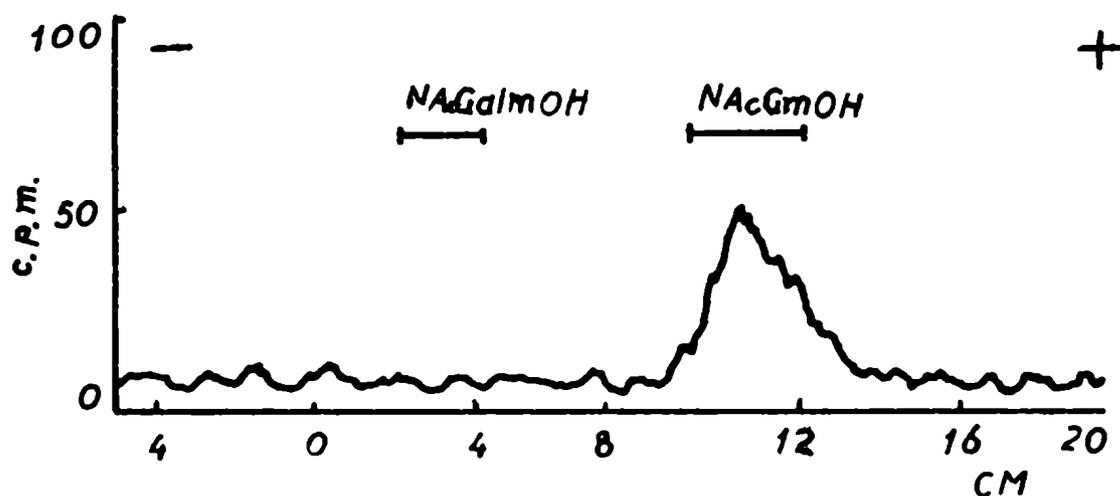


Figura 13. Electroforesis del N-acetilglucosaminitol ^3H . El pico de la Fig. 12 se eluyó y se sometió a una electroforesis en MoO_4Na_2 al 2%, pH 5, 20 v/cm durante 1,5 horas. La tira se pasó por el radiocromatógrafo y los azúcares testigos se revelaron con plata y alcali.

Esto hizo pensar que el pico con Rglu de 0,11 de la Fig. 14 podría tratarse también de quitobitol. Para corroborarlo se eluyó del papel y se sometió a una electroforesis en ácido fórmico al 5%, poniendo al lado en la misma tira una muestra de quitobitol ^{14}C obtenido como se indicó

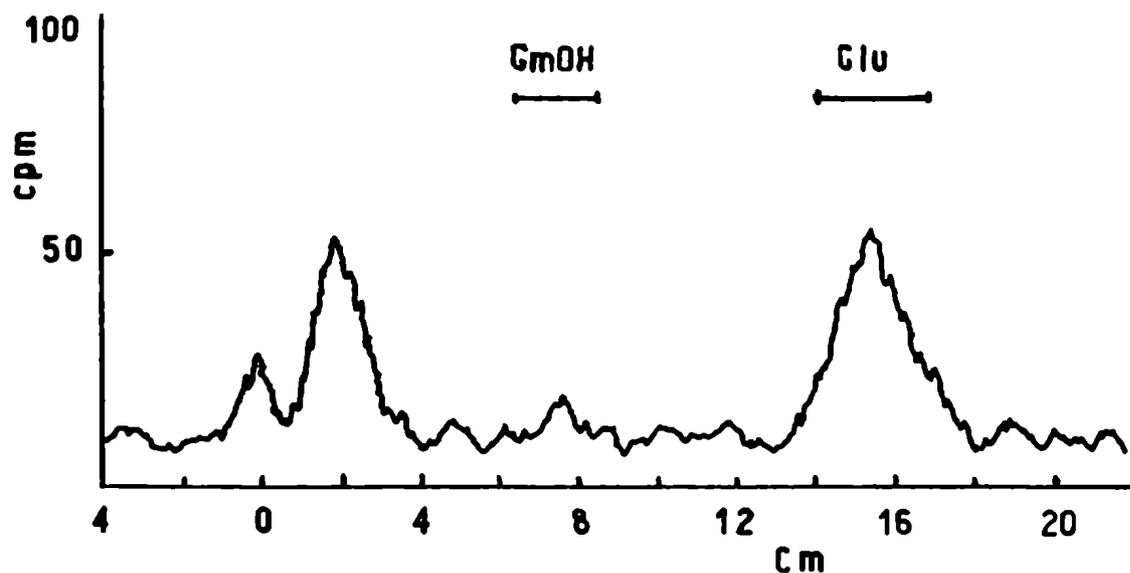


Figura 14. Hidrólisis del oligosacárido reducido ^3H y desacetilado. Una alicuota del oligosacárido del GEA reducido ^3H , se desacetiló en KOH 2N a 100°C durante 2 horas y se hidrolizó en ClH 1,5N, 2 horas a 100°C . Se corrió en papel con el solvente I. El trazado corresponde al radiocromatograma y se indican los azúcares testigos revelados con plata y alcali.

en la Fig. 15. En la Fig. 16 se observa que el compuesto tritulado corrió prácticamente en la misma posición que el testigo de quitobitol ^{14}C .

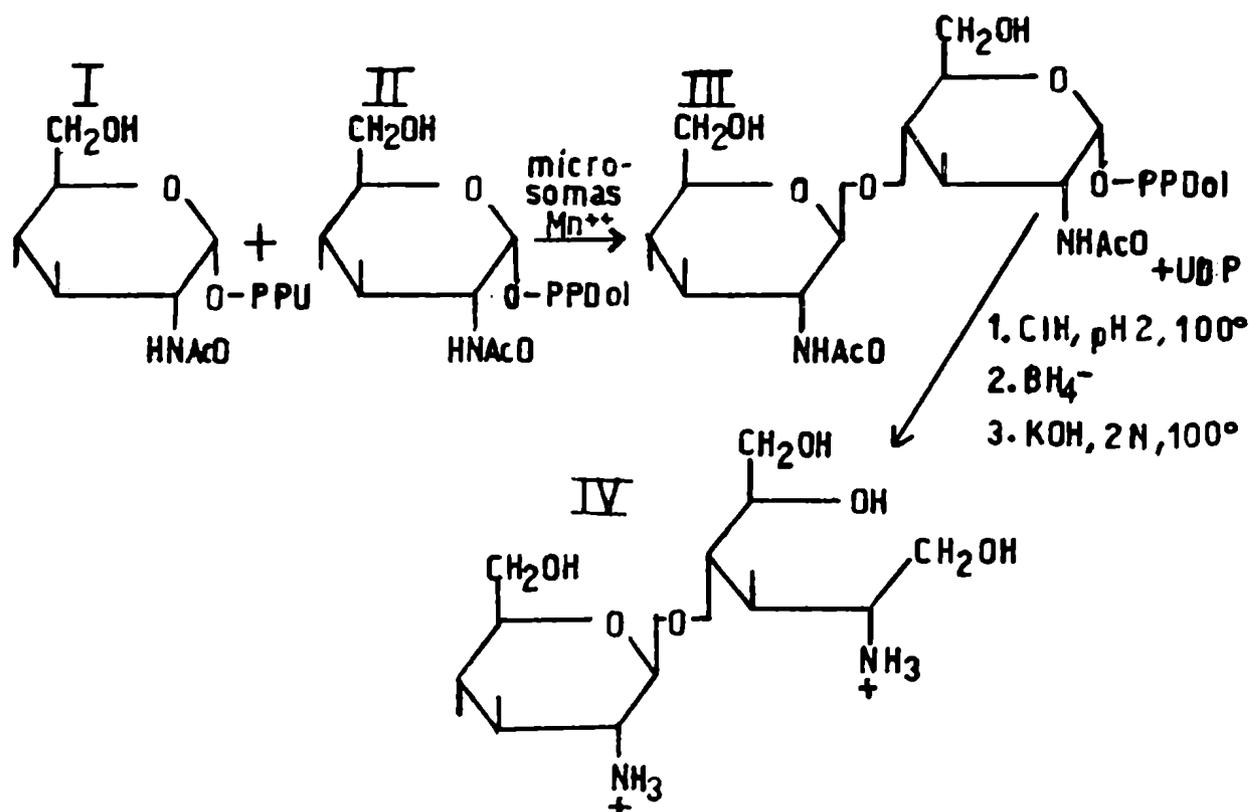


Figura 15. Reacciones para obtener quitobiosa reducida (quitobitol) ¹⁴C.
 El DolDPNacGlu ¹⁴C reacciona en presencia de microsomas y de un exceso de UDPNacGlu formandose DolDP-N-diacetilquitobiosa. Este se hidroliza a PH 2, obteniendose di-N-acetilquitobiosa que se reduce con KBH₄, luego se desacetila con alcali. El compuesto final es el quitobitol ¹⁴C.
 I: UDPNacGlu; II: DolDPNacGlu ¹⁴C; III: DolDPNacGlu*-NacGlu = DolDP di-N-acetilquitobiosa; IV: quitobiosa reducida ¹⁴C (quitobitol).

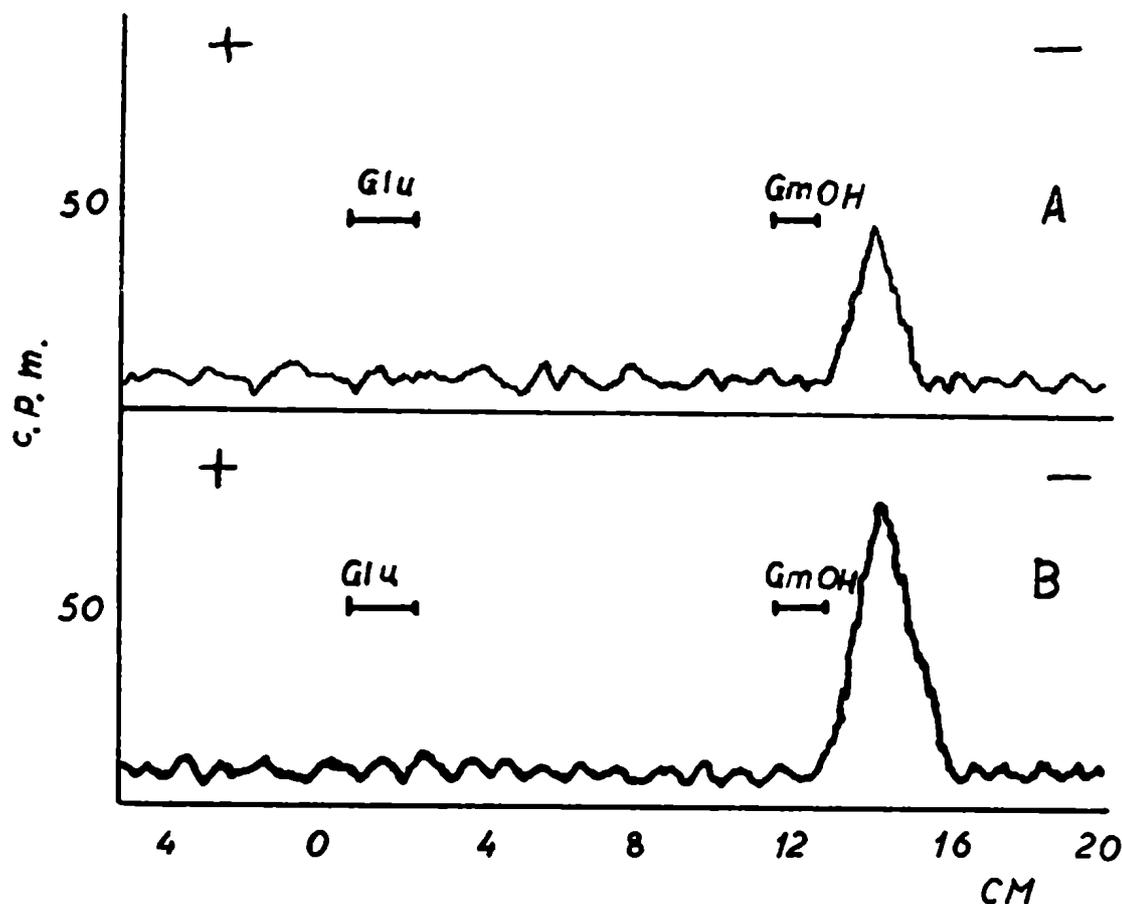


Figura 16. Electrofocis del probable quibitol ^3H .

A.- El pico con Rglu 0,11 (Fig. 14) obtenido de la hidrólisis del oligosacárido del GEA reducido ^3H y desacetilado se eluyó y se corrió en electrofocis en ácido fórmico al 5%, 20 v/cm durante 3 horas.

B.- Simultáneamente al lado se corrió una muestra conocida de quibitol ^{14}C obtenida como se describe en la Fig. 15. Los azúcares indicados corresponden al revelado con plata y alcali de los testigos internos.

Análisis de la molécula lipídica.

Se vio en las columnas analíticas (Fig. 5-6-7) que al medir directamente el DolMP, por su capacidad de estimular la formación de DolMPGlu con microsomas de hígado incubados con UDPGlu, no se detectó ninguna actividad. Si las fracciones se someten previamente a tratamiento ácido suave se encuentra actividad de DolMP. Esa actividad, al provenir del DolMP liberado en la hidrólisis ácida del GEA, debería tener características cromatográficas distintas al mismo e iguales a las del DolMP. Preliminarmente se estudió su comportamiento en una columna de ácido silícico, donde como se vio antes, el GEA se eluye únicamente con el solvente A. Para ello se tomó en cloroformo-metanol(1:1) una alicuota de la fase inferior de la fracción 46 de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) después de hidrólisis a pH 2. Se pasó a una columna de ácido silícico de 4 ml previamente equilibrada con cloroformo-metanol (1:4). Se eluyó con 3 volúmenes (12 ml) del mismo solvente y finalmente con el mismo volumen del solvente A. Las fracciones se concentraron y se midió en ellas la actividad de DolMP (Tabla XX). Toda la actividad emergió en la fracción de cloroformo-metanol (1:1). Esto muestra que el compuesto responsable de esa actividad, después de tratamiento ácido suave, cambió su comportamiento en el ácido silícico con respecto al GEA. La substancia amarilla que como se dijo anteriormente estaba presente en esta fracción de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) eluyó con el solvente A.

Las fracciones de esta columna se corrieron en una capa delgada de silica gel con el solvente J y se reveló con anisaldehído, con el cual los poliprenoles dan un color verde. Los resultados se muestran en la Fig. 17. Se observa que la fracción cloroformo-metanol (1:1) da compuestos (Fig. 17 -A) con Rf 0,09, 0,82, y 1,2. En cambio en la fracción del solvente A se revelaron dos manchas, una en el origen y otra con Rf 1 (Fig. 17 -B).

El DolMP en este sistema corre con un Rf 0,80 a 0,84 (60). La fracción cloroformo-metanol (1:1) se trató con ácido más fuerte y se

Tabla XX. Cromatografía en ácido silícico de la actividad de DolMP liberada por hidrólisis a pH 2 del GEA.

Fracción	Volumen	CPM
Sin agregado	-	220
Cloroformo-metanol(1:1)	2ul	523
Cloroformo-metanol(1:1)	5ul	849
Solvente A	2ul	227
Solvente A	5ul	290

La fracción No. 46 de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) se sometió a hidrólisis a pH2, 10' a 100°C y la fase inferior se tomó en cloroformo-metanol (1:1). Se pasó por una columna de ácido silícico de 4ml. Se eluyó con el mismo solvente y se obtuvo una primera fracción y con el solvente A se obtuvo una segunda fracción. Se concentraron las fracciones y se midió DolMP por el estímulo en la formación de DolMPGlu, al incubar microsomas con UDPGlu*, utilizando 2 cantidades en cada fracción.

corrió en el mismo solvente (Fig. 17-C). Al revelarse apareció una sola mancha con Rf 0,82. Estos resultados sugerían que en la fracción cloroformo-metanol (1:1), que tiene toda la actividad de DolMP se revelan con el anisaldehído dos manchas, una con un Rf semejante al DolMP. La otra con una menor movilidad, pero si esta fracción se somete previamente a un tratamiento ácido más enérgico da únicamente la mancha con Rf semejante al DolMP. La mancha con Rf 1 en A y B (Fig. 17) además de tener un color verde diferente, estaba en iguales cantidades en ambas fracciones y en C no apareció.

Como este tipo de análisis demanda el uso de más material, se analizaron las corridas en capa delgada midiendo enzimáticamente al DolMP. Este método es 5-10 veces más sensible que el revelado con

anisaldehido. Para medir el DolMP en las placas, estas se dividieron en bandas de 1 cm y se eluyeron con cloroformo-metanol-ClH (ver métodos: dosaje del DolMP). En los eluidos se mide al DolMP, incubandolos con mi crosomas de hígado de rata y UDPGlu ¹⁴C. Se mide el DolMPGlu ¹⁴C formado, apareciendo un incremento en su formación en aquellas bandas donde está presente el DolMP. En la Fig. 18-A se muestran los resultados de correr la fase inferior obtenida después de hidrolizar a pH2 la fracción

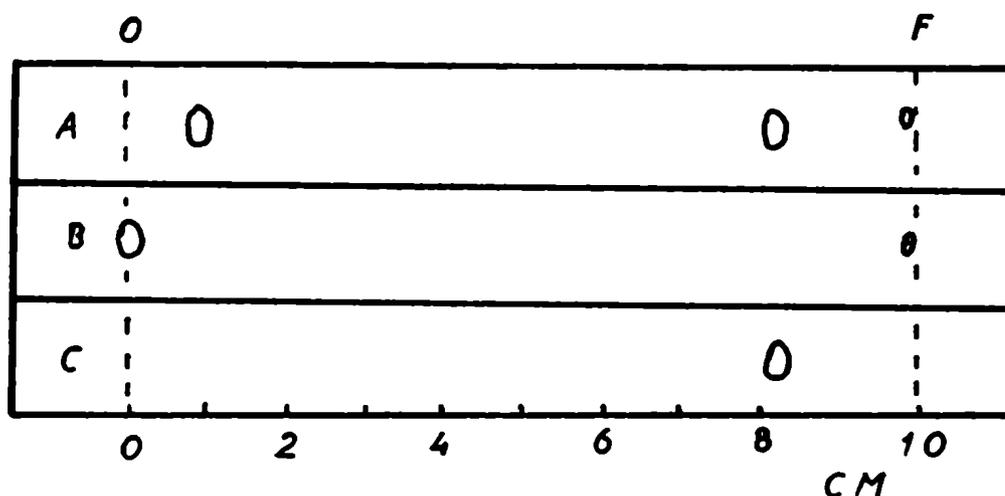


Figura 17. Cromatografía en capa delgada de las fracciones de la Tabla XIX. Aliquotas de las fracciones se corrieron en una placa de sílica gel con el solvente J y se revelaron con anisalaldehido. A.-Fracción cloroformo-metanol(1:1). B.- Fracción del solvente A C.- La fracción de cloroformo-metanol (1:1) se sometió previamente a hidrólisis en propanol-ClH 1N, 10' a 100°C, se eliminó el ácido y se concentró al vacío.

No. 46 de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) En la misma placa se corrió una muestra de DolMP natural (Fig. 18-B). Se observa que parte de

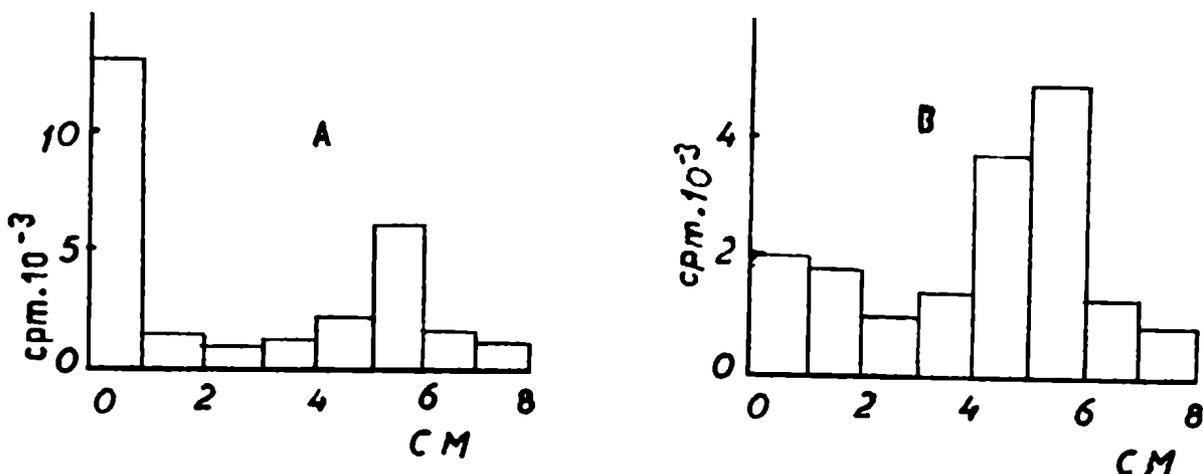


Figura 18. Cromatografía en capa delgada del resto lipídico.

A.- La fracción No. 46 de la columna de TEAE-celulosa (Fig. 5) se sometió a hidrólisis a pH 2, 10' a 100°C, seguida de partición. La fase inferior se corrió con el solvente D en una placa de silica gel lavada., se eluyeron bandas de 1 cm (ver métodos) y en cada una se midió la actividad de DolMP por el estímulo en la formación de DolMPGlu al incubar microsomas de hígado de rata con UDPGlu. B.- En la misma placa se corrió una muestra de DolMP natural.

la actividad liberada por tratamiento ácido suave de la fracción 46 corre en una posición semejante a la del DolMP natural (R_f 0,68 y 0,65 respectivamente), pero gran parte de la actividad queda en la fracción del origen. El DolMP natural mostró un pico de menor actividad en esta fracción.

De una placa semejante a la que aparece en la Fig. 18-A, se eluyó la fracción del primer centímetro. Una alícuota control se corrió tal cual en el mismo solvente y tipo de placa (Fig. 19-A). Otra alícuota se tomó en cloroformo-metanol (3:2), agregándole ClH concentrado para una concentración final de 1N, se incubó 3 horas a 37°C. Se hizo

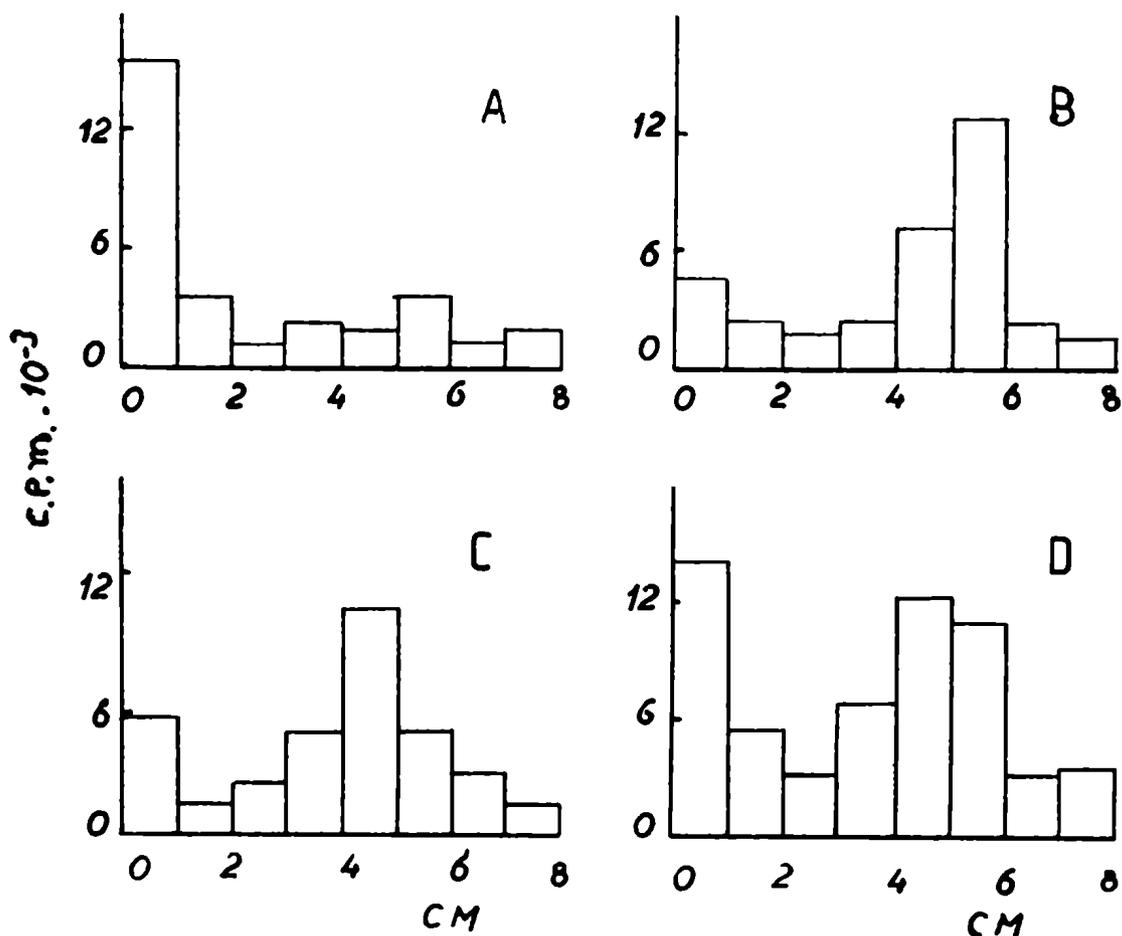


Figura 19. Tratamiento ácido de la actividad DolMP en la fracción del origen. Se corrieron con el solvente D en una misma placa de sílica lavada las siguientes muestras: A.-Una alícuota del eluido de la fracción del primer centímetro en una placa idéntica a la Fig. 18-A. B.- Una alícuota del eluido igual a la anterior, que previamente se trató con ClH en cloroformo-metanol (3:2), 3 horas a 37°C . C.- DolMP natural. D.- DolMP sintético. En cada caso se eluyeron bandas de 1 cm y se midió el DolMP según lo descrito en la leyenda de la Figura 18.

partición para extraer el ácido y se corrió en la misma placa que la alicuota control (Fig. 19-B). Se encontró que en el control la actividad continúa apareciendo en el origen, lo cual muestra que el procedimiento de elución no afecta la movilidad del compuesto del origen. En cambio la alicuota sometida al tratamiento ácido más drástico, la actividad pasó a tener una movilidad semejante a la del DolMP. En la misma placa también se corrieron muestras de DolMP natural (Fig. 19-C) y DolMP sintético (Fig. 19-D). El último mostró mucha actividad en la fracción del origen.

Es de hacer notar que mientras el DolMP natural y sintético corrieron con Rf 0,56 y 0,58 respectivamente, el pico de actividad obtenido después de tratamiento ácido de la fracción del origen corrió con un Rf 0,65. Sin embargo cuando se corrió el DolMPGlu ¹⁴C formado con

Tabla XXI. Migración del DolMPGlu* formado con los diferentes aceptores.

Solvente	B	C	D
Aceptor		Rf	
Posible DolDP(a)	0,33	0,73	0,32
Tratado con ácido(b)	0,33	0,74	0,31
DolMP sintético	0,35	0,75	0,29
DolMP natural	0,32	-	0,30

(a) Corresponde a la elución del primer centímetro como se ve en la Fig. 19-A.

(b) La fracción anterior sometida previamente a tratamiento con ClH 1N en cloroformo-metanol (3:2), 3 horas a 37°C. Las diferentes fracciones se ensayaron para DolMP y la fase orgánica con teniendo el DolMPGlu se concentró y corrió en placas de sílica gel. La radioactividad se ubicó con el radiocromatografo.

cada fracción los R_f fueron semejantes en varios solventes (Tabla XXI). Se supuso que las diferencias observadas podrían deberse a las diferentes cantidades de lípido que se siembra en cada caso. Para ver esta influencia se tomaron dos alicuotas DolMPGlu * que tenían 1500 cpm cada una. A una de ellas se le agregó 10 μ l de DolMP natural (48 nmoles de P orgánico) y se corrieron en una placa de silica en el solvente D. La muestra que tenía agregado de DolMP migró con un R_f de 0,29 y la que no tenía con 0,35. Lo anterior sugiere que la cantidad presente de material puede explicar las diferencias observadas.

Una posible explicación de que aparezcan dos picos de actividad de DolMP, sería que el tratamiento a pH 2 del GEA da lugar a la liberación de una mezcla de DolMP y DolDP. Este permanece en la banda del origen y un tratamiento ácido más enérgico lo transformaría en DolMP.

El supuesto DolDP, al incubarse con los microsomas y UDPGlu*, da lugar también a la formación de DolMPGlu* (Tabla XXI). Este hecho significaría que en los microsomas hay una fosfatasa que hidroliza el segundo fosfato del DolDP. El DolMP formado serviría como aceptor de la glucosa del UDPGlu para dar DolMPGlu. La Fig. 20 muestra el resultado de una experiencia realizada para probar esa afirmación. Se usó como substrato una alicuota del eluido de la banda del primer centímetro de una placa como la que se muestra en la Fig. 18-A. Se incubó con microsomas y el extracto orgánico se corrió en una placa de silica lavada, midiéndose el DolMP en el eluido de las diferentes bandas (Fig. 20-B). Como control se incubaron los microsomas solos, agregando al final de la incubación la alicuota del substrato (Fig. 20-A). Claramente se ve que en el caso de la alicuota incubada con los microsomas, la actividad pasa a tener un R_f semejante al DolMP. En cambio en el control la actividad permanece en el origen.

Se afirmaría más la suposición que el compuesto que permanece en el origen de las cromatografías en placa delgada es DolDP, si simultáneamente con la formación de DolMP se pudiera detectar la liberación de P_i :

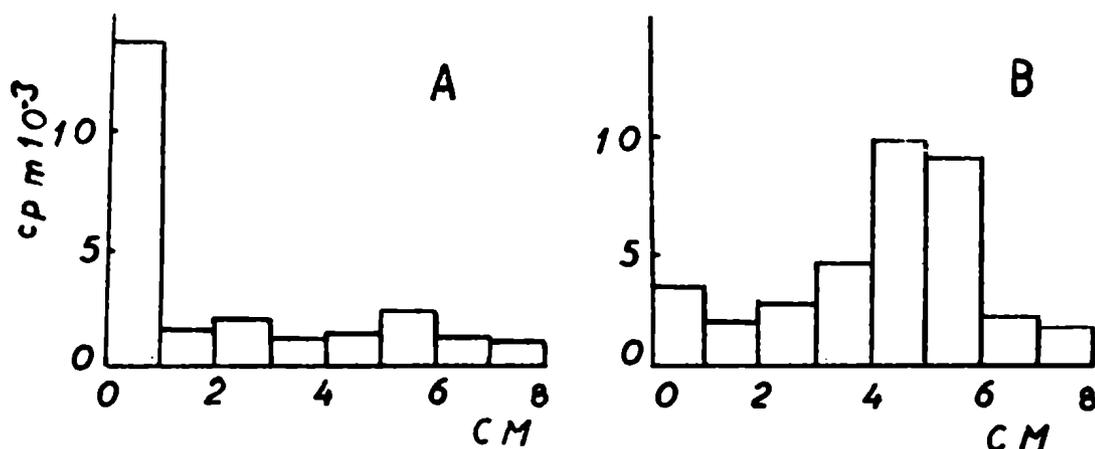


Figura 20. Acción enzimática sobre el probable DolDP. Como sustrato se usó el material obtenido al eluir la banda del primer centímetro de una placa como la que se presenta en la Fig. 18-A. La mezcla de incubación es la descrita en Métodos para el dosaje del DolMP, sin el agregado de UDPGlu*. En B el sustrato y la enzima se incubaron juntos a 37°C durante 30'. A es un control en el cual la enzima se incuba sola agregando el sustrato al final de la incubación. Las fases orgánicas concentradas se cromatografiaron con el solvente D en una placa de sílica lavada. En el eluido de las bandas se midió la actividad de DolMP.



Inicialmente se intentó medir el Pi liberado por la acción de la fosfatasa microsomal, en condiciones como las que se describen en la Fig. 20. Sin embargo, la enzima al ser incubada sola libera de por sí cantidades muy altas de Pi. De manera que se optó por medir el Pi liberado por tratamiento ácido suave. Se tomó una alicuota de la combinación de las fracciones 41-42-43, se sometieron a hidrólisis a pH 2 y la

fase inferior obtenida después de la partición se pasó en Cloroformo-metanol (1:1) por una columna de ácido silícico igual a la descripta en la Tabla XX. La actividad de DolMP eluidada con este solvente se corrió con el solvente D en una placa de sílica lavada. En el eluido de las bandas de 1 cm se midió la actividad de DolMP (Fig. 21-A) y el PI liberado a la fase acuosa después de tratamiento en ClH 1N en cloroformo-metanol (3:2), 3 horas a 37°C (Fig. 21-B). Este último tratamiento es el mismo con el cual el supuesto DolDP pasa a cromatografiar como DolMP (Fig. 19-B). Se observa que la banda del origen en la Fig. 21-A, tiene actividad de DolMP, igual a lo que ocurre en la Fig. 18-A.

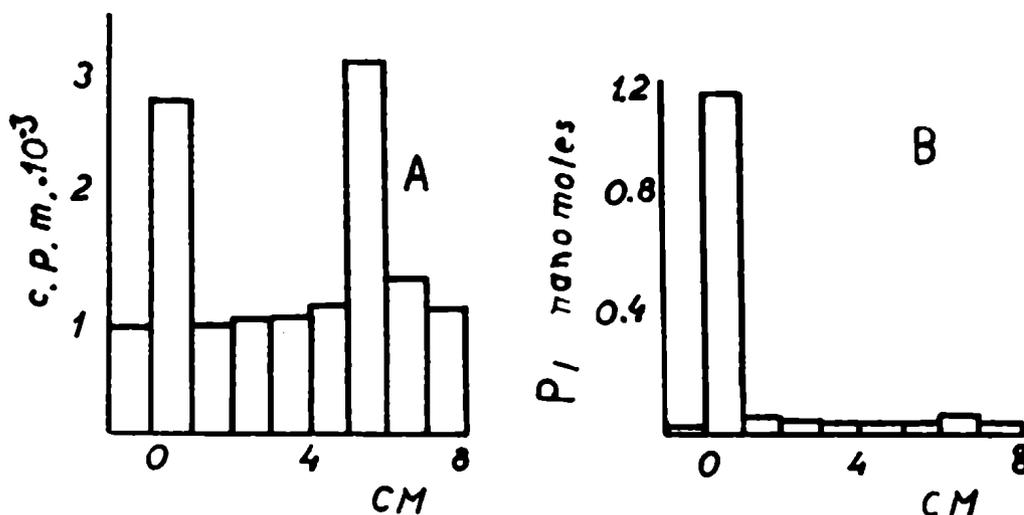


Figura 21. Detección de P lável en el supuesto DolDP

Una alícuota de la combinación de las fracciones 41-42-43 de la columna analítica de DEAE-celulosa (Fig. 6) se sometió a hidrólisis a pH 2 y se pasó en cloroformo-metanol (1:1) por una columna de ácido silícico como la que se describe en la Tabla XX. Al eluido con dicho solvente, después de concentrado se le corrió con el solvente D en una placa de sílica

(Continuación de la leyenda de la Figura 21, Pág. Anterior)
 gel lavada. En el eluido de las bandas de 1 cm se midió en alicuotas apropiadas: A.- La actividad de DolMP por el dosaje enzimático. B.- El Pi liberado a la fase acuosa, después de un tratamiento con ClH 1N en cloroformo-metanol (3:2), 3 horas a 37°C. El Pi se midió por el método del verde malaquita (ver métodos).

El tratamiento ácido da lugar a la liberación de Pi a la fase acuosa en la misma fracción. Cuando se midió P total en esta fracción se encontró una relación Pt/Pi de 1,91.

Esquema de purificación del GEA crudo.

En el esquema 2 se resumen las diferentes etapas llevadas a cabo para purificar el GEA crudo.

Esquema 2. Purificación del GEA crudo.

1. DEAE-celulosa; eluido con formiato de amonio. Se purifica 52 veces por P total y 7 veces por azúcar ácido lábil. (Tablas VIII y XVII)
2. Acido silícico: lava con cloroformo-metanol (1:1) Eluye con solvente A, se purifica 294 veces por P total y 39 veces por azúcar ácido lábil.
3. Precipitación con n-propanol de una solución n-propanol-agua (65:35). Disolución solvente A. Esta etapa de la purificación se aplicó a la DEAE-celulosa (Fig. 7)
4. TEAE-celulosa (Fig. 5) o DEAE-celulosa (Figs. 6 y 7). Máxima purificación en la Fig. 7, siendo para P total 1258 veces y para azúcar ácido lábil 68 veces.

Discusión

Aislamiento y purificación del GEA.

La purificación total del GEA tal cual no fue posible obtenerla, aún cuando este se llegó a purificar 1258 veces por P total (Tabla VIII). Se intentó continuar su purificación por capa delgada, encontrándose que muy pocos solventes son capaces de hacer migrar al GEA y aquellos con los cuales se consigue hacerlo no dieron una separación neta de los compuestos. Sin embargo fue posible fraccionar bien en capa delgada los oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave del material. El fraccionamiento de los oligosacáridos en placa delgada tiene una doble ventaja. Primero que es menos probable una contaminación con glucosa, lo cual suele ocurrir si se usa papel para el fraccionamiento. Además sobre la placa se puede revelar con α -naf₁₀tol, que es más sensible para detectar oligosacáridos que el revelado con plata y alcali que se usa sobre el papel.

Fraccionando los oligosacáridos en placas se logró obtener el oligosacárido del GEA puro, pues al correrlo en varios sistemas (Tabla XVI) apareció una sola mancha, la cual coincide con el pico de ra radioactividad del oligosacárido del GEA ^{14}C usado como trazador. Además la cromatografía en papel del oligosacárido reducido con $^3\text{HNaBH}_4$ mostró una coincidencia casi total entre este compuesto y el marcado con glucosa ^{14}C obtenido por síntesis en microsomas de hígado de rata (Fig. 10). Esto último está indicando también que lo que se aísla es GEA y no el aceptor endógeno que se glicosila posteriormente (ver Fig. 24). Aunque si la diferencia entre el aceptor endógeno (EA) y el GEA fuera de una sola glucosa no sería bien evidente en la cromatografía de la Fig. 10. Esto sería suponer que el EA ya tendría incorporadas algunas de sus glucosas, pues como se ve adelante el oligosacárido del GEA tiene 4 glucosas. Además hay evidencias de que en la reacción de formación de GEA a partir del EA entran más de una glucosa (111). Ya una diferencia de ese orden hubiera quedado manifiesta en

la cromatografía de la Fig. 10. Otra posibilidad sería que el EA fuera el oligosacárido que es de tamaño menor inmediato al del GEA en el fraccionamiento en capa delgada; sin embargo el estudio preliminar de su composición en azúcares revela la presencia de galactosa (banda 3, Tabla XIII) y este azúcar no está presente en el GEA (ver adelante).

El hecho de que el DolMP liberado por tratamiento ácido suave y medido por el estímulo en la formación de DolMPGlu, tenga un grado de purificación, expresado por P total, menor que para el GEA mismo estaría indicando dos cosas: primero, que en extracto crudo habían otros compuestos que también liberan DolMP por hidrólisis ácida suave, los cuales se fueron eliminando en la purificación. En segundo lugar, que en la etapa final habrían otros compuestos que dan lugar a la liberación de DolMP. Estos corresponderían justamente a los oligosacáridos que acompañan al oligosacárido del GEA cuando se hace la cromatografía en capa delgada (Tablas XIII-XIV). La presencia de estos oligosacáridos hace que la relación molar azúcares/Plábil sea de 9 (Tablas IX y XVII) en la columna de DEAE-celulosa analítica hecha después de precipitación. Acá es la etapa de purificación en la cual la relación Pt/Pl es de casi 2 (Tabla X). Esto hace suponer que todo el P lábil presente corresponde al DolDP. Siendo esto así debería existir una relación azúcares/Plábil de 18, si en la fracción hubiera únicamente GEA. (asumiendo que el oligosacárido del GEA tiene 18 azúcares, ver adelante: estructura del oligosacárido). El hecho de que dicha relación sea menor, de 18, como se vio antes, está también indicando la presencia de oligosacáridos de menor tamaño que el del GEA que hace que la relación azúcares/Plábil disminuya. Estos oligosacáridos serían justamente los que se revelan en la capa delgada (Tablas XIII-XV), observándose que la mayoría y los más abundantes son de menor tamaño que el del GEA. El perfil de estos oligosacáridos se reprodujo en todas las preparaciones.

Estructura del oligosacárido del GEA.

Una vez que fue posible obtener el oligosacárido del GEA puro, se procedió a determinar su composición en azúcares. En un análisis preliminar semicuantitativo por cromatografía en papel se encontraron manosas, glucosas, y hexosaminas (Tabla XIII). Uno de los aspectos de mayor incertidumbre en este análisis fue que algunos de los controles revelaron glucosa. El análisis cuantitativo hecho por cromatografía gaseosa reveló la presencia de los mismos azúcares que los encontrados por cromatografía en papel. En este caso los controles no revelaron la presencia de glucosa, lo cual se debería a que la metanolisis se hizo en ampollas de vidrio cuidadosamente lavadas en lugar de los tubos con tapa de rosca usados para hacer la hidrólisis cuando se hizo cromatografía en papel.

De los datos suministrados por la cromatografía gaseosa (Tabla XVIII) se llegó a establecer que los azúcares presentes en el oligosacárido del GEA están en la relación mínima siguiente: N-acetilglucosamina-glucosa-manosa (1:2:6). Anteriormente se había encontrado que el oligosacárido obtenido por metanolisis del GEA sometido a tratamiento alcalino enérgico, se comporta en electroforesis como un compuesto con doble carga positiva. Estas cargas desaparecen por N-acetilación, de lo cual se concluye que el oligosacárido del GEA contiene dos N-acetilhexosaminas (111). Con los resultados de la cromatografía gaseosa se demuestra que estas dos N-acetilhexosaminas corresponden a N-acetilglucosaminas. Del producto de hidrólisis ácida del oligosacárido del GEA reducido con $^3\text{HNaBH}_4$ se aisló glucosaminitol ^3H , que N-acetilado corre como N-acetilglucosaminitol (Fig. 11-13). Esto estaría indicando que una de las dos N-acetilglucosaminas está en el extremo reductor. Lo anterior se ha encontrado en otros oligosacáridos unidos a dolicol. Hsu et al. (80) obtiene un DolDP-oligosacárido manosilado (manosa ^{14}C) de 7 azúcares incubando DolMPMan ^{14}C con microsomas de mieloma. Reduciendo el oligosacárido con $^3\text{HNaBH}_4$ y sometiéndolo luego a hidrólisis ácida total, detectaron la formación de glucosaminitol ^3H . Lucas et. al. (81) también redujeron con $^3\text{HNaBH}_4$ un oligosacárido de 7 a 9 unidades de

azúcar, obtenido de la hidrólisis ácida suave de un DolDP-oligosacárido manosilado del oviducto de gallina. La hidrólisis total del oligosacárido reducido ^3H , liberó glucosaminitol ^3H .

La velocidad de hidrólisis ácida del metil-N-acetilglucosaminido es aproximadamente 1000 veces más lenta si previamente se deacetila. Esto se ve en la figura 22, donde aparecen las posibilidades de la hidrólisis del metil-N-acetil glucosaminido. Al seguir la vía de previa desacetilación se obtiene que k_4 es aproximadamente 1000 veces más lenta que k_1 (143).

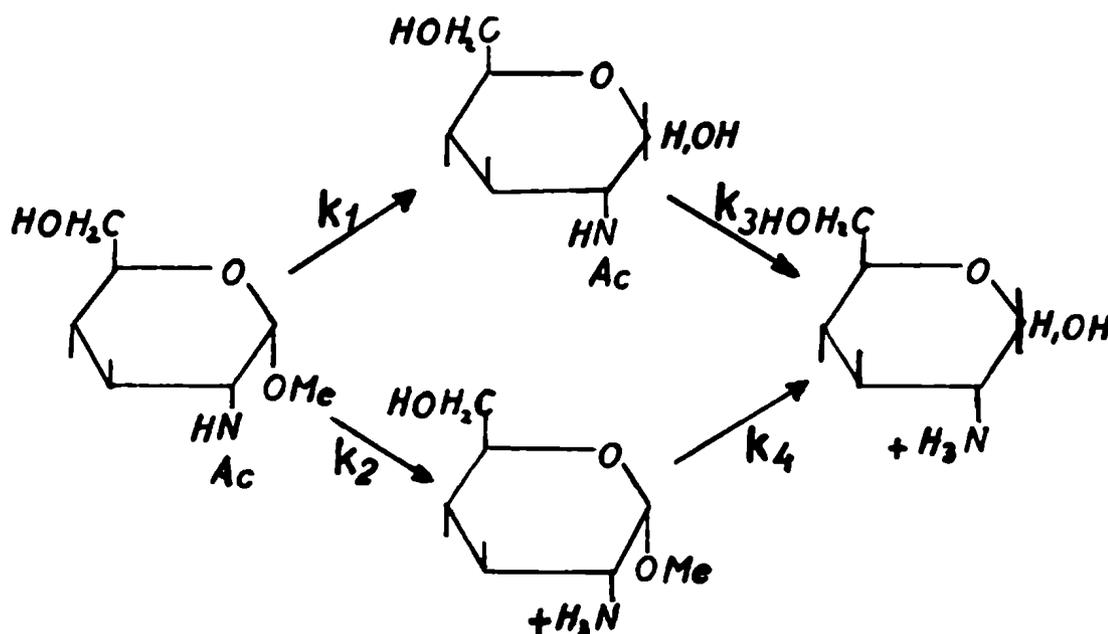


Figura 22. Mecanismo de hidrólisis ácida de la α -metil-N-acetilglucosamina (metil 2-acetamida-2-deoxi- α -D-glucopiranosido) (143)

Si en el oligosacárido del GEA existe un tipo de unión semejante al anterior, la desacetilación previa debería volverla muy resistente al ácido. Con esta idea, el oligosacárido del GEA reducido ^3H se desacetiló previamente por tratamiento alcalino idéntico al que lo convierte en un compuesto con doble carga positiva. Después se le sometió a hidrólisis ácida, encontrándose que en vez de glucosaminitol apareció un compuesto con una movilidad en cromatografía (Fig. 14) y electroforesis en papel (Fig. 16) prácticamente igual a la de N-acetilquitobiosa reducida con NaBH_4 y sometida a desacetilación por el mismo tratamiento alcalino (ver Fig. 15). Lo anterior sugiere que las dos N-acetilglucosaminas del oligosacárido del GEA se encuentran hacia el extremo reductor, formando un residuo de di N-acetilquitobiosa. Esto explica porqué cuando el oligosacárido del GEA desacetilado se trata con ácido nitroso no sufre una disminución importante en su peso molecular (144). Este tratamiento rompe la unión hexosaminil (145), si una de las N-acetilglucosaminas ocupara una posición interna en el oligosacárido, dicho tratamiento disminuiría su tamaño.

Los DolDP-oligosacáridos manosilados formados en microsomas de hígado sometidos a metanolisis ácida dan lugar a oligosacáridos que desacetilados por tratamiento alcalino se comportan como compuestos con doble carga positiva (79). Esto sugiere que también tienen dos hexosaminas en su molécula. Tratando con manosidasas el oligosacárido manosilado que se aísla de una preparación membranosa de oviducto de gallina, se determinó que en su extremo reductor se encuentra un residuo de di-N-acetilquitobiosa (81,82). Por otro lado es posible obtener enzimáticamente DolDP-oligosacáridos por la sucesiva incorporación de manosas al DolDP-di-N-acetilquitobiosa (83,84). Anteriormente vimos que muchas glicoproteínas tienen unida su cadena de azúcares a un residuo de asparagina a través de una di-N-acetilquitobiosa (Tabla II). Esto sugiere que si el oligosacárido del GEA tiene un residuo de di-N-acetilquitobiosa hacia su extremo reductor, la unión que se establece al ser transferido a proteína sería del tipo asparagina. Efectivamente se ha

demostrado que la unión entre el oligosacárido del GEA y la proteína a la cual es transferido tiene un comportamiento al tratamiento alcalino que sugiere ese tipo de unión (85).

Partiendo de que hay dos N-acetilglucosaminas en el oligosacárido del GEA, la composición global del oligosacárido del GEA sería el doble de la fórmula mínima presentada en la Tabla XVIII; o sea $(\text{Glu})_4 (\text{Man})_{12} (\text{NAcGlu})_2$. Esto no estaría completamente de acuerdo con el peso molecular de 3550 encontrado para el oligosacárido por filtración en gel, valor que es compatible con un oligosacárido de 20 unidades(76). Esta diferencia sin embargo podría estar dentro del error experimental. En cromatografía en papel, el oligosacárido del GEA corre como un malto oligosacárido de 16-18 unidades. Sin embargo esta medida se hace comparando oligosacáridos de estructura diferente (77). Cuando se determinó el peso molecular del GEA y el DolMPGlu en forma de complejos de inclusión con deoxicolato, se encontró para el primero un valor de 14300 y de 11300 para el segundo (76). El número de moléculas incluidas depende de la longitud del lípido, si ambos tienen DolMP y el GEA un P más, resulta que el peso molecular del oligosacárido es de 3000, el cual está cercano a la fórmula propuesta. El número de azúcares presentes en la molécula del oligosacárido también puede ser determinado en base a la relación de azúcares/grupo reductor. Como se vió en la Tabla XIX esta relación está entre 18 y 19 azúcares. Este método no es del todo concluyente pues no se hizo con el control adecuado para determinar si la reducción del oligosacárido fue completa. Sin embargo es muy semejante a los valores obtenidos por los otros métodos. En la TablaXXII se resumen los datos para el peso molecular del oligosacárido del GEA por los diferentes métodos que se han mencionado. Todo indica que la fórmula propuesta para el oligosacárido del GEA en base a la cromatografía de fase gaseosa y partiendo de que tiene dos N-acetilglucosaminas, da un peso molecular que está en el orden de los valores presentados endicha tabla.

Este es el primer caso en que se ha logrado determinar la composición del oligosacárido en un DolDP derivado extraído de untejido. Hsu

Tabla XXII. Peso molecular del oligosacárido del GEA obtenido por diferentes métodos.

Métodos	No. de Unidades	Peso molecular aproximado
Sephadex G-50 (76)	20	3550
Sephadex G-150 Inclusión DOC (76)	18	3000
Cromatografía en papel, solvente H(77)	16-18	2800
Azúcares/grupo reductor (a)	18-19	3000
Cromatografía gaseosa (b)	18	3000

(a) Corresponde al valor encontrado en la relación azúcares/grupo reductor, en base al ^3H incorporado en el oligosacárido de GEA reducido con $^3\text{HNaBH}_4$ (ver Tabla XIX).

(b) Corresponde a la fórmula del oligosacárido del GEA deducida de los datos obtenidos por cromatografía gaseosa (Tabla XVIII) y asumiendo que tiene dos N-acetilglucosaminas. (ver texto).

et al. (80) determinaron la composición de azúcares de un oligosacárido manosilado obtenido in vitro de células de mieloma. Lo hicieron reduciendo con $^3\text{HNaBH}_4$ los productos de hidrólisis ácida total del oligosacárido y deduciendo la relación manitol ^3H a glucosaminitol ^3H , concluyen que la fórmula del oligosacárido en mención es $(\text{Man})_5 (\text{NAcGlu})_2$.

Se ha encontrado la formación, por microsomas de hígado, de Dol-DP-oligosacáridos manosilados con una longitud que va de 5 a 16 unidades(79). Un DolDPoligosacárido de oviducto estaría formado por manosas y un residuo de di-N-acetilquitobiosa(81,82). El GEA sería semejante a estos compuestos en cuanto a tener un residuo de di-N-acetilquitobiosa y manosas.

La diferencia la establece el contenido adicional de glucosas.

Como antes se mencionó, el GEA, al incubarse con microsomas, es capaz de transferir el oligosacárido a una proteína endógena. Glicoproteínas que lleven unido un residuo de di-N-acetilquitobiosa sustituido con manosa es frecuente encontrar (Tabla II). Lo que es raro encontrar son glicoproteínas que tengan glucosa en su cadena. En la literatura se encuentran algunos casos en que dicho azúcar está unido a proteínas que no son colágeno o membrana basal.

Rhakrishnamuthy (146) informó la presencia de glucosa en una glicoproteína extraída de la íntima de aorta bovina. En trabajos posteriores (147, 148, 149) confirmó tal hallazgo. En la Tabla XXIII se da la composición global de azúcares de una glicoproteína extraída de la íntima de aorta porcina (150). Se demostró que dicha glicoproteína no contiene hidroxiprolina, ni hidroxilisina, lo cual elimina la posibilidad de que la glucosa encontrada provenga de colágeno.

Además de la proteasa de hongo que aparece en la Tabla XXIII, en otras enzimas de hongo como la glicomilasa A y B se determinó la presencia de glucosa, acompañada de galactosa y manosa (152). Uno de los casos en que más cuidados se han tomado para descartar la contaminación por glucosa, es en la determinación de β -glucoronidasa del prepucio de las ratas (Tabla XXIII). Se encontró que hay mayor cantidad de glucosa en la forma C (153). Pospisilova et al. (156) aislaron de linfocitos un receptor para la concanavalina A, el cual es una glicoproteína con un contenido de 10,4% en azúcares. Al hacer el análisis de los azúcares de un glicopéptido obtenido por tratamiento con pronasa encontraron la composición de azúcares que se muestra en la Tabla XXIII.

Droege et al. (159) analizaron la composición en azúcares del material precipitable con TCA, obtenido después de tratar con tripsina linfocitos de pollo de varias fuentes. Encontraron manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilneuramínico, fucosa, galactosa y glucosa. La glucosa presentó valores distintos según el origen de los linfocitos, siendo el

Tabla XXIII. Algunas glicoproteínas en las cuales se ha detectado glucosa

Glicoproteína	Sial	Fu	Hexosa- minas(d)	NacGal	NacGlu	Glu	Man	Gal	Union (e)
Proteasa de hongo(151)(a)	-	-	-	-	2	2	7	1	AspN
β -Glucuronidasa(AyB) de rata(153) (b)	-	0,8	7	-	-	0,6	10	0,6	AspN
β -Glucuronidasa(C)de rata(153) (b)	-	2	7-8	-	-	5	13	4	AspN
Antígeno I del eritrocito(155) (b)	2,65	2,00	-	0,93	12,5	3,22	2,2	15,3	AspN
Receptor Con-A linfocitos(156) (a)	1	1	2	-	-	1	3	2	-
Antígeno HL A2(154)(a,c)	2,9	0,8	-	1,5	6,9	1,5	3,1	6	-
Glicoproteína útero de cerdo(157) (b)	-	2	-	-	-	4	5	4	-
Glic. de la aorta porcina(150) (b)	1	1	4	-	-	3	2	3	AspN

(a) Corresponde al análisis del glicopeptido obtenido por proteólisis

(b) Es el análisis de la glicoproteína purificada. En a y b se dan relaciones molares.

(c) Valores expresados en relación Gal=6

(d) Cuando no se determinó si se trata de NacGal o de NacGlu.

(e) Se refiere al aminoácido al cual se une la cadena de azúcares. En los casos que no se determinó: - .

contenido mayor en los provenientes de sangre, menor en los de timo e intermedio en los de bursa y bazo que presentaron iguales valores entre sí. La fucosa y el ácido N-acetilneuraminico también presentaron diferencias en cantidad según los distintos tipos. Kornfeld (159) detectaron glucosa en membranas de linfocitos, pero creen que pudiera tratarse de una contaminación. Droege et al. (158) hicieron el mismo tratamiento descrito anteriormente para los linfocitos, con eritrocitos y encontraron la presencia de glucosa también. Como se ve en la Tabla XXIII el antígeno I del eritrocito tiene glucosa. La glicoforina, una glicoproteína aislada del glóbulo rojo tiene glucosa (160). En dos glicoproteínas menores, aisladas también de la membrana del glóbulo rojo, también se encontró glucosa. Se cree que no sería contaminación pues no se detectó glucosa en una tercer glicoproteína aislada simultáneamente con las anteriores (161). De la membrana del eritrocito se aisló un glicopéptido de bajo peso molecular, que tiene tres glucosas unidas a un residuo de cistina. Este sería un nuevo tipo de unión glicopeptídica (162).

En algunos glicopéptidos obtenidos por proteólisis de microsomas de hígado de rata se ha encontrado glucosa, teniendo los autores la impresión de que se trata de una contaminación (163,164). Phillips et al. (165) encontraron glucosa en las membranas de los microsomas de hígado de rata, encontrando diferencias cuantitativas con el tratamiento con fenobarbital de la rata y en el hepatoma de Morris. Además de la glucosa hubieron variaciones en otros azúcares. Estos autores en el mismo trabajo encuentran glucosa en la membrana nuclear, mientras que a diferencia de los microsomas sólo detectan trazas de galactosa. En las membranas microsomales de intestino de rata se detectó glucosa además de manosa, galactosa, fucosa, glucosamina, ácido sialico y galactosamina (166).

Bossman y Martin (167) encontraron que mitocondrias aisladas son capaces de transferir glucosa del UDPGlu* a proteína endógena. Posteriormente los mismos autores (168) detectaron la presencia de glucosa al analizar el contenido en azúcares neutros de una preparación mitocondrial.

Hallazgo semejante fue hecho por Itoh et al. (169), si bien al analizar los glicopéptidos obtenidos por proteólisis, la glucosa apareció en menor cantidad, que la encontrada en el análisis global de las mitocondrias. De la orina humana normal se ha aislado un glicopéptido que tiene la siguiente estructura: 3-O- β -D-glucopiranosil- α -L-Fucosa-L-treonina (170).

De lo anterior se concluye que, además del colágeno y la membrana basal, hay otras glicoproteínas que tendrían glucosa en sus oligosacáridos. Hasta ahora solamente hemos encontrado en la literatura un caso (170) en el cual se determinó la secuencia y el tipo de unión en que se encuentra la glucosa en estas glicoproteínas. Faltaría este estudio para el resto en las cuales se detectó glucosa.

En tejidos de mamíferos, la mayoría de las glicoproteínas en las cuales se ha encontrado glucosa, no son solubles sino formarían parte de membranas celulares. La glicoproteína a la cual el GEA transfiere su oligosacárido sería también de membranas por sus características de solubilidad (85).

La molécula lipídica del GEA .

Hay evidencias de que la parte lipídica de la molécula del GEA sería dolicol. Cuando se midió el peso molecular por filtración en gel de los compuestos de inclusión formados con deoxicolato por el DolMP-Glu y el GEA, se encontró un valor de 11300 para el primero y 14300 para el segundo. La diferencia correspondía aproximadamente a la existente entre los restos hidrófilicos, concluyéndose que en ambas moléculas el resto lipídico es dolicol (76).

Como se mencionó anteriormente (ver introducción) al correr GEA en columna de DEAE-celulosa o en capa delgada, se encontró una coincidencia entre la radioactividad del GEA radioactivo y el DolMP liberado por tratamiento ácido suave. Este hecho se reprodujo en las columnas de las figuras 5,6,7. El ensayo enzimático del DolMP en las fracciones, sin

previo tratamiento ácido, no detectó ninguna actividad. Esto estaría indicando que en las condiciones en las cuales se mide enzimáticamente al DolMP, no habría una actividad enzimática que hidrolice DolDP-oligosacáridos, con la liberación de DolMP. Si existiera dicha actividad se mediría DolMP sin previo tratamiento ácido. Hsu et al. (60) encontraron que incubando DolDP-oligosacárido manosilado con microsomas de mieloma aparece un producto acuoso soluble que corresponde al oligosacárido-P. Esto sugería la presencia de una enzima que hidroliza al DolDP-oligosacárido.

Para eluir el GEA de una columna de ácido silícico se necesita una mezcla de cloroformo, metanol y agua (solvente A). Con cloroformo-metanol (1:1) no se eluye, pues no es soluble. El DolMP si es posible eluirlo con mezclas de cloroformo-metanol. Por lo tanto la actividad de DolMP liberada por hidrólisis ácida suave del GEA debería eluirse del silícico con una mezcla de cloroformo-metanol. En la Tabla XX se ve que efectivamente así sucede.

El dolicol revela en capa delgada con un reactivo de anisaldehído da un color verde (128). Cuando se sometió a ese procedimiento la fase orgánica obtenida después de la hidrólisis ácida suave del GEA apareció una mancha verde que corrió con un Rf semejante al del DolMP (ver Fig. 18-A). Pero también apareció otra mancha con menor movilidad, que sometida a un tratamiento ácido más enérgico dió lugar a la formación de la substancia que corre como DolMP (Fig. 18-C).

Como el revelado demanda mucho material, se prefirió correr en capa delgada y ubicar el DolMP por ensayo enzimático. Este método consiste, como se mencionó anteriormente, en medir la capacidad aceptora de glucosa del DolMP cuando se le incuba con microsomas y UDPGlu*(60). Las placas se dividieron en bandas y el DolMP se midió en los eluidos de dichas bandas. Este método es 5 a 10 veces más sensible que el revelado con anisaldehído. Esto se determinó comparando la mínima cantidad necesaria para poder ver el DolMP con el anisaldehído y para medirlo

en el ensayo de formación de DolMPGlu. Al correr la fase orgánica del GEA tratado con ácido suave, se encontró que además de un compuesto que corre como el DolMP apareció otro de menor movilidad (Fig. 18). El último compuesto al ser tratado con ácido en forma más enérgica pasa a tener la movilidad del DolMP (Fig. 19-B). Lo anterior sugiere que este compuesto correspondería a DolDP. Si bien habían algunas pequeñas diferencias entre los controles de DolMP natural o sintético y el obtenido del GEA, cuando se corrió el DolMPGlu formado con los distintos aceptores dio en diferentes solventes el mismo Rf (Tabla XXI). Con uno de los solventes empleados (solvente B) ha sido posible separar derivados del dolicol de derivados del ficaprenol (68, 103). Posiblemente las diferencias observadas con los aceptores, se deba a la diferente cantidad de lípido que se sembró en cada caso (ver resultados).

El hecho que tanto el probable DolDP como el DolMP dieran lugar a la formación de DolMPGlu, sugería que en la preparación microsomal estaba presente una fosfatasa capaz de separar el fosfato β del DolDP. Esta interpretación se vio reforzada al encontrar que el DolDP, incubado con la enzima y cromatografiado de nuevo, pasa a tener una movilidad semejante a la del DolMP (Fig. 20). Ya anteriormente se había indicado que la hidrólisis ácida suave del GEA da lugar a la liberación de una mezcla de DolMP y DolDP, pues se vio que un tratamiento ácido más enérgico aumentaba el DolMP presente (113). Este hallazgo podría explicarse en base a que no todas las preparaciones enzimáticas tienen la misma actividad de fosfatasa y que por lo tanto parte del DolDP sea medido únicamente si la mezcla se trata previamente con ácido en condiciones más enérgicas.

En bacterias se ha descrito una fosfatasa unida a membrana capaz de convertir undecaprenol-DP en undecaprenol-MP (46). La existencia de esta fosfatasa del DolDP permitiría que el mismo sea reutilizado en el ciclo de síntesis del DolDP-oligosacáridos (Fig. 24), semejante a lo que ocurre en bacterias (Fig. 3).

La existencia de una unión difosfato en el GEA, la indicaba su comportamiento en la columna de DEAE-celulosa, pues se eluye en la zona de compuestos conocidos que tienen una unión difosfato (76). Esto queda reforzado con la detección de DolDP después de la hidrólisis ácida suave del GEA. Además fue posible medir P lábil en las fracciones donde aparece el GEA, siguiendo el perfil de DolMP liberado por tratamiento ácido (Fig. 7). Si bien no fue posible obtener una relación P_{total}/P lábil 2:1 como era de esperarse, debido a que aún queda material contaminante que tiene P total (ver Tabla X). En el DolDP si fue posible obtener dicha relación, después de purificarlo en columna de ácido silícico y correr en capa delgada (Fig. 21).

Con todos los datos citados podemos afirmar que la estructura del GEA corresponde a la que aparece en la Fig. 23, en la cual el dolicol va unido a través de un enlace difosfato, a un residuo de di-N-acetilquitobiosa, al cual se unen a su vez las cadenas de manosas y glucosas. Quedando por determinar en qué secuencias van unidas. La primer manosa sí es muy probable que sea una unión B, pues se encontró que esa unión se establece cuando se forma el DolDP-trisacárido (83). Además esta unión se ha encontrado en DolDP-oligosacáridos en los cuales se ha hecho la secuencia de azúcares (82).

La vía de síntesis del GEA descrita en la Fig. 4, se puede esquematizar con los datos actuales según la Fig. 24. Al DolDP-di-N-acetilquitobiosa se le incorporarían manosa tal como se ha demostrado en otros DolDP-oligosacáridos formados por di-N-acetilquitobiosa y manosas (81,83). Finalmente recibirá las glucosas. El hecho de que no se encuentre variedad de tamaños en el GEA indica que posiblemente todas las glucosas se agregan sucesivamente, en forma tan coordinada que nos es posible aislar intermediarios. Esto se ha visto que sucede con el DolDP-(NacGlu)₂ (Man)₁ que pasa a formar un DolDP-oligosacárido de 6 a 9 unidades, sin que sea posible aislar intermediarios (83). Las glucosas podrían agregarse a partir de un derivado de dolicol, portador de una unidad repetitiva, como sucede en la formación de polisacáridos bacterianos.

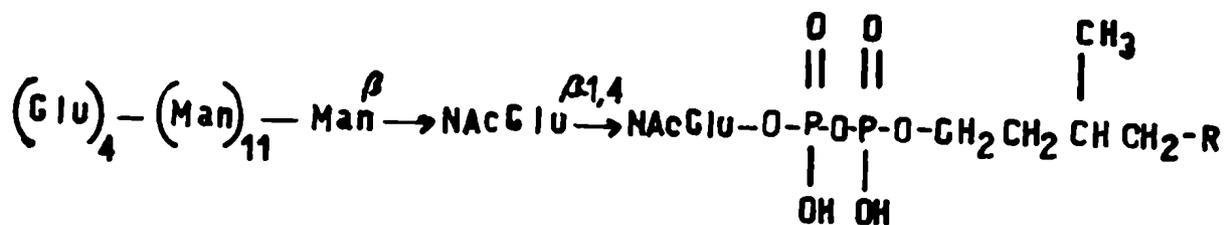


Figura 23. Estructura propuesta para el GEA.

R= 17-21 isoprenos

Sin embargo hasta ahora en las incubaciones con microsomas, solamente se han encontrado dos derivados de dolicol que contengan glucosa: el DolMP-Glu y el GEA mismo. Para completar la demostración de la secuencia de reacciones de la Fig. 24, habría que encontrar un DolDP-(NacGlu)₂(Man)₁₂ capaz de recibir glucosas para formar el GEA.

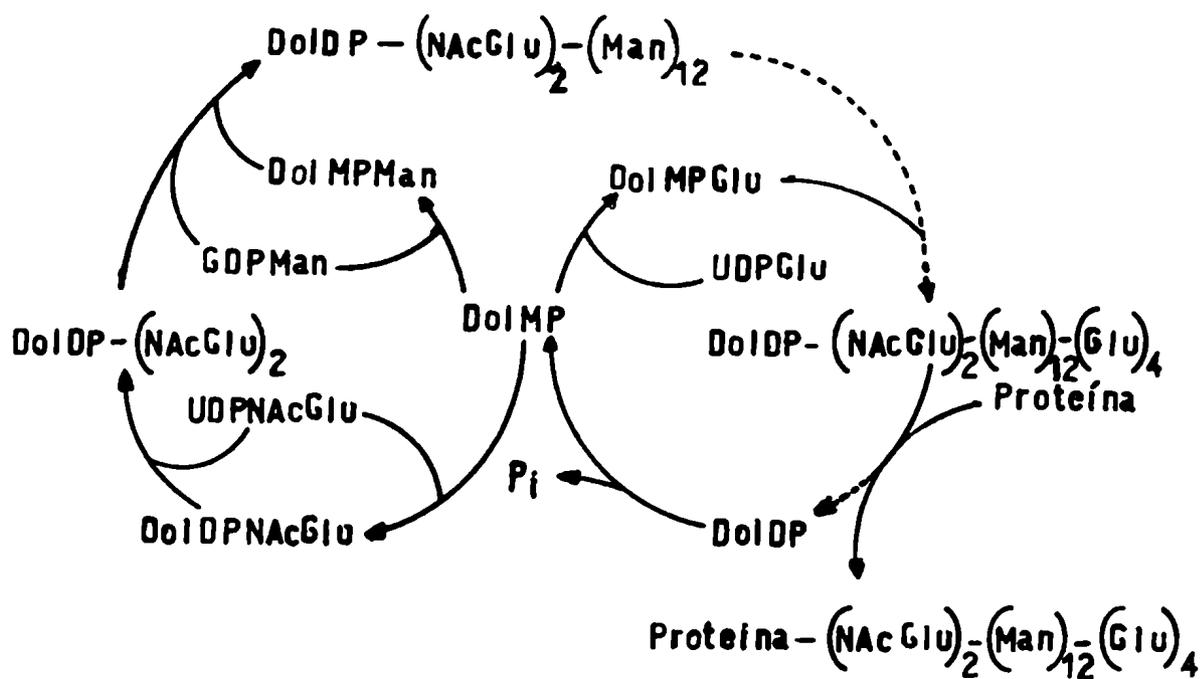


Figura 24. Posible mecanismo de síntesis del GEA y su transferencia a proteína.

$(\text{NAcGlu})_2$ = di-N-acetilquitobiosa

CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones se obtienen de los datos experimentales presentados en esta tesis:

- 1.- El aceptor endógeno glucosilado (GEA) que se había detectado al incubar dolicol monofosfato glucosa* con microsomas de hígado, fue posible obtenerlo en cantidades medibles por métodos químicos usuales.
- 2.- El GEA como tal no fue posible obtenerlo en forma pura. A partir de una cierta etapa se purificaron por separado las porciones hidrofílica e hidrofóbica de este compuesto. El oligosacárido liberado del GEA por hidrólisis ácida suave se llegó a tener como compuesto puro.
- 3.- El análisis de los azúcares por cromatografía en papel del oligosacárido del GEA, reveló la presencia de manosa, glucosa y hexosaminas. Por cromatografía en fase gaseosa se determinó que los azúcares que forman al oligosacárido del GEA están en la relación molecular mínima siguiente: manosa- glucosa-N-acetilglucosamina(6:2:1).
- 4.- Anteriormente se observó que el oligosacárido del GEA desacetilado se comporta como un compuesto con doble carga positiva. Estas cargas desaparecen por N-acetilación. Lo anterior permite inferir que el oligosacárido del GEA tiene dos acetilhexosaminas. En base a que tiene dos N-acetilglucosaminas y a la fórmula mínima deducimos que la composición de azúcares del oligosacárido del GEA es la siguiente: $(\text{Man})_{12} (\text{Glu})_4 (\text{NAcGlu})_2$, lo cual da un peso molecular de 3000. Este peso molecular está dentro del orden de valores que se han encontrado por otros métodos (ver Tabla XXII). Esta es la primera vez que se determina la composición en azúcares de un oligosacárido, no radioactivo, extraído de tejidos, que se encuentra unido a dolicol.

- 5.- Fue posible reducir con $^3\text{HNaBH}_4$ el oligosacárido del GEA. Por hidrólisis ácida total del oligosacárido así reducido se obtuvo glucosaminitol ^3H . Se demostró en esta forma que una de las N-acetilglucosaminas del oligosacárido del GEA se encuentra en su extremo reductor.
- 6.- El oligosacárido del GEA reducido ^3H y desacetilado sometido a hidrólisis ácida da lugar a la formación de un compuesto tritiado que tiene características cromatográficas y electroforéticas semejantes al quitobitol (di-N-acetilquitobiosa reducida y desacetilada). Esto indica que las dos N-acetilglucosaminas del oligosacárido del GEA se encuentran hacia su extremo reductor formando un residuo de di-N-acetilquitobiosa (N, N' diacetilquitobiosa).
- 7.- La molécula lipídica obtenida por hidrólisis ácida suave del GEA se analizó en capa delgada. Los productos se detectaron por su capacidad de incrementar la formación de dolicol monofosfato glucosa* al ser incubados con UDPGlu* y microsomas de hígado de rata. De esta manera se observaron dos compuestos, uno que migra como el dolicol monofosfato y otro de menor movilidad. Este último al ser tratado con ácido en condiciones más enérgicas, pasa a tener la movilidad del dolicol monofosfato. Esto hace suponer que el compuesto de menor movilidad es dolicol difosfato.
- 8.- El supuesto dolicol difosfato al ser incubado con microsomas y UDPGlu* da lugar a la formación de dolicol monofosfato glucosa*. Esto sugiere la presencia en los microsomas de una fosfatasa que hidroliza el fosfato β del dolicol difosfato produciendo dolicol monofosfato, que luego acepta glucosa para formar dolicol monofosfato glucosa. Para confirmar lo anterior el dolicol difosfato se incubó previamente con los microsomas y se corrió en una capa delgada, encontrándose que pasa a tener la movilidad del dolicol monofosfato.

Esta fosfatasa de dolicol difosfato serviría para que pueda ser reutilizado el dolicol difosfato que se libera cuando se transfiere a proteína el oligosacárido proveniente de un dolicol difosfato oligosacárido. Cuando el dolicol difosfato pasa a dolicol monofosfato, está en capacidad de aceptar azúcares y entra de nuevo al ciclo (ver Fig. 24).

- 9.- Se midió fósforo lábil en el GEA. La relación fósforo: total/fósforo lábil no llegó a ser 2, como es lo esperado teóricamente, debido a la persistencia de contaminantes que contienen fósforo orgánico. Sin embargo en el dolicol difosfato purificado sí se encontró esta relación. Esto confirmaría los datos anteriores de que el GEA tiene una unión difosfato entre el dolicol y el oligosacárido.
- 10.- La fórmula propuesta del GEA aparece en la Fig. 23 y el esquema de su biosíntesis en la Fig. 24.

Bibliografía

- 1.- Spiro, R.G. (1973) *Advan. Prot. Chem.*, 27, 349.
- 2.- Spiro, R.G. (1972) *En Methods in Enzymology*, ed. V. Ginsburg (Academic Press, New York) p. 3.
- 3.- Jackson, R. L. y Hirs, C. H.W.(1970) *J.Biol.Chem.*, 245, 624.
- 4.- Hunt, L. T. y Dayhoff, M.D. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 46, 457.
- 5.- Wiseman, R.L., Fothergill, J.E. y Fothergill, L.A. (1972) *Biochem. J.*, 127, 775.
- 6.- Hughes, R.C. (1973) *Progress Biophys & Molec. Biol.*, 26, 189.
- 7.- Hagopian, A., Westall, Witeheas, J.S. y Eylar, E.H. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 2519.
- 8.- Spiro, M.J. y Spiro, R.G. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 4910.
- 9.- Spiro, R.G. y Bhojrao, V.D. (1971) *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 30, 1223.
- 10.- Marshall, R.D., (1972) *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 673.
- 11.- Baenziger, S., Konfeld, S. y Kochwa S. (1974) *J.Biol. Chem.*, 249 1889.
- 12.- Faillard, H. y Schauer, R. (1972) *En Glycoproteins*, ed. A. Gottschalk (Elsevier, Amsterdam) Vol B, p. 1246.
- 13.- Tarentino, A.L., Plummer, T.H., y Maley, F. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 818.
- 14.- Yamame, K. y Nathenson, S. G. (1970) *Biochemistry*, 9, 4743.
- 15.- Van der Hamer, C.J.A., Morel, A.G., Scheinberg, I.H., Hickman, J.J. y Ashwell, G. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 4397.
- 16.- Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I.H., Hickman, J. y Ashwell, G. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 1461.
- 17.- Hudgin, R.L., Pricer, W.E., Ashwell, G., Stockert, R.J. y Morel, A.G., (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 5536.

- 18.- Melchers, F., (1972) *Biochemistry*, 11, 2204.
- 19.- Roseman, S. (1970) *Chem. Phys. Lipids*, 5, 270.
- 20.- Cioli, D. y Lennox, E.S. (1973) *Biochemistry*, 12, 3211.
- 21.- Molnar, J., Robinson, G.B. y Winzler, R.J. (1965) *J. Biol. Chem.*, 240, 1882.
- 22.- Melchers, F. y Knopf, P.M. (1967) *C.S.H. Symp. Quant. Biol.*, 32, 255.
- 23.- Parkhouse, R.M.E. y Melchers, F. (1971) *Biochem. J.*, 125, 235.
- 24.- Molnar, J. y Sy, D. (1967) *Biochemistry*, 6, 1941.
- 25.- Robinson, G.B. (1969) *Biochem.J.*, 115, 1077.
- 26.- Lawford, C.R. y Schachter, H. (1966) *J. Biol. Chem*, 241, 5408
- 27.- Redman, C.M., y Cherian, M.G. (1972), *J. Cell. Biol.* 52, 231.
- 28.- Molnar, J., (1975) *Mol. Cel. Biochem.*, 6, 3.
- 29.- Sinohara, H. y Sky-Peck, H.H.(1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 101, 90.
- 30.- Schachter, H., Jabbal, I., Hudgin, R.L., Pinteric, L., McGuirre, E.J. y Roseman, S. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 1090.
- 31.- Melchers, F. (1971) *Biochemistry*, 10, 653.
- 32.- Jabbal, I. y Schachter, H. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 5154.
- 33.- Weinstock, A. y Leblond, C.P. (1971) *J. Cell Biol.*, 51, 26.
- 34.- Bennet, G., Leblond, C.P. y Haddad, A. (1974) *J. Cell Biol.*, 60, 258.
- 35.- Bergeron, J.J. M., Ehrenreich, J.H., Siekewitz, P. y Palade, G.E. (1973) *J. Cell Biol.*, 59, 73.
- 36.- Jamieson, J.D., y Palade, G.E. (1971) *J. Cell Biol.*, 50, 135.
- 37.- Glaumann, H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 224, 206.
- 38.- Vitetta, E.S. y Uhr, J.W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 253.
- 39.- Hagopian, A. y Eylar, E.H. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 447.
- 40.- Khalkhali, Z. y Marshall, R.D. (1975) *Biochem.J.* 146, 299.

- 41.- Robbins, P.W., Wright, A. y Dankert, M. (1966) J. Gen. Physiol., 49, 331.
- 42.- Robbins, P.W., Bray, O., Dankert, M. y Wright, A. (1967) Science, 158, 1536.
- 43.- Robbins, P.W. y Uchida, T. (1965) J. Biol. Chem., 240, 375.
- 44.- Dankert, M., Wright, A., Kelley, W.S. y Robbins, P.W. (1966). Arch. Biochem. Biophys., 116, 425.
- 45.- Wright, A., Dankert, M., y Robbins, P.W. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 54, 235.
- 46.- Osborn, M.J. (1969) Ann. Rev. Biochem., 38, 501.
- 47.- Wright, A., Dankert, M. y Fennessey, P. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 57, 1798.
- 48.- Weiner, I.M., Higuchi, T., Rothfield, L., Salmarsch, M., Osborn, M.J. y Horecker, B.L. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci., 54, 228.
- 49.- Osborn, M.J. y Weiner, J.M., (1968) J. Biol. Chem. 243, 2331.
- 50.- Matsushashi, M., Dietrick, C.P. y Strominger, J.L. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 54, 587.
- 51.- Kamiyo, T. y Matsushashi, M. (1969) Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 215.
- 52.- Scher, M., Lennarz, W.J. y Sweley, C.C. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 59, 1313.
- 53.- Scher, M., y Lennarz, W.J. (1969) J. Biol. Chem., 244, 2777.
- 54.- Colvin, J.R. (1959) Nature (London), 183, 1135.
- 55.- Dankert, M., García, R. y Recondo, E. (1972) The Biochemistry of the Glycosidic Linkage, 192 (R. Piras y H.G. Pontis, editores) (New York: Academic Press).
- 56.- García, R., Recondo, E. y Dankert, M. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 93.
- 57.- Troy, F.A., Frerman, F.E. y Heath, E.C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 118.
- 58.- Watkinson, R.J., Hussey, H. y Baddiley, J. (1971) Nature (London), 229, 57.

- 59.- Brooks, D. y Baddeley, J. (1969) *Biochem.J.*, 115, 307.
- 60.- Behrens, N.H. y Leloir, L.F. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 66, 153.
- 61.- Behrens, N.H., Parodi, A. J., Leloir, L.F. y Krisman, C.R. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 375.
- 62.- Richards, J.D., Evans, P.J. y Hemming, F.W. (1971) *Biochem. J.*, 124, 957.
- 63.- Richards, J.D., y Hemming, F.W. (1972) *Biochem. J.* 130, 77
- 64.- Caccam, J.F., Jackson, J.J. y Eylar, E. H. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 35, 505.
- 65.- Zatz, M. y Borondes, S.M. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36, 511.
- 66.- Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1973) *FEBS Lett.*, 31, 332.
- 67.- Evans, P.J. y Hemming, F.W. (1973) *FEBS Lett.* 31, 335.
- 68.- Tkacz, J.S., Herscovics, A., Warren, C.D., y Jeanloz, R.W. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 6372
- 69.- Herscovics, A., Warren, C.D., Jeanloz, R.W., Wedgwood, J.Y. y Strominger, J.L. (1974) *FEBS Lett.*, 45, 312.
- 70.- Adamany, A.M. y Spiro, R.G. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 2842.
- 71.- Waechter, C.J., Lucas, J.J. y Lennarz, W.J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 56, 343.
- 72.- Zatta, P., Zakim, D. y Vessey, D.A. (1975) *Biochem. Biophys. Acta*, 392, 361.
- 73.- Tetas, M., Chao, H. y Molnar, J. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 135
- 74.- Molnar, J., Chao, H. y Ikehara, Y. (1971) *Biochem. Biophys. Acta*, 239, 401.
- 75.- Ghalambor, M.A., Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 56, 407.
- 76.- Behrens, N.H., Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 68, 2857.

- 77.- Leloir, L.F., Parodi, A.J. y Behrens, N.H. (1971) *Revta. Soc. Argent. Biol.*, 47, 108.
- 78.- Leloir, L.F., Staneloni, R.J., Carminatti, H. y Behrens, N.H. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 52, 1285.
- 79.- Behrens, N. H., Carminatti, H., Staneloni, R.J., Leloir, L.F. y Cantarella, A. I., (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 3390.
- 80.- Hsu, A. F., Baynes, J.W., y Heath, E.C. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 2391.
- 81.- Lucas, J.J., Waechter, C.J. y Lennarz, W. J. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 1992.
- 82.- Chen, W.W., Lennarz, W.J., Tarentino, A.L. y Maley F. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 7006.
- 83.- Levy, J.A., Carminatti, H., Cantarella, A.I., Behrens, N.H., Leloir, L.F. y Tábora, E. (1974) 60, 118, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*
- 84.- Wedgwood, J.F., Warren, C.D., Jeanloz, R.W. y Strominger, J.L. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 71, 5022
- 85.- Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. y Carminatti, H. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 3268.
- 86.- Behrens, N.H. (1974) *Poliprenol-Sugars and Glycoprotein Synthesis in Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces. Miami Winter Symposia, Vol. 7 (Academic Press Inc.)* p. 159
- 87.- Eagon, P.K., Hsu, A.F. y Heath, E.C. (1975) *Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 34, 678.
- 88.- Pless, D.D., y Lennarz, W.J. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 7014.
- 89.- Lennarz, W.J. (1975) *Science*, 188, 986.
- 90.- Tanner, W. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 35, 144.
- 91.- Tanner, W. Jung, P. y Behrens, N.H. (1971) *FEBS Lett.*, 16, 245.
- 92.- Jung, P. y Tanner, W. (1973) *Eur. J. Biochem.* 37, 1.
- 93.- Lehle, L. y Tanner, W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 350, 225.
- 94.- Babczinski, P. y Tanner, W (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 54, 1119.
- 95.- Bretthauer, R.K. y Wu, S. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 151.

- 96.- Lehle, L. y Tanner, W. (1975) Biochim. Biophys. Acta, 399 , 364.
- 97.- Kaus, H. (1969) FEBS Lett., 5, 81.
- 98.- Villemez, C.L. y Clark, A.F. (1969) Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 57.
- 99.- Villemez, C.L. (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm., 40, 636.
- 100.- Alain, S.S. y Hemming, F.W. (1971) FEBS Lett., 19, 60.
- 101.- Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1973) J. Biol. Chem., 248, 2858.
- 102.- Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1975) Fed. Proc. , Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 34, 678.
- 103.- Pont-Lezica, Brett, C.T., Romero Martínez, P. y Dankert, M. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm., 66, 980.
- 104.- Keenan, R.W., Krucaek, M. y Fusiato, L. (1975) Arch. Biochem. Biophys., 161, 697.
- 105.- Quezada Allue, L.A., Belocopitow, E. y Marechal, L.R. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm., 66, 1201.
- 106.- Hemming, F.W. (1974) en Biochemistry of Lipids, ed. T.W. Goodwin, (Butter worth and University Park Press, London and Baltimore) Vol. 4, p. 39.
- 107.- Helting, T. y Peterson, P.A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, 429.
- 108.- De Luca, L., Maestri, N., Rosso, G. y Wolf, G. (1973) J. Biol. Chem., 248, 641.
- 109.- Rosso, G., De Luca, L., Warren, C.D. y Wolf, G. (1975) J. Lipid Res., 16, 235.
- 110.- Rodriguez, P., Bello, O. y Gaede, K(1972) FEBS Lett., 28, 133.
- 111.- Parodi, A.J., Staneloni, R., Cantarella, A.I., Leloir, L.F., Behrens, N.H., Carminatti, H. y Levy, J.A. (1973) Carbohydr. Res., 26, 393.
- 112.- Goldstein, I.J. (1972) Methods Carbohydr. Chem., 6, 106.
- 113.- Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. y Dankert, M. (1972) Biochem. Biophys. Acta, 270, 529

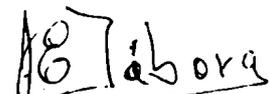
- 114.- Thomas, J.A., Keith, K., Schlender, K. y Larner, J. (1968) Anal. Biochem., 25, 486.
- 115.- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem., 226, 497.
- 116.- Burgos, J., Hemming, F.W., Pennock, J.F. y Merton, R.A. (1963). Biochem. J. 88, 470.
- 117.- Moulé, Y., Chauveau, J. y Rouiller, C. (1960) J. Biophys. Biochem. C y tol., 7, 547
- 118.- Behrens, N.H., Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68, 2857.
- 119.- Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1973) Biochemistry, 12, 5031.
- 120.- Pelc, B. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 208, 155.
- 121.- Huber, C.N., Scobell, H.D., Tai. y Fisher, E.E. (1968) Anal. Chem., 40, 207.
- 122.- Shanon, J.C. y Grech, R.G. (1969) J. Chromatog., 44, 307.
- 123.- Ballio, A. y Russi, S. (1960) J. Chromatog., 4, 117.
- 124.- Renkonen, O. y Varo, P. (1967) En Lipid Chromatographic Analysis, ed. G.V. Marinetti (Marcel Dekker, New York) p. 41.
- 125.- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911.
- 126.- Stahl, E. (1964) En Thin Layer Chromatography, ed. E. Stahl (Academic Press, New York) p. 190.
- 127.- Kates, M., Work, T.S. y Work, E. (1972) En Laboratory Techniques in Biochem and Mol. Biol., (North Holland Publishing Co., Amsterdam) Vol. 3, p. 438.
- 128.- Dumphy, P.J., Kern, J.D., Pennock, J.F., Whittle, K.J. y Feeney, J. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 136, 136.
- 129.- Leloir, L.F. y Cardini, C.E. (1953) Biochim. Biophys. Acta 12, 15.
- 130.- Bourne, E.J., Hutson, D.H. y Weigel, H. (1959) Chem. and Ind. August 15, 1047.
- 131.- Witaker, J.R. (1967) En Paper Chromatography and Electrophoresis, ed. G. Zweig. J.R. Witaker (Academic Press, New York and London)p.50

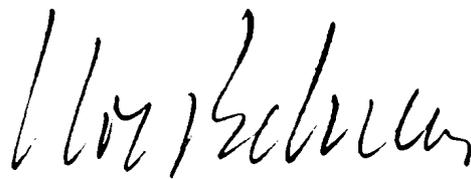
- 132.- Trevelyan, W.E., Procter, D.P. y Harrison, J.S. (1950) *Nature*, 166, 444.
- 133.- Vogel, A.I. (1956) *En Practical Organic Chemistry* (Longman, London) p. 179.
- 134.- Clamp, R.J., Bhatti, T. y Chambers, R.E. (1971) *Meth. of Biochem. Anal.*, 19, 229.
- 135.- Etchinson, J.R. y Holland, J.J. (1974) *Virology*, 60, 217.
- 136.- Mc Lean, G., Werner, J.A. y Aminoff, D. (1973) *Anal. Biochem.*, 55, 72.
- 137.- Seifter, S., Dayton, S., Novic, B. y Muntwyler (1950) *Arch. Biochem.*, 25, 191.
- 138.- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) *Anal. Chem.*, 28, 350.
- 139.- Chen, P.S., Torhara, T.Y. y Warner, H. (1956) *Anal. Chem.*, 28, 1756.
- 140.- Trudinger, P.A. (1970) *Anal. Biochem.*, 36, 225.
- 141.- Bray, G. (1960) *Anal. Biochem.*, 1, 279.
- 142.- Spiro, R.G. (1966) *En Methods in Enzymology*, Ed. E.F. Neufeld, V. Ginsburg. (Academic Press, New York and London) Vol VIII, p. 3.
- 143.- Marshall, R.D. y Neuberger, A. (1972) *En Glycoproteins*, ed. A. Gottschalk (Elsevier, Amsterdam) Vol. A., p. 224.
- 144.- Parodi, A.J., comunicación personal.
- 145.- Isemura, M. y Schmid, K. (1971) *Biochem. J.*, 124, 591.
- 146.- Radhakrishnamurthy, B., Fishkin, A.F., Hubbell, G.J. y Berenson, G.S. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.*, 104, 19.
- 147.- Radhakrishnamurthy, B., Fishkin, A.F. y Berenson, G.S. (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 101, 129.
- 148.- Radhakrishnamurthy, B. y Berenson, G.S. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 2106.
- 149.- Radhakrishnamurthy, B. y Berenson, G.S. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2000.

- 150.- Wagh, P.W., y Roberts, B.I. (1972) *Biochemistry*, 11, 4222.
- 151.- Rickert, W.S. y Mc Bride-Warren, P.A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 336, 437.
- 152.- Pazur, J.H., Kleppe, K. y Ball, E.M. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, 515.
- 153.- Tulsiani, D.R.P., Keller, R.K. y Touster, O. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 4770.
- 154.- Sanderson, A.R., Cresswell, P. y Welsh, K.I. (1971) *Nature N.B.* 230, 8.
- 155.- Ebert, W., Roelcke, D. y Weicker, H. (1975) *Eur. J. Biochem.*, 53, 505.
- 156.- Pospisilova, J., Hascovec, C., Eutlecher, G. y Kocourek, J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 373, 444.
- 157.- Chen, T.T., Bazer, F.W., Cetorelli, J.J., Pollard, W.E. y Roberts, E. M., (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 8560.
- 158.- Droege, W., Strominger, J.L., Single, P.S. y Lüderitz, O. (1975) *Eur. J. Biochem*, 54, 301.
- 159.- Kornfeld, R. y Siemers, C. (1974) *J. Biol. Chem*, 249, 1295.
- 160.- Tomita, M. y Marchessi, V.T. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 72, 2964.
- 161.- Fujita, S. y Cleve, H. (1975) *Biochem. Biophys. Acta*, 382, 172.
- 162.- Weiss, J.B., Lote, C.J. y Babiski, H. (1971) *Nature N.B.*, 234, 25
- 163.- Kawasaki, I y Yamashina, I. (1973) *J. Biochem (Japan)*, 74, 639.
- 164.- Funakoshi, I. y Yamashina, I. (1972) *J. Biochem. (Japan)*, 72, 459.
- 165.- Phillips, J.L. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, 377.
- 166.- Kim, Y.S. y Perdomo, J.M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 342, 111.
- 167.- Bosmann, H.B. y Martin, S.S. (1969) *Science*, 164, 190.
- 168.- Martín, S.S. y Bosmann, H.B. (1971) *Exp. Cell Res.*, 66, 59.

169.- Itoh., N., Kawasaki, T. y Yamashina, I. (1974) J. Biochem. (Japan),
76, 459.

170.- Hallgren, P., Lundblad, A. y Svenson, S. (1975) J. Biol. Chem.,
250, 5312.


Eduardo Tábora


Nicolás H. Behrens