

Tesis de Posgrado

Lípidos intermediarios en algas : Estudio de sus características y función en la síntesis de glicanos complejos

Hopp, Horacio Esteban

1977

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas 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:

Hopp, Horacio Esteban. (1977). Lípidos intermediarios en algas : Estudio de sus características y función en la síntesis de glicanos complejos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1618_Hopp.pdf

Cita tipo Chicago:

Hopp, Horacio Esteban. "Lípidos intermediarios en algas : Estudio de sus características y función en la síntesis de glicanos complejos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1618_Hopp.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

LIPIDOS INTERMEDIARIOS EN ALGAS.
ESTUDIO DE SUS CARACTERISTICAS Y FUNCION EN LA SINTESIS
DE GLICANOS COMPLEJOS

Autor: Horacio Esteban Hopp
Director de tesis: Ing. Agr. Rafael Pont Lezica
Lugar de trabajo: Departamento de Biología,
Fundación Bariloche.

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

1 9 7 7

1 6 1 8

INDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | i |
| INTRODUCCION | 1 |
| I. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA CELULOSA | 1 |
| 1) Biosíntesis de celulosa | 2 |
| 2) Localización intracelular | 5 |
| II. ESTERIL GLUCOSIDOS | 8 |
| 1) Estructura de los esteril glucósidos | 9 |
| 2) Función de los esteril glucósidos | 11 |
| III. LOS POLIISOPRENOIDES | 12 |
| 1) Poliprenoles oxigenados | 12 |
| Nomenclatura de poliprenoles | 14 |
| Propiedades de los prenil fosfatos | 16 |
| 2) Biosíntesis de poliprenoles | 17 |
| 3) Localización subcelular | 21 |
| IV. POLIPRENIL FOSFATOS COMO "LIPIDOS INTERMEDIARIOS" | 23 |
| 1) Naturaleza del lípido glicosilado | 24 |
| 2) Microorganismos | 25 |
| a) Biosíntesis de péptidoglicanos | 25 |
| b) Biosíntesis del antígeno O | 27 |
| c) Biosíntesis de otros glicanos complejos | 32 |
| 1) Mananos | 32 |
| 2) Manoproteínas de levaduras | 33 |
| 3) Polisacáridos capsulares | 33 |
| 4) Síntesis de manolípido micobacteriano | 34 |
| 5) Acidos teicoicos | 34 |
| 3) Sistemas animales | 37 |
| a) Derivados monosacáridos del dolicol fosfato | 37 |
| b) Derivados oligosacáridos de dolicol fosfato | 40 |
| c) Naturaleza de las proteínas glicosiladas | 42 |
| 4) Sistemas vegetales | 46 |
| a) <u>Phaseolus aureus</u> | 46 |
| b) <u>Fibras de algodón</u> | 48 |
| c) <u>Pisum sativum</u> | 49 |
| d) Síntesis de glicoproteínas en plantas | 50 |
| 5) Conclusiones generales | 50 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 53 |
| I. PRODUCTOS QUIMICOS | 53 |
| 1. Compuestos radiactivos | 53 |
| 2. Esteroles y derivados | 53 |
| a) Esteroles | 53 |
| b) Preparación de las dispersiones de β -sitosterol | 54 |

| | |
|--|----|
| c) Aislamiento y purificación de esteroides libres de <u>Prototheca zopfii</u> | 54 |
| d) Aislamiento y purificación de EG y AEG | 54 |
| 3. Lecitina y fosfatidil etanolamina | 55 |
| Aislamiento y purificación de fosfatidil etanolamina | 55 |
| 4. Derivados isoprenicos | 56 |
| Aislamiento de poliprenil fosfatos endógenos | 57 |
| 5. Preparación de glucósidos | 58 |
| a) 1,6-anhidroglucosano | 58 |
| b) Disacáridos | 58 |
| 6. Condiciones de crecimiento de <u>Prototheca zopfii</u> | 58 |
| a) Medios de cultivo | 58 |
| b) Cinética de crecimiento | 59 |
| II. PREPARACIONES Y ENSAYOS ENZIMATICOS | 61 |
| 1. Fracciones enzimáticas de <u>Prototheca zopfii</u> | 61 |
| 2. Purificación de la UDP-Glc:esterol glucosil-transferasa | 63 |
| 3. Fraccionamiento subcelular | 64 |
| a) Mitocondrias | 64 |
| b) Aparato de Golgi | 66 |
| c) Retículo endoplásmico y membrana plasmática | 66 |
| 4. Ensayo de glucosilación | 67 |
| A. Extracción con butanol | 68 |
| B. Extracción con cloroformo-metanol | 70 |
| 5. Biosíntesis de dolicol fosfato | 70 |
| 6. Hidrólisis enzimática de prenil fosfatos | 73 |
| 7. Síntesis de celulosa | 73 |
| 8. Hidrólisis enzimática de glucanos | 74 |
| a) α -glucosidasa | 74 |
| b) β -glucosidasa | 74 |
| c) dextranasa | 75 |
| d) α -amilasa | 75 |
| e) celulasa | 75 |
| f) pronasa | 75 |
| III. METODOS ANALITICOS | 76 |
| 1. Determinaciones cuantitativas | 76 |
| a) Concentración de proteínas | 76 |
| b) Concentración de fosfato | 76 |
| c) Concentración de azúcares reductores | 76 |
| d) Concentración de esteroides | 76 |
| 2. Tratamientos degradativos | 77 |
| a) Hidrólisis ácida suave | 77 |
| b) Tratamiento alcalino de aceptores lipídicos | 77 |
| c) Reducción catalítica | 77 |
| d) Tratamiento con fenol | 78 |
| e) Reducción con borohidruro | 78 |
| f) Oxidación con periodato | 78 |
| g) β -eliminación | 79 |
| h) Acetólisis | 79 |

| | |
|--|----|
| 3. Cromatografías y electroforesis | 80 |
| a) Cromatografía de intercambio iónico | 80 |
| b) Filtración en gel | 81 |
| c) Cromatografía en papel | 82 |
| d) Cromatografía en capa delgada | 82 |
| e) Electroforesis en papel | 83 |
| f) Electroforesis en gel de poliacrilamida | 83 |
| 4. Mediciones de radiactividad | 84 |

RESULTADOS 85

| | |
|---|-----|
| I. GLUCOSILACION DE LIPIDOS | 85 |
| 1. Caracterización de los glucolípidos neutros | 87 |
| a) Propiedades de los glucolípidos neutros | 87 |
| b) Caracterización del grupo esterilo | 93 |
| c) Posición del grupo acilo | 93 |
| d) Configuración anomérica | 96 |
| 2. Purificación y propiedades de la UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa | 98 |
| a) Purificación de la enzima | 98 |
| b) Concentración de UDP-Glc | 99 |
| c) Nucleótidos | 99 |
| d) Concentración de proteínas | 100 |
| e) Efecto del pH | 100 |
| f) Metales | 102 |
| g) Temperatura | 102 |
| h) Detergente | 104 |
| i) Especificidad de sustrato | 104 |
| j) Esteroles exógenos | 106 |
| 3. Efecto de la fosfatidil etanolamina | 107 |
| 4. Formación de EG y AEG en el tiempo | 109 |
| 5. Localización subcelular | 111 |
| II. GLUCOLIPIDOS POLARES: CARACTERIZACION Y BIOSINTESIS | 113 |
| 1. Caracterización del lípido aceptor | 113 |
| a) Aislamiento y propiedades del lípido aceptor endógeno | 114 |
| b) Propiedades del aceptor glucosilado | 117 |
| 2. Biosíntesis del lípido aceptor | 121 |
| a) Análisis de fracciones | 121 |
| b) Largo de cadena | 127 |
| c) Actividad aceptora | 129 |
| 3. Biosíntesis de Dol-P por fracciones subcelulares | 131 |
| 4. Propiedades de la UDP-Glc:poliprenil fosfato glucosiltransferasa | 133 |
| a) Especificidad de sustrato | 133 |
| b) Concentración de sustrato | 134 |
| c) Efecto del agregado de productos | 135 |
| d) Concentración de proteínas | 137 |
| e) Detergente | 137 |
| f) Metales | 138 |
| g) Efecto del pH | 139 |
| 5. Distribución subcelular | 141 |

| | |
|--|-----|
| III. DERIVADOS GLUCOSILADOS DE POLIPRENIL FOSFATOS | 143 |
| 1. Glucolípido I | 143 |
| 2. Glucolípido II | 146 |
| 3. Glucolípido III | 147 |
| 4. Efecto de la temperatura en la formación de glucolípidos | 151 |
| 5. Lípido-oligosacáridos | 152 |
| a) Análisis de fracciones lipídicas extraídas con cloroformo-metanol | 152 |
| b) Análisis de glucolípidos extraídos con cloroformo-metanol-agua | 155 |
| 6. Papel del Dol-P-Glc | 158 |
| IV. FORMACION DE POLIMEROS | 162 |
| 1. Caracterización del polímero soluble en agua | 162 |
| 2. Condiciones de formación del PSA | 167 |
| a) Proteínas | 167 |
| b) Detergente | 168 |
| c) Cationes, pH y concentración de UDP-Glc | 168 |
| d) Efecto de UDP y UMP | 169 |
| 3. Transferencia de (¹⁴ C)azúcares a polímeros | 170 |
| a) Incorporación en el tiempo | 170 |
| b) Efecto de poliprenil fosfatos exógenos | 170 |
| c) Transferencia de radiactividad de glucolípidos a polímeros | 171 |
| 4. Presencia de celulosa en la pared celular de <u>P. zopfii</u> | 173 |
| 5. <u>Síntesis</u> de celulosa | 174 |
| a) Experimentos en el tiempo | 174 |
| b) Papel de la GDP-Glc | 176 |
| 6. Efecto de la cumarina | 177 |
| DISCUSION | 181 |
| GLUCOLIPIDOS NEUTROS | 181 |
| GLUCOLIPIDOS POLARES | 185 |
| BIOSINTESIS DEL LIPIDO | 186 |
| Localización subcelular | 188 |
| PROPIEDADES DE LA GLUCOSILTRANSFERASA | 188 |
| IDENTIDAD DE LOS GLUCOLIPIDOS | 189 |
| GLUCOSILACION DE PROTEINAS | 192 |
| SINTESIS DE CELULOSA | 193 |
| Efecto de la cumarina | 195 |
| CONCLUSIONES GENERALES | 197 |
| AGRADECIMIENTOS | 199 |
| RESUMEN | 200 |
| BIBLIOGRAFIA | 202 |

ABREVIATURAS

| | | |
|---------------|---|----------------------------------|
| Abe | : | abecucosa |
| AEG | : | acil esteril glucósidos |
| ADP | : | 5'-adenosina difosfato |
| ADP-Glc | : | 5'-adenosina difosfato glucosa |
| AMP | : | 5'-adenosina monofosfato |
| Asn | : | asparragina |
| ATP | : | 5'-adenosina trifosfato |
| CCD | : | cromatografía en capa delgada |
| Ci | : | Curie |
| CDP | : | 5'-citidina difosfato |
| CDP-Abe | : | 5'-citidina difosfato abecucosa |
| CMP | : | 5'-citidina monofosfato |
| cpm | : | cuentas por minuto |
| CoA | : | coenzima A |
| DEAE-celulosa | : | dietil aminoetil celulosa |
| D-glu.COOH | : | D-glutámico |
| DMAPP | : | dimetilalil pirofosfato |
| Dol | : | dolicol |
| Dol-P | : | dolicol fosfato |
| EDTA | : | ácido etilendiamino tetraacético |
| EG | : | esteril glucósidos |
| FE | : | fosfatidil etanolamina |
| Fic | : | ficaprenol |
| Fic-P | : | ficaprenil fosfato |
| Fuc | : | fucosa |
| Gal | : | galactosa |
| GDP-Glc | : | 5'-guanosina difosfato glucosa |
| GDP-Man | : | 5'-guanosina difosfato manosa |
| Glc | : | glucosa |
| Gli | : | glicerol |

| | | |
|------------|---|---|
| HEPES | : | ácido-N-2-hidroxietilpiperasina-N'-2-etanosulfónico |
| IPP | : | isopentenil pirofosfato |
| L-Ala | : | L-alanina |
| L-Lis | : | L-lisina |
| Man | : | manosa |
| MVA | : | ácido mevalónico |
| MVA-P | : | ácido fosfomevalónico |
| MVA-PP | : | ácido pirofosforilmevalónico |
| NAcGlc | : | N-acetilglucosamina |
| NAcMur | : | N-acetilmurámico |
| NAcNeu | : | N-acetilneuramínico o ácido siálico |
| nmoles | : | nano moles |
| NMR | : | resonancia magnética nuclear |
| P | : | fosfato |
| pmoles | : | pico moles |
| PP | : | pirofosfato |
| PSA | : | polímero soluble en agua |
| Ram | : | ramnosa |
| R_f | : | relación de la movilidad de la sustancia con el frente de solvente |
| R_G | : | relación de la movilidad de la sustancia a la movilidad de la glucosa |
| R_{sorb} | : | relación de la movilidad de la sustancia a la movilidad del sorbitol |
| TCA | : | tricloroacético |
| TDP-Ram | : | 5'-timidina difosfato ramnosa |
| TPP | : | tiamino pirofosfato |
| Tris | : | Tris(hidroximetil amino) metano |
| tRNA | : | ácido ribonucleico de transferencia |
| UDP | : | 5'-uridina difosfato |
| UDP-Ara | : | 5'-uridina difosfato arabinosa |
| UDP-Gal | : | 5'-uridina difosfato galactosa |
| UDP-Glc | : | 5'-uridina difosfato glucosa |
| UMP | : | 5'-uridina monofosfato |
| UnMP | : | undecaprenol monofosfato |
| UV | : | ultravioleta |
| Xil | : | xilosa |

I N T R O D U C C I O N

I. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA CELULOSA

La celulosa constituye más del 50% del carbono orgánico presente en la biósfera, es el polisacárido estructural de las paredes celulares más abundante y sencillo del reino vegetal. La hidrólisis completa de la celulosa con ácidos concentrados produce únicamente D-glucosa, pero la hidrólisis parcial produce el disacárido reductor celobiosa, en el que el enlace entre las unidades D-glucosa es $\beta(1+4)$. El peso molecular mínimo de la celulosa se ha estimado que varía de 50.000 a 500.000, que es el equivalente de 300 a 3000 restos de glucosa.

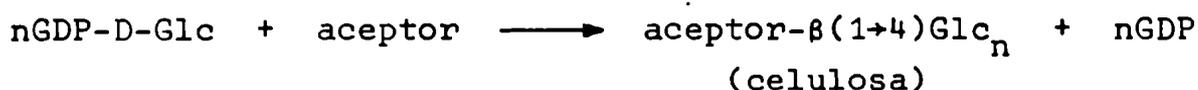
La celulosa en la pared celular de plantas está usualmente asociada a otros polímeros, principalmente hemicelulosas, pectina y proteínas. Las hemicelulosas comprenden un grupo variado y definido de polisacáridos que producen por hidrólisis hexosas y pentosas además de ácido glucourónico y galactourónico. Estos polisacáridos fueron frecuentemente denominados celulosanos (Norman, 1937). Muchos de los mismos son homopolisacáridos de xilosa y manosa que resultan solubles en álcali, pero cuya solubilidad decrece al asociarse a la celulosa (Norman, 1937). La pectina es un polímero del metil-D-galactouronato. De las proteínas asociadas a la pared celular, la más conocida hasta ahora es la extensina unida en forma covalente a las fibrillas de celulosa y se parece a su contrapartida en los tejidos animales, el colágeno, por su gran contenido de hidroxiprolina.

1) Biosíntesis de celulosa

Los procesos celulares de crecimiento (reproducción y alargamiento) llevan aparejados la síntesis de nuevos materiales de pared celular y por lo tanto de los polisacáridos constituyentes de la misma.

Los precursores solubles de estos polisacáridos son los nucleótido-azúcares, y una gran cantidad de trabajos se han escrito respecto a su relación con la síntesis de paredes celulares.

Como conclusión de los mismos, se puede afirmar que el sustrato a partir del cual la celulosa se alarga es la guanosina difosfoglucona (GDP-Glc). Los primeros en demostrar el papel de este precursor "in vitro" fueron Elbein y col. (1964). Estos autores incubaron GDP-(¹⁴C)Glc en presencia de un aceptor celulósico y extractos enzimáticos logrando la incorporación de radioactividad en material álcali insoluble. Exámenes más detallados denotaron que los azúcares agregados tenían una configuración β(1→4). La reacción puede esquematizarse como sigue (Hassid, 1972):



Este mecanismo fue confirmado con materiales de distinto origen tisular y taxonómico (Elbein y col., 1964; Barber y Hassid, 1965; Barber y col., 1964; Brummond y Gibbons, 1965; Ordín y Hall, 1967). El sistema enzimático parece tener un alto grado de especificidad hacia la GDP-Glc. Ninguno de los glucosilnucleótidos marcados conteniendo bases distintas a la guanosina pudieron servir como sustratos en la formación de celulosa.

Sin embargo, también fueron presentadas evidencias de la existencia de otro sistema enzimático de síntesis a partir de UDP-Glc (Brummond y Gibbons, 1965; Ordín y Hall, 1967; 1968; Villemez y col., 1967; Flowers y col., 1968; Franz y Meier, 1969).

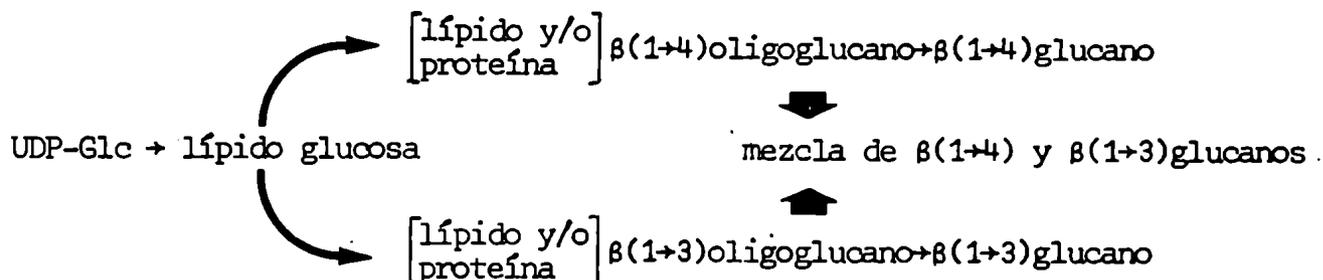
coproteínas en animales, bacterias y levaduras, así como también en la síntesis de polisacáridos de pared en bacterias; lo cual se analiza en detalle en las siguientes secciones. En plantas se determinó la formación de glicolípidos a partir de UDP-Glc y GDP-Man (Villemez y col., 1968; Kauss, 1969; Villemez, 1970; Forsee y Elbein, 1972; Alam y Hemming, 1973; Clark y Villemez, 1973; Brett y Northcote, 1975; Pont Lezica y col., 1976, 1977; Hopp y col., 1977), aunque no está claro aun el papel que los mismos cumplen.

También se ha sugerido frecuentemente la participación de glicoproteínas en el proceso. Kjosbakken y Colvin (1975) comunicaron la presencia de un complejo poliglucan proteico en la bacteria Acetobacter xylinum que tendría funciones de intermediario en la síntesis de celulosa a partir de UDP-Glc.

Satoh y col. (1976) observaron la incorporación de glucosa a $\beta(1\rightarrow4)$ glucanos por medio de fracciones citoplasmáticas, con velocidades mayores que en la pared celular. Experimentos de pulsos en los que se agregaba compuestos no radioactivos después de incubación con precursores marcados indicaron que este glucano tenía un recambio y que no era, probablemente, un producto final en sí mismo; lo que hizo postular a los autores su intermediación en la síntesis de celulosa. Esta suposición fue confirmada por el hecho de que la cumarina, compuesto que inhibe específicamente la síntesis de celulosa, inhibió también la síntesis de este glucano soluble. El glucano no fue, sin embargo, caracterizado y los autores postulan que el mismo está unido a una porción proteica, responsable de su solubilidad, lo cual estaría de acuerdo con lo propuesto por Kjosbakken y Colvin (1975).

Brett y Northcote (1975) trabajando con arvejas notan incorporación de glucosa a partir de UDP-Glc a los siguientes compuestos: lípidos, proteínas y glucanos insolubles. Los lípidos tienen unidos una o más glucosas vía un fosfato o pirofosfato. Las proteínas, en cambio, tienen toda una cadena de azúcares unida también a través de un puente fosfodiéster. Las glucosas se encuentran conjugadas mediante uniones $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$, pero la relación de

este tipo de uniones fue muy distinta en los tres tipos de compuestos. Si bien no se probó una interrelación entre los mismos los autores postulan el siguiente mecanismo de síntesis:



Este tipo de vía metabólica proveería un mecanismo por el cual polisacáridos distintos, originados a partir del mismo nucleótido, azúcar precursor podrían ser controlados por el nivel de intermediarios unidos a membrana.

2) Localización intracelular

El sistema enzimático de síntesis de celulosa, tanto a partir de GDP-Glc como de UDP-Glc, está fuertemente unido a membranas y tiene aparentemente un aceptor endógeno, pues preparaciones de membrana libres de pared celular poseen actividad sintética. La naturaleza posible de este aceptor endógeno está aun bajo discusión, como así también el sitio en el cual este proceso se lleva a cabo.

Se puede sintetizar las opiniones al respecto en dos posiciones fundamentales. La primera, postulada fundamentalmente por Northcote y col. (1971), plantea que la síntesis de celulosa, a diferencia de otros polisacáridos y de lo que ocurre en otros sistemas, se efectúa mediante enzimas localizadas en la membrana celular. Explica el hecho de que muchos investigadores hallaran las enzimas responsables de la síntesis de celulosa en organelas tales como el aparato de Golgi, como que se trata de proteínas en tránsito hacia su destino definitivo: la membrana celular; no siendo fun-

cionales "in vivo" hasta entonces. La segunda posición, es que la celulosa sigue un esquema de síntesis parecido al de otros polisacáridos y glicoproteínas en un ciclo típico de exocitosis celular. Ambas posiciones tienen fundamentos experimentales que las apoyan. Resumiremos algunos de ellos: Brown y col. (1970) describieron, en la haptofícea Pleurochrysis sherffellii microfibrillas que, por su ordenamiento concéntrico, recordaban la estructura de la celulosa. Estas microfibrillas estaban estrechamente unidas a supuestos péptidos. Análisis detallados de las inclusiones aisladas, llevados a cabo por Herth y col. (1972) indican que se trataba de un polisacárido estructural celulósico covalentemente unido a material peptídico, lo que hizo denominar al mismo glicoproteína celulósica. Utilizando microscopía electrónica y técnicas de fractura y grabado, pudo ser seguida la secuencia de estas inclusiones, desde su formación en los dictiosomas hasta su secreción por exocitosis. Se observó que las inclusiones se iniciaban en una cisterna particular caracterizada por una dilatación central con una capa densa al microscopio electrónico en la superficie de la membrana. Estas dilataciones fueron consideradas tentativamente como "centros de polimerización" de las fibrillas celulósicas proponiéndose la siguiente vía hipotética de síntesis:

- 1 - Un péptido se produce y deposita en la membrana nuclear y retículo endoplásmico rugoso.
- 2 - Este péptido es traslocado a las cisternas del aparato de Golgi.
- 3 - En las cisternas el polímero glucosídico se sintetiza por actividad de las glucosiltransferasas (además de otras enzimas) sobre el péptido el cual, en base a la morfología de las inclusiones fibrilares, está en íntima relación con la superficie interna de las cisternas de Golgi. Este péptido está orientado, tridimensionalmente, con un aminoácido portador de un grupo hidroxilo hacia la cadena de azúcares nascente y puede funcionalmente determinar y controlar la iniciación de la síntesis, el largo y la morfología de la cadena de polisacárido en formación.

4 - Finalmente, el complejo unido covalentemente de glucano celulósico y proteína es secretado exocitóticamente al espacio extracelular para ser incorporado a la pared celular.

Franke (1970) discute la presencia de cisternas similares en otros organismos y sugiere que los mismos son indicadores morfológicos de estadios determinados en la formación de polisacáridos. El hecho de encontrar material celulósico en estas inclusiones hizo interpretar a Brown y col. (1970) sus resultados como una evidencia de la síntesis de celulosa por el aparato de Golgi. En ciertas plantas superiores, las enzimas relacionadas con la síntesis de celulosa fueron halladas en asociación con las cisternas de Golgi y vesículas del retículo endoplásmico (Ray y col., 1969; Shore y Maclachlan, 1973) o Golgi y membrana plasmática (Van der Woude y col., 1974). Esta hipótesis contrasta con los resultados de otros investigadores (Preston y Goodman, 1968; Abdul-Baki y Ray, 1971; Barber y col., 1964; Hassid, 1969) los que encuentran actividad de síntesis en la membrana celular; lo que hace sugerir a Preston y Goodman (1968) que la síntesis se efectúa exclusivamente en la membrana celular, y que como las cisternas de Golgi se fusionan y contribuyen funcionalmente a la formación de los componentes de la membrana plasmática, el complejo de Golgi únicamente transportaría las enzimas responsables de la síntesis de celulosa a la misma (Northcote, 1971).

Respecto a otros polisacáridos hay evidencias de la participación del aparato de Golgi en la síntesis de glicanos en Phaeophyceae. Estudios histoquímicos al microscopio óptico en las algas pardas Fucus (McCully, 1968) y Dictyota (Evans y Holligan, 1972) indican que el ácido algínico (ácido poliurónico) y polisacáridos sulfatados como el fucoidano son sintetizados en el aparato de Golgi.

Estudios citoquímicos al microscopio electrónico para la detección de sustancias complejadas con carbohidratos (Thiery, 1967) y autorradiografías al microscopio electrónico utilizando leucina

marcada, muestran que los cuerpos de Golgi son los sitios de síntesis de las vesículas que contienen moléculas glicoproteicas de exportación. El contenido de las vesículas se forma en asociación con el adyacente retículo endoplásmico rugoso a través de vesículas pequeñas de transferencia. El material glicoproteico es excretado de la célula por exocitosis y forma una sustancia extracelular de tipo fibrilar. También fue demostrada la participación del aparato de Golgi en la formación de glicoproteínas en Ectocarpus (Baker y Evans, 1973); Ceramium (Chamberlain y Evans, 1973); Smithora naiadum (McBride y Cole, 1971) y de mucopolisacáridos en Bulbochaete chiloensis (Retallak y Butler, 1972) de funciones análogas.

De estos resultados parece evidente que materiales como los polisacáridos son sintetizados y modificados en el aparato de Golgi en algas. Las enzimas necesarias para esta síntesis, tales como las nucleótido-azúcares transglucosilasas, deben estar contenidas en estas membranas.

II. ESTERIL GLUCOSIDOS

La cuestión de un aceptor para el grupo glucosilo está aun sin respuesta. Un lípido intermediario sería visto como un hecho lógico en un sistema enzimático unido a membrana dado que daría una vía de transporte de la glucosa a través de la misma hacia la pared celular.

Sin embargo, si un lípido intermediario participa en la formación de polisacáridos de pared celular en plantas (por ej. celulosa), no se han presentado pruebas concluyentes hasta la fecha en ese sentido.

En este trabajo se explora esta posibilidad y para ello se analizan los dos tipos de glucolípidos formados por el sistema de Prototheca zopfii: esteril glucósidos y poliprenil glucósidos.

1) Estructura de los esteril glucósidos

Los esteril glucósidos (también llamados fitosterolinas) fueron encontrados al estudiar la composición química de numerosas plantas vasculares, y probablemente se encuentren en todas ellas, y están representados por una gran variedad de sustancias (Gallard, 1968; Courtois y col., 1970; Marshall y col., 1970; Elks y col., 1970; Bush y col., 1971; Laine y col., 1971).

No solo fueron descriptos en plantas sino que también se comunicó su existencia en ciertas cepas bacterianas (Smith, 1971), levaduras (Esders y Light, 1972; Parodi, 1977; McMorris y White, 1977) y tejidos animales (Elks y col., 1970; Chirva y col., 1969; Collins y col., 1970).

Por lo general existe una unión de tipo glucosídica entre el extremo reductor del azúcar y el hidroxilo del C-3 del esteroil, aunque en esteroides polihidroxilados de animales se describieron otros puntos de unión como el caso de los 17 α -hidroxilesteroides (Collins y col., 1970).

En plantas vasculares, los esteril glucósidos se ven por lo general acompañados por sus derivados 6'-O-acil- β -D-glucósidos. Es decir, la posición 6 del azúcar está esterificada por un grupo acilo. La composición del grupo acilo de los AEG varía considerablemente dependiendo de la fuente y del estado de desarrollo del tejido (Gallard, 1968; Lepage, 1964; Kiribuchi y col., 1966; Bush y Grünwald, 1972; Singh y Privett, 1970; Nordby y Nagy, 1971). En cambio, la composición del esterilo resulta más constante e idéntica a la de esteroides libres en el mismo tejido. En la figura 1 se muestran los EG y AEG más frecuentes en plantas superiores: β -sitosteril glucósido y acil- β -sitosteril glucósido.

La glucosilación enzimática de esteroides fue objeto de muchos estudios. Se demostró que parte de la radioactividad originaria de UDP-[U- 14 C]Glc inyectada en hojas de diversas plantas se recuperaba en EG y AEG (Eichemberg y col., 1968). La transferencia de residuos D-glucosídicos de UDP-Glc a esteroides endógenos y la aci-

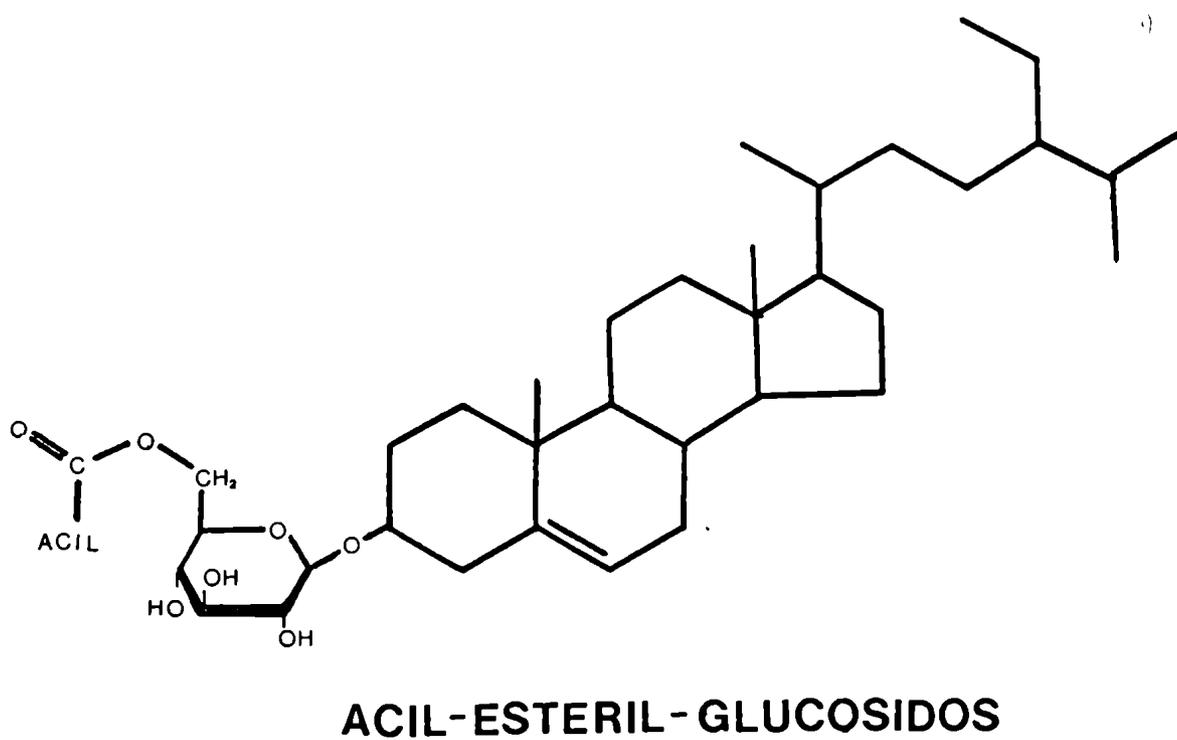
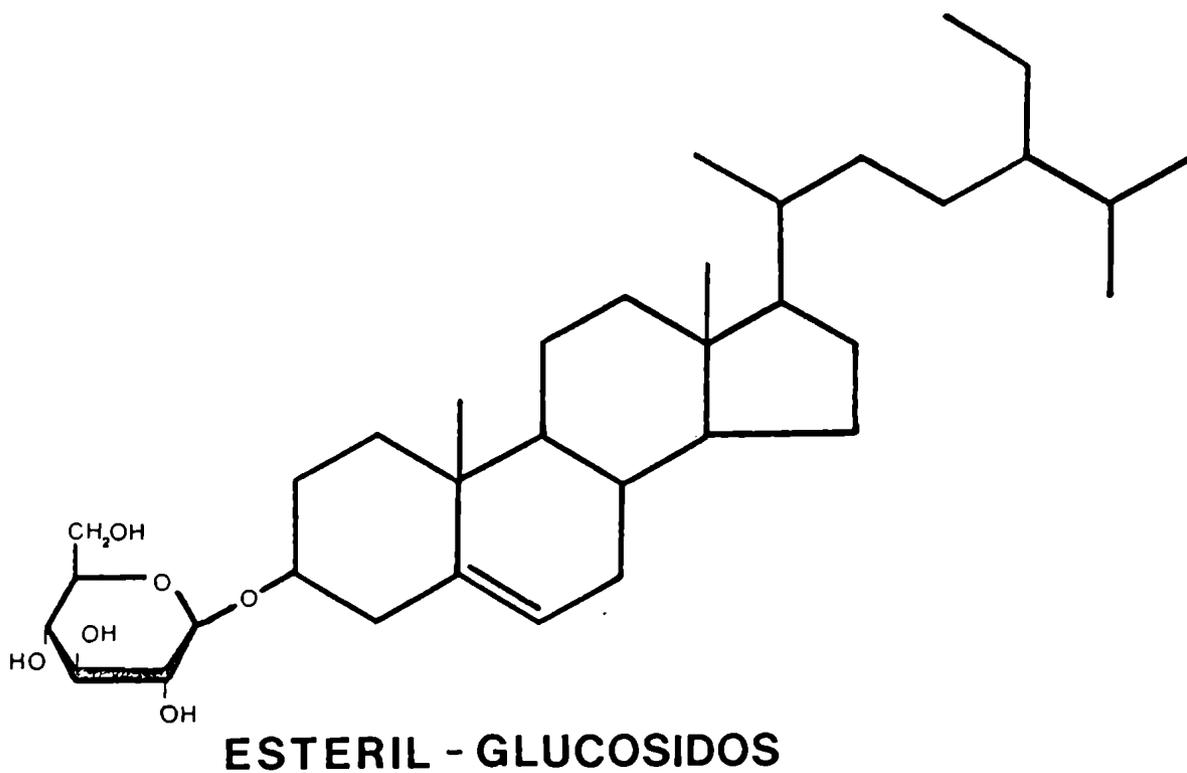
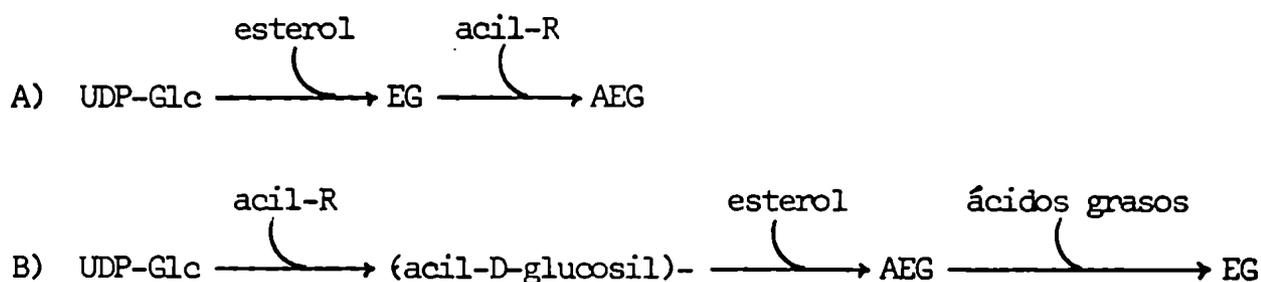


FIGURA 1. Fórmula de las fitosterolinas más comunes halladas en plantas superiores.

lación de los mismos mediante dadores de acilos fue observada en homogenatos de órganos de vegetales superiores crudos o fraccionados por centrifugación (Lepage, 1964; Kiribuchi y col., 1966; Hou y col., 1968; Kauss y col., 1968; Ongun y col., 1970; Péaud-Lenoël y Axelos, 1972; Forsee y col., 1974).

Eichenberg y Grob (1969) propusieron dos posibles mecanismos de reacción:



2) Función de los esteril glucósidos

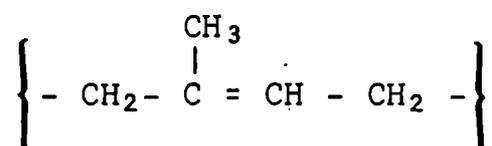
Se ha sugerido que las propiedades de las membranas son influenciadas en gran medida por las interacciones entre fosfolípidos y esteroides, particularmente las existentes por efecto del grupo hidroxilo en la posición 3 de los esteroides y los grupos fosfato de los fosfolípidos (Bittman y Blau, 1972; Hsia y col., 1972; Bowles y col., 1977). Resulta evidente que la transferencia de glucosa al grupo OH impediría este tipo de interacciones, y que, seguido de una subsecuente acilación, afectaría profundamente la organización de la membrana.

Uno de los roles postulados para los esteroides en las membranas implica un adelgazamiento de la membrana por fuerzas polares estereoespecíficas y fuerzas hidrofóbicas entre los esteroides y los constituyentes fosfolipídicos (Bittman y Blau, 1972; Hsia y col., 1972). La formación de EG destruiría esta interacción polar puesto que el esteroide deja de tener el grupo hidroxilo libre que puede formar puentes hidrógeno con los fosfolípidos (Grünwald,

1971). Es posible que la acilación de los EG refuerce las fuerzas hidrofóbicas entre los fosfolípidos y esteroides, pues la inserción de una cadena de ácido graso adicional probablemente cambie apreciablemente la conformación espacial de estas moléculas.

III. LOS POLIISOPRENOIDES

Los isoprenos y sus derivados constituyen un conjunto de productos naturales que tienen en común el hecho de ser derivados poliméricos de la unidad:



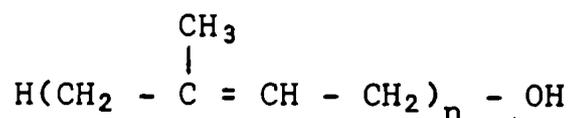
La familia está constituida por muy diversos compuestos como ser aceites esenciales, resinas, esteroides, hormonas vegetales (ácido abscísico y giberelinas), carotenoides, poliprenoles y caucho. Todos ellos están formados por dos o más unidades isoprénicas unidas cabeza a cola (con la excepción de esteroides y carotenos), ya sea en cadena abierta o formando sistemas cíclicos con uno o más anillos. Además de los compuestos insaturados múltiples de la unidad C_5H_8 , se encuentran también, en forma natural, derivados por oxidación, reducción y/o pérdida de carbonos. En la tabla I se presenta un resumen de las clases generales de isoprenoides. En plantas se sintetizan numerosos miembros de la familia.

1) Poliprenoles oxigenados

Los poliprenoles oxigenados son un conjunto de moléculas formadas por un número variable de unidades isoprénicas con la siguiente fórmula general:

TABLA I: La familia de isoprenoides.

| Clase | Fórmula empírica | Ocurrencia y ejemplo | Derivados oxigenados |
|----------------|------------------|---|--|
| Isopreno | C_5H_8 | No se presenta en la naturaleza. | Isopentenil pirofosfato Dimetilalil pirofosfato |
| Monoterpenos | $C_{10}H_{16}$ | Aceites esenciales, mirceno | Alcoholes terpénicos (geraniol, nerolidol), aldehidos, cetonas |
| Sesquiterpenos | $C_{15}H_{24}$ | Aceites esenciales, resinas | Alcoholes terpénicos (farnesol), cetonas, ácidos (ácido abscísico) |
| Diterpenos | $C_{20}H_{32}$ | Aceites esenciales, resinas, terpenos de C_{20} | Alcoholes (geranilgeraniol), fitol (cadena lateral de la clorofila), vit. A, giberelinas, ácidos resínicos |
| Triterpenos | $C_{30}H_{48}$ | Terpenos de C_{30} , ubiquitosa, escualeno | Esteroles (C_{30}), saponinas, lupeol |
| Tetraterpenos | $C_{40}H_{64}$ | Carotenos, fitoenos | Xantofilas |
| Politerpenos | $(C_5H_8)_n$ | Caucho, gutapercha | Alcoholes (betulaprenol, ficaprenol, solanesol, dolicol) |



Sus características son:

- a) El número de unidades isoprénicas (n) fluctúa entre 5 y 24 (Hemming, 1974).
- b) Existen variaciones en cuanto al grado de saturación de unidades.
- c) Debido a la presencia de dobles enlaces, se originan isómeros cis y trans, y mezclas de ambos. Si bien en la naturaleza se encuentran compuestos con todas las dobles ligaduras en trans como en la gutapercha (Wildman y Cohen, 1955; Bonner, 1965), el solanesol (Rowland y col., 1956) y el espadicol (Hemming y col., 1963) o todas cis como el caucho (Wildman y Cohen, 1955; Bonner, 1965) parece ser que los poliprenoles con funciones de intermediarios poseen ambos tipos de enlace (Hemming, 1974).

La tabla II muestra los poliprenoles más comunes encontrados en la naturaleza y su estructura. Como puede verse, la estructura de los poliprenoles lleva aparejada una mezcla de residuos cis y trans (con las excepciones del solanesol y espadicol). Los residuos trans se encuentran cercanos al extremo ω indicando que las primeras unidades son polimerizadas por una enzima diferente del resto de unidades con una configuración cis.

Con la excepción del dolicol y de los hexohidroprenoles, los cuales tienen la unidad α saturada, los poliprenoles son por lo general alílicos.

Nomenclatura de poliprenoles. La nomenclatura tradicional hace referencia por un lado a la fuente de donde se los aisló. Por ejemplo, ficaprenol, porque se purificó de las hojas del gomero, Ficus elastica; castaprenol, porque se obtuvo del castaño, etc.; y por el

TABLA II: Estructura y fuente de algunos poliprenoles oxigenados

| Poliprenoles | Estructura | Fuente |
|-------------------------------|---|---|
| Betulaprenol (6-9) | ω -T-T-C-(C) _n -C-OH n=1-4 | Plantas superiores |
| Dolicol (14-21) | ω -T-T-C-(C) _n -S-OH n=9-16 | Levaduras, mamíferos, invertebrados marinos, plantas superiores |
| Espadicol (10) | ω -T-T-T-(T) _n -T-OH n=5 | Plantas superiores |
| Ficaprenol (10-13) | ω -T-T-T-(C) _n -C-OH n=4-8 | Plantas superiores |
| Hexahidropoliprenoles (19-23) | S-S-T-T-(C) _n -S-OH n=14-18 | <u>Aspergillus fumigatus</u> |
| Solanesol (9) | ω -T-T-T-(T) _n -T-OH n=4 | Plantas superiores |
| Undecaprenol (11) | ω -T-T-C-(C) _n -C-OH n=6 | Bacterias |

ω : ω -residuo isoprénico; T: residuo isoprénico con doble ligadura en configuración trans; C: residuo isoprénico con doble ligadura en configuración cis; S: residuo isoprénico saturado (Hemming, 1974).

otro, al largo de cadena, por ejemplo, undecaprenol, dodecaprenol, dolicol (del griego dolikos = largo), etc.

La denominación se completa asignando la letra griega α a la unidad isoprénica que lleva el hidroxilo y la letra ω (omega) a la unidad del extremo ramificado.

Los principales defectos que adolece esta nomenclatura son:

Dice muy poco con respecto a las características químicas (ejemplo: número de saturaciones, ubicación de sustituyentes) y estereoquímicas (ejemplo: tipo y ubicación de los dobles enlaces).

Aún cuando sus propiedades permitan agruparlos, al crecer el nú-

mero de fuentes de donde se los extrae crece en forma paralela el número de nombres (Henning, 1974).

Debido a las dificultades enunciadas Hemming (1974) propuso una nomenclatura basada en la que la IUPAC recomienda para las quinonas poliisoprenoideas.

En dicha nomenclatura se indica con números arábigos el largo de la cadena, en unidades isoprénicas, y con números romanos la presencia, en la respectiva unidad repetitiva, de sustituyentes, saturaciones o dobles enlaces trans. Ejemplos:

IX, X ditrans, policis, prenol 11 - undecaprenol

VIII, IX, X tritran, policis, prenoles 11-12 = ficaprenol

Por razones de simplicidad en el desarrollo de este trabajo se seguirá usando la nomenclatura tradicional.

Propiedades de los prenil fosfatos. Una de las características distintivas es su estabilidad frente a tratamientos alcalino suaves, lo que posibilita su separación de los fosfolípidos con los cuales se co-extrae (Dankert y col., 1966).

La presencia o no de un doble enlace en la unidad α , es decir, la que lleva el grupo alcoholico, permite, clasificarlos en ésteres alílicos (con doble enlace) y α -saturados (sin él).

En la figura 2 aparecen en forma esquemática los dos tipos de compuestos.

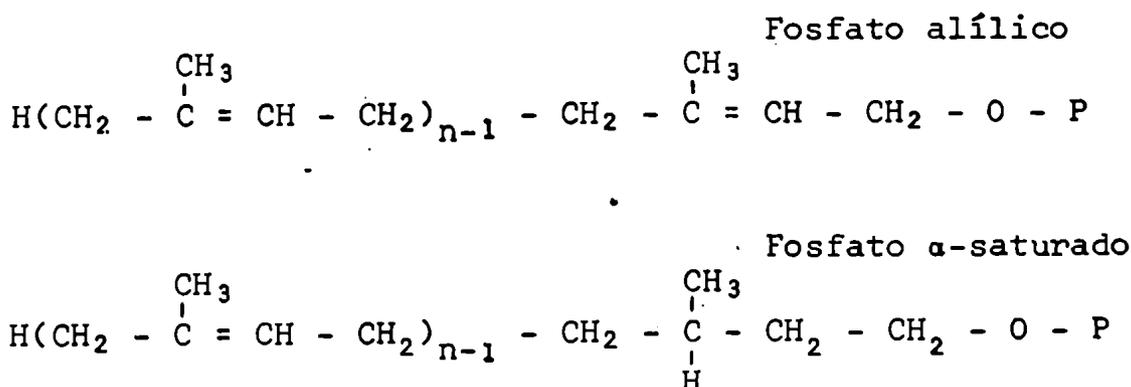


Figura 2: Esteres alílicos y α -saturados.

Como se observa ambos poseen un grupo fosfato unido a un alcohol primario, pero se diferencian por la presencia o ausencia de la doble ligadura en el carbono vecino al que lleva la función alcohólica. Esta insaturación hace que el resto fosfórico sea más lábil a ciertos reactivos (ácido suave, reducción con H_2 , fenol).

En forma general, como ya se indicó; a los derivados con una doble ligadura en la unidad α se los llama alil derivados y, por ser el éster fosfórico del dolicol el más estudiado de los derivados α -saturados, a estos se les suele llamar comunmente derivados dolicólicos.

2) Biosíntesis de poliprenoles

El conocimiento actual sobre la biogénesis de los isoprenoides nos indica que todos los átomos de carbono de la unidad isoprénica se derivan del acetato (Bonner, 1965). La forma en la cual el acetato se convierte en mevalonato se muestra en la figura 3.

El MVA es el primer metabolito específico de la cadena biosintética de los isoprenoides. El monómero básico a partir del cual los isoprenoides son polimerizados, es el isopentenil pirofosfato (IPP). El MVA es fosforilado por la MVA quinasa con ATP como dador de fosfato. En un segundo paso el MVA-P es nuevamente fosforilado para originar MVA-P-P (pirofosforil mevalonato). El grupo carboxilo de este último compuesto es eliminado, seguidamente, como CO_2 produciéndose en forma simultánea la pérdida de H_2O entre los carbonos 2 y 3. De esta forma se sintetiza Δ^3 -isopentenil pirofosfato. Estos pasos se esquematizan en la figura 4.

La unión de los monómeros C_5 -PP para formar terpenos, sesquiterpenos e isoprenoides mayores se realiza por adición de una molécula de IPP a un residuo DMAPP (sea a esta misma molécula o a una cadena en crecimiento con terminación pirofosforil alílica). En cada condensación (catalizada por la enzima prenil-transferasa) se pierde un grupo pirofosfato del prenil fosfato alílico y se reordena la

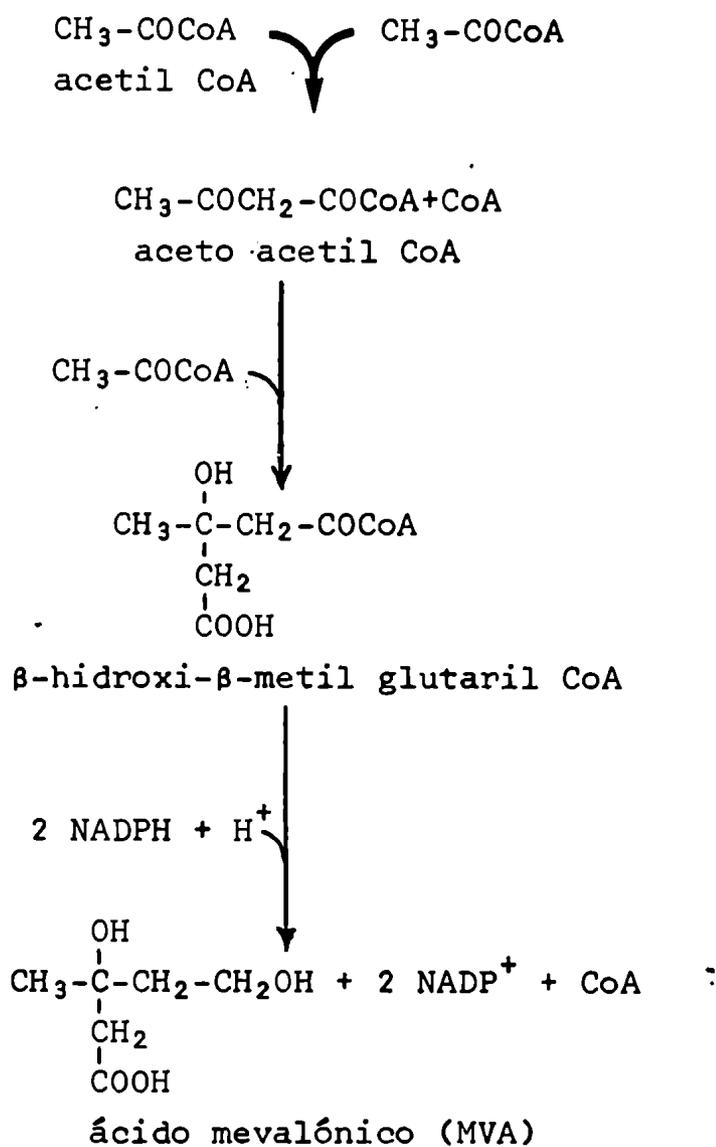
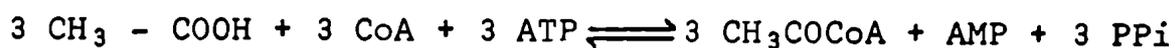


FIGURA 3: Formación de ácido mevalónico a partir de ácido acético.

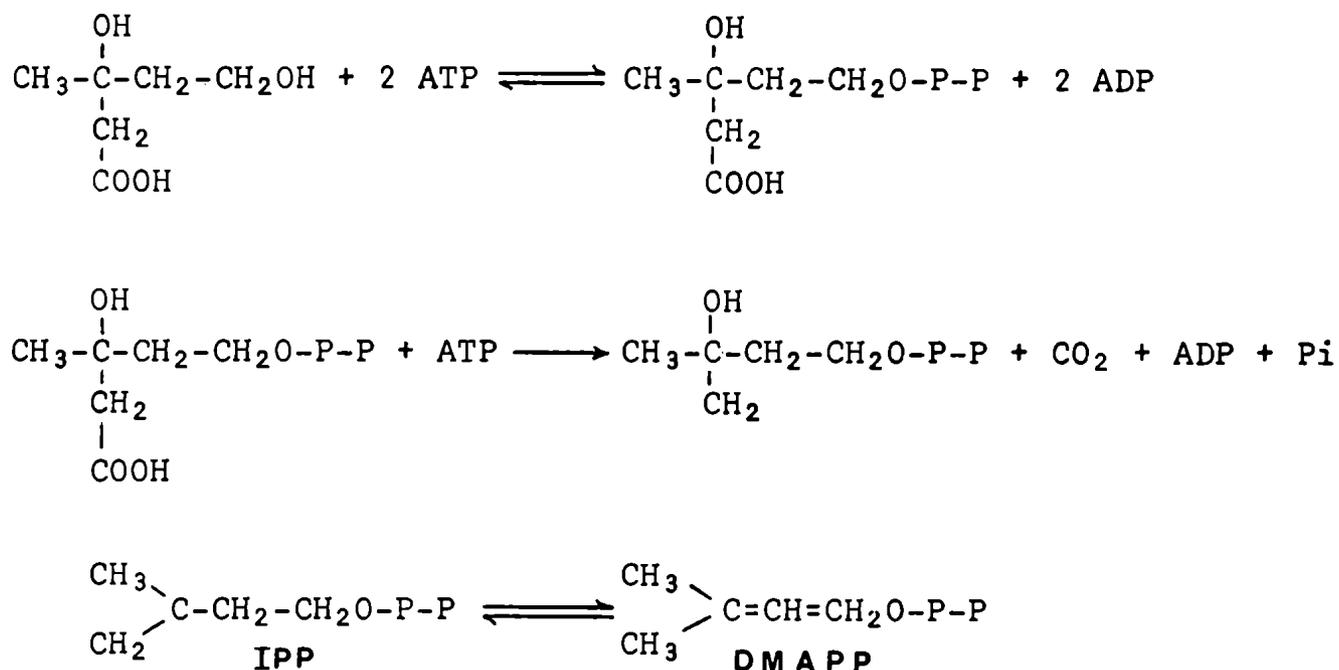


FIGURA 4: Formación de isopentenil pirofosfato (IPP) de mevalonato y su isomerización a dimetilalil pirofosfato (DMAPP).

molécula por traslado de la doble ligadura del IPP agregado, de manera de originar un nuevo prenilfosfato alílico.

La figura 5 muestra el mecanismo de crecimiento propuesto para los poliprenoles. En cada condensación se pueden obtener dos posibles isómeros de configuración cis o trans. Está generalmente aceptado un concepto según el cual la enzima preniltransferasa da origen a un solo tipo de isómeros. Dado que los poliprenoles de cadena larga tienen dobles ligaduras tanto en cis como en trans, debe considerarse la existencia de por lo menos dos preniltransferasas en la biosíntesis de los mismos.

Poco se conoce de la síntesis de poliprenoles "in vivo". La dificultad mayor es la conocida incapacidad del MVA de pasar a través de las membranas.

Durr y Habbal (1972) comunicaron la síntesis de undecaprenol bacteriano en preparaciones libres de células de Lactobacillus plantarum.

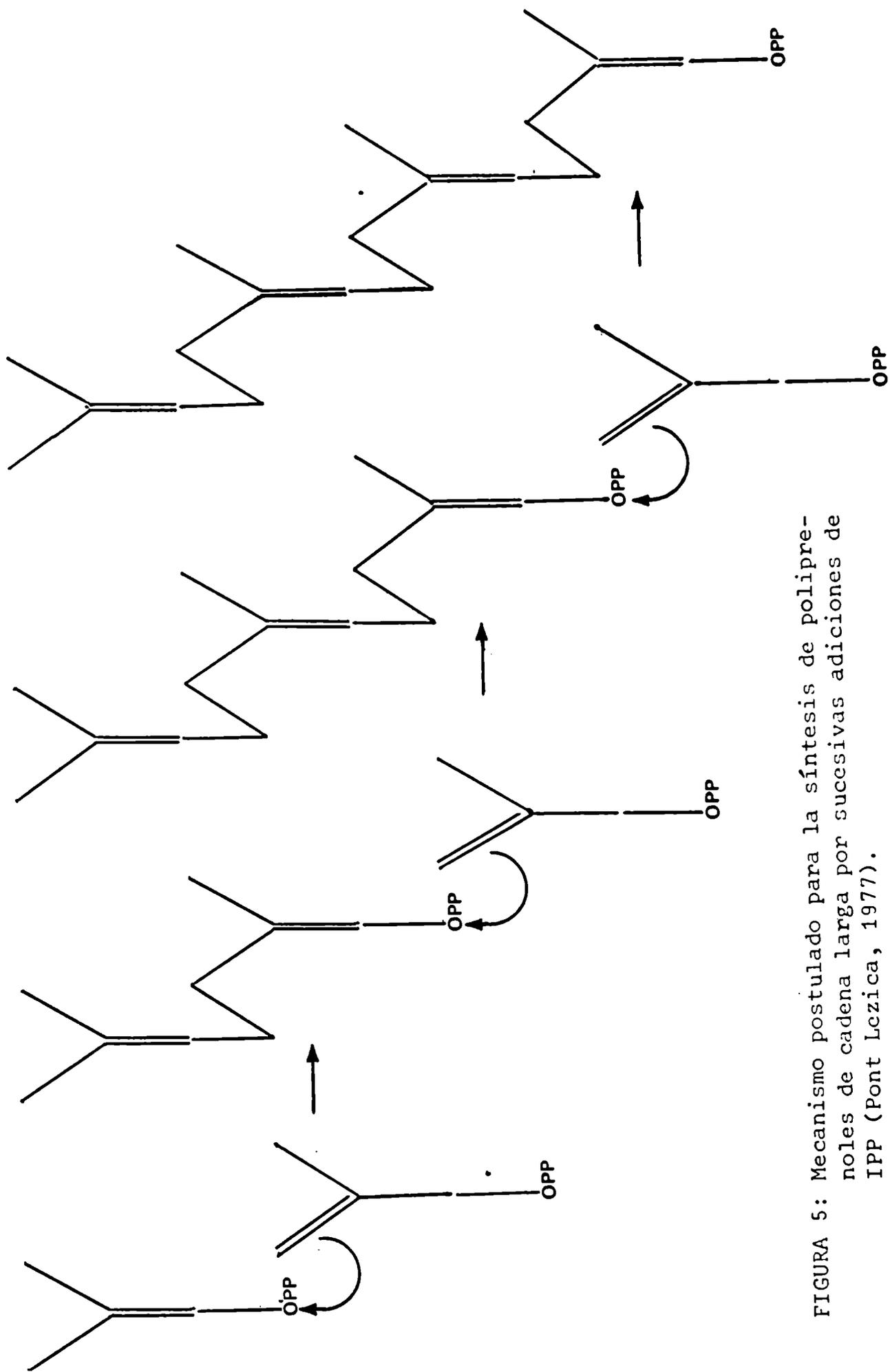


FIGURA 5: Mecanismo postulado para la síntesis de poliprenos de cadena larga por sucesivas adiciones de IPP (Pont Lezica, 1977).

rum. La misma requiere la presencia de membranas, en contraste con la síntesis de prenoles cortos (C_{15} - C_{20}) que se sintetizan con enzimas solubles. Algo similar ocurre en la síntesis de dolicol en organismos superiores que fue investigada por nuestro grupo de trabajo (Daleo y Pont Lezica, 1977; Daleo y col., 1977; Hopp y col., 1977). La gran mayoría de los prenoles cortos tienen configuración trans en todas sus unidades y son sintetizados por preniltransferasas solubles. El requerimiento de membranas puede ser explicado por la presencia en las mismas de una cis-preniltransferasa que toma las cadenas cortas sintetizadas por las enzimas solubles. Resumiendo, se postula la existencia de preniltransferasas solubles que originan prenoles cortos con configuración trans. Estos prenoles cortos (C_{15} o C_{20}) son tomados por preniltransferasas particuladas, las cuales a diferencia de las solubles confieren una configuración cis a las nuevas unidades condensadas.

La hipótesis de que estas últimas enzimas sean particuladas y no solubles se basa no solo en el requerimiento de membranas para que la síntesis tenga lugar sino también en las características hidrofóbicas que adquiere el sustrato al llegar a ese largo de cadena.

Es de notar que un esquema como el propuesto denotaría una vía común, soluble, para la síntesis de toda la familia de isoprenoides, la cual se ramifica al llegar los mismos a un largo de cadena de C_{15} - C_{20} donde pueden ser tomados ya sea por las cis-preniltransferasas particuladas mencionadas o por enzimas que unen prenoles cabeza a cabeza (en lugar de cabeza a cola) como en el caso de la biosíntesis de esteroides, carotenos y xantofilas.

3) Localización subcelular

La gran mayoría de los poliprenoles hallados en tejidos animales, en los Aspergilli y en las plantas superiores se presentan esterificados con ácidos grasos de cadena larga. Esto los hace tan hidro-

fóbicos que es dudoso que puedan cumplir un papel distinto al estructural. Tanto en hígado porcino como en Aspergillus fumigatus se concentran en la fracción nuclear de la célula, a diferencia de los poliprenoles libres que fueron hallados en mayor proporción en la fracción mitocondrial (Butterworth, 1964; Wellburn y Hemming, 1966). La forma activa de los lípidos intermedios, es decir fosforilada (Dol-P) tiene un nivel de concentración extremadamente bajo. Debido a ello la mayoría de los métodos utilizados hasta ahora para su determinación son muy indirectos y discutibles. Dallner y col. (1972) estimaron la concentración de Dol-P comparando la estimulación de síntesis de Dol-P-Glc al agregar a un sistema enzimático de síntesis, el dolicol fosfato aislado de las distintas fracciones subcelulares. Esta concentración (por mg de fosfolípidos) fue mayor en las fracciones nuclear, Golgi y retículo endoplásmico rugoso; menor en membrana plasmática y mitocondrias, e intermedia en el retículo endoplásmico liso.

Keenan y col. (1977) midieron la radioactividad en las distintas fracciones después de inyección intravenosa de dolicol tritiado exógeno en ratas. Encontraron que la marcación se localiza fundamentalmente en las mitocondrias, especialmente en la membrana externa de las mismas.

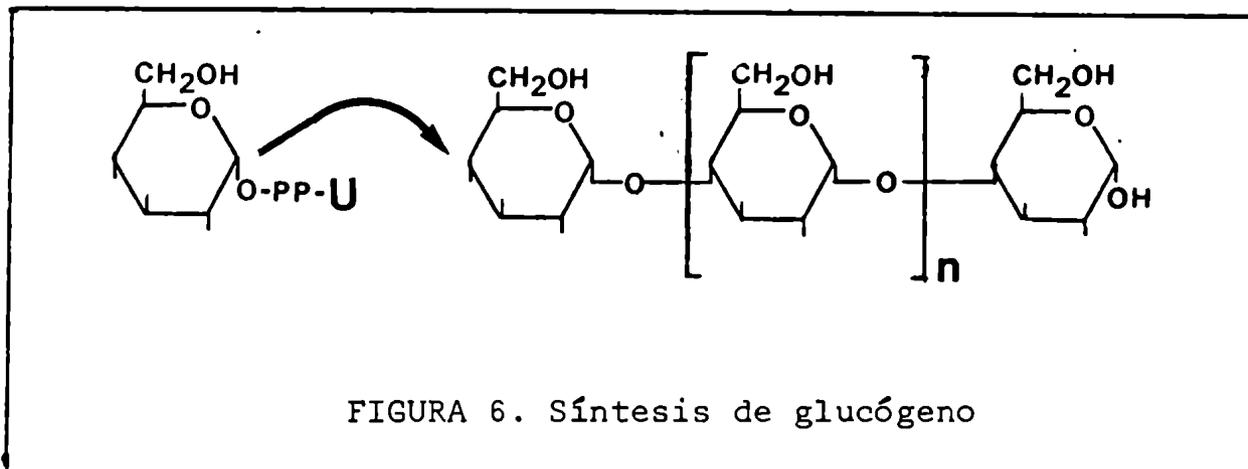
En plantas superiores solo fueron investigados los poliprenoles libres. Se notó una correlación entre el aumento en edad de la planta y el incremento de concentración de poliprenoles libres en hojas. Estos están localizados en gran parte en los glóbulos grasos osmiofílicos del interior de los cloroplastos (Wellburn y Hemming, 1966). De los poliprenoles remanentes, parte de ellos están asociados a las lamelas de los cloroplastos y parte a la pared celular (Wellburn y Hemming, 1967). Sería de interés investigar si los poliprenil fosfatos están también presentes en estas fracciones particuladas.

En bacterias tanto el undecaprenol, como su derivado fosforilado están unidos a membrana. Lactobacillus plantarum contiene estos compuestos tanto en la membrana plasmática como en la mesosomal (Thorne, 1972; citado por Hemming, 1974, como comunicación personal).

IV. POLIPRENIL FOSFATOS COMO "LIPIDOS INTERMEDIARIOS"

El descubrimiento de los nucleótido-azúcares por Leloir y sus colaboradores en 1950 (Caputto y col., 1950) inició una nueva era en la investigación del rol de estos compuestos activados como dadores de unidades glicosídicas en la síntesis de polisacáridos complejos y glicoproteínas.

En la síntesis del glucógeno, del almidón y de otros polisacáridos (Leloir y Cardini, 1957) un azúcar activado o nucleótido-azúcar, cede su resto glicosídico a un aceptor que por lo general es el polisacárido en crecimiento. La figura 6 ilustra el caso del glucógeno.



Quince años más tarde se dió a conocer un nuevo descubrimiento de capital importancia: para la transferencia de azúcares de los nucleótido-azúcares a sus aceptores definitivos, los glicanos de la pared celular bacteriana, eran necesarios compuestos lipofílicos conteniendo residuos glicosídicos (Anderson y col., 1965; Weiner y col., 1965; Wright y col., 1965). En contraste con los hidrofílicos nucleótido-azúcares estos derivados activados son hidrofóbicos. El azúcar está unido glicosídicamente al lípido a través de un puente fosfato o pirofosfato. Su síntesis a partir de nucleótido-azúcares y lípido-fosfatos es catalizada por enzimas asociadas a la membrana. Estos "lípidos intermedia-

rios" cuya función es "mediar" en la síntesis de algunas macromoléculas, actúan en la siguiente forma general:

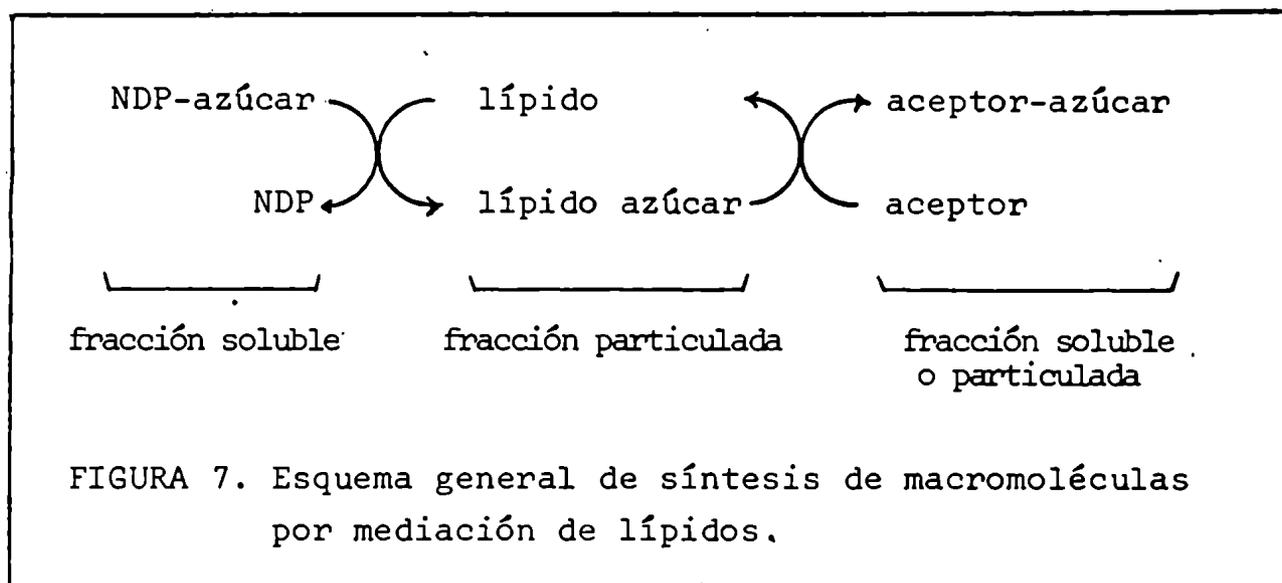


FIGURA 7. Esquema general de síntesis de macromoléculas por mediación de lípidos.

Aunque estos compuestos fueron originalmente descritos en relación con los polisacáridos complejos de las paredes bacterianas, su existencia y función se estudió pronto en otros sistemas tanto en organismos procariotas como eucariotas. Su papel es equivalente al de los nucleótido-azúcares en cuanto a que ceden su resto glicosílico a un aceptor, la diferencia consiste en que la reacción se desarrolla en un medio hidrofóbico.

1) Naturaleza del lípido glicosilado

A los pocos años de su descubrimiento, más exactamente en 1967, en forma casi simultánea en los laboratorios de Robbins (1967) y Strominger (1967) mediante espectrografía de masas, se dilucidó la estructura de los "lípidos intermediarios" involucrados en la síntesis del polisacárido O y de la mureína (pared celular bacteriana). Al analizar los espectros se comprobó que correspondían a compuestos de naturaleza prenólica y específicamente al undecaprenol.

En eucariotas fueron Behrens y Leloir (1970) los primeros en señalar la existencia de derivados poliprenólicos unidos a azúcares en hígado de rata, y postularon al dolicol como componente lipídico de los mismos.

2) Microorganismos

a) Biosíntesis de péptidoglicanos

El mecanismo de biosíntesis del péptidoglicano de la pared celular bacteriana ha sido estudiado en forma exhaustiva en Staphylococcus aureus y Micrococcus lysodeikticus. El mecanismo formulado por Strominger y sus colegas (Anderson y col., 1965; Matsushashi y col., 1965; Anderson y Strominger, 1965; Anderson y col., 1966; Anderson y col., 1967; Higashi y col., 1967; Bumsted y col., 1968; Siewert y Strominger, 1968; Strominger y col., 1972) para S. aureus está esquematizado en la figura 8. Se pueden distinguir cuatro etapas en la biosíntesis:

- 1 - Formación de un intermediario disacárido: lípido-P-P-NAcGlc-NAcMur-(pentapéptido); reacciones 1 y 2 (la reacción 1 es reversible).
- 2 - Modificación del péptido por amidación del carboxilo α del ácido D-glutámico (reacción 3) e introducción de la unidad puente pentaglicina (reacción 4).
- 3 - Transferencia del disacárido al aceptor polisacárido endógeno en formación y liberación del undecaprenil pirofosfato del péptidoglicano lineal (reacción 5). En Bacillus licheniformis la transferencia al polisacárido endógeno se hace en el extremo reductor (Ward y Perkins, 1973).
- 4 - Transpeptidación del nuevo péptido con cadenas preexistentes en la pared formando el polímero de uniones cruzadas (Ward, 1974; Ward y Perkins, 1974). El undecaprenil fosfato debe ser

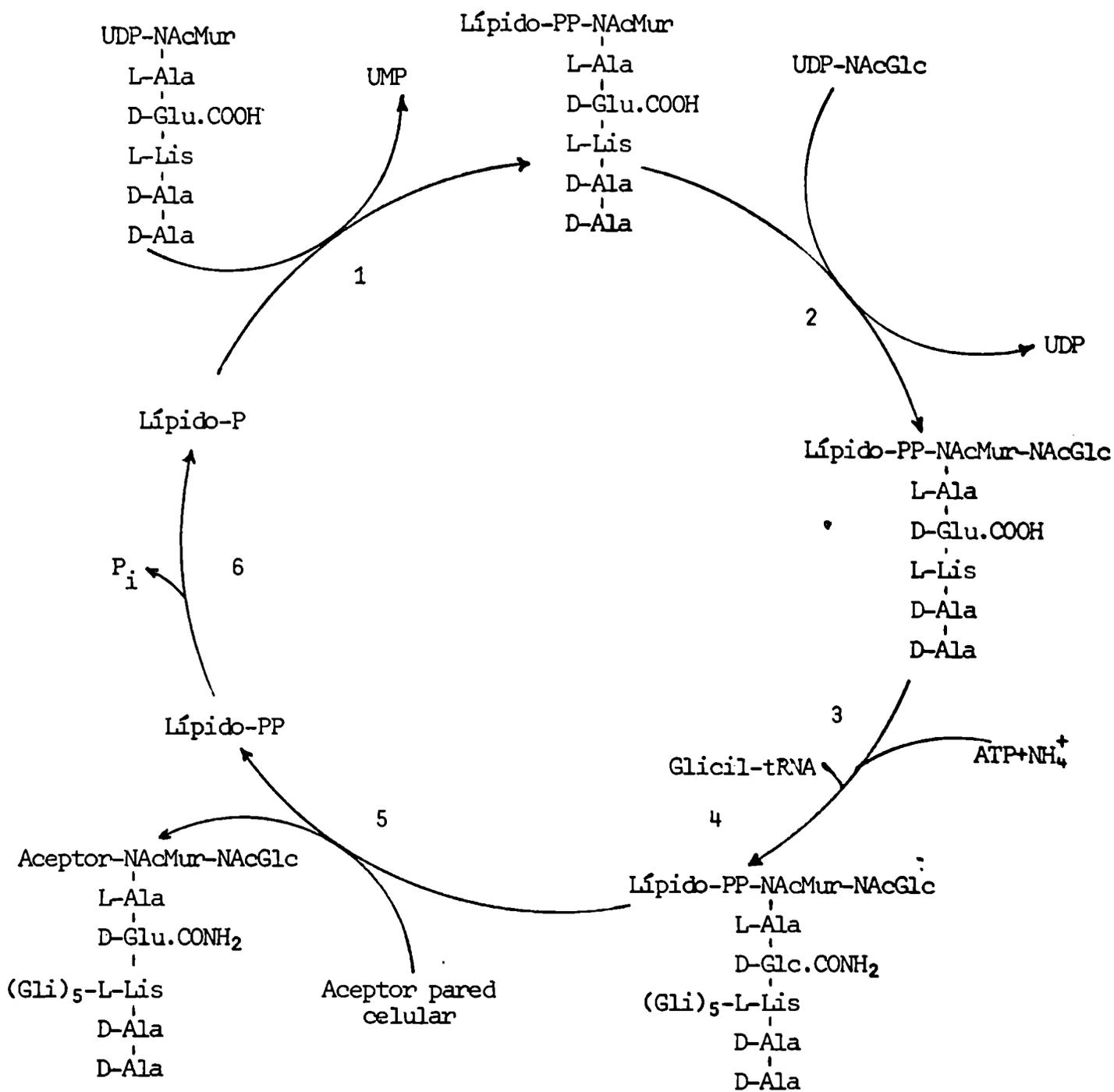


FIGURA 8. Biosíntesis del peptidoglucano de *Staphylococcus aureus* (Osborn, 1969).

regenerado enzimáticamente (reacción 6) antes de volver al ciclo como lípido aceptor.

b) Biosíntesis del antígeno O

Poco después del descubrimiento del rol de los "lípidos intermediarios" en la síntesis de peptidoglicanos, una serie de compuestos análogos fueron encontrados en la síntesis del antígeno O de Salmonella (Weiner y col., 1965; Wright y col., 1965). La cadena de antígeno O de S. typhimurium está compuesta de tetrasacáridos ramificados que forman las unidades repetitivas. El trisacárido repetitivo es manosil-ramnosil-galactosa y la abecucosa unida a la manosa forma la ramificación.

S. newington contiene el mismo trisacárido repetitivo pero las configuraciones anoméricas son distintas y no tiene azúcar ramificado. La vía metabólica corrientemente postulada (Osborn y Weiner, 1968; Kent y Osborn, 1968) para S. typhimurium se esquematiza en la figura 9. Una vía similar fue demostrada por Robbins y col. en S. newington (Wright y col., 1965; Dankert y col., 1966; Robbins y col., 1966). Se pueden distinguir tres etapas:

- 1 - Ensamblado de la unidad repetitiva del antígeno O a un intermediario lípido-oligosacárido (reacciones 1 a 4).
- 2 - Polimerización de las unidades repetitivas para formar las cadenas de polisacáridos del antígeno O estando aun unidas al lípido (reacción 5).
- 3 - Transferencia de la cadena completa del antígeno O del "lípido intermediario" a la región central del lipopolisacárido (reacción 6). La regeneración de la forma activa del "lípido intermediario" (reacción 7) completa el ciclo.

Merece destacarse que en la reacción 1 la UDP-Gal cede Gal-1-P y no Gal al prenil-P aceptor formándose el prenil-PP-Gal y que esta reacción es reversible.

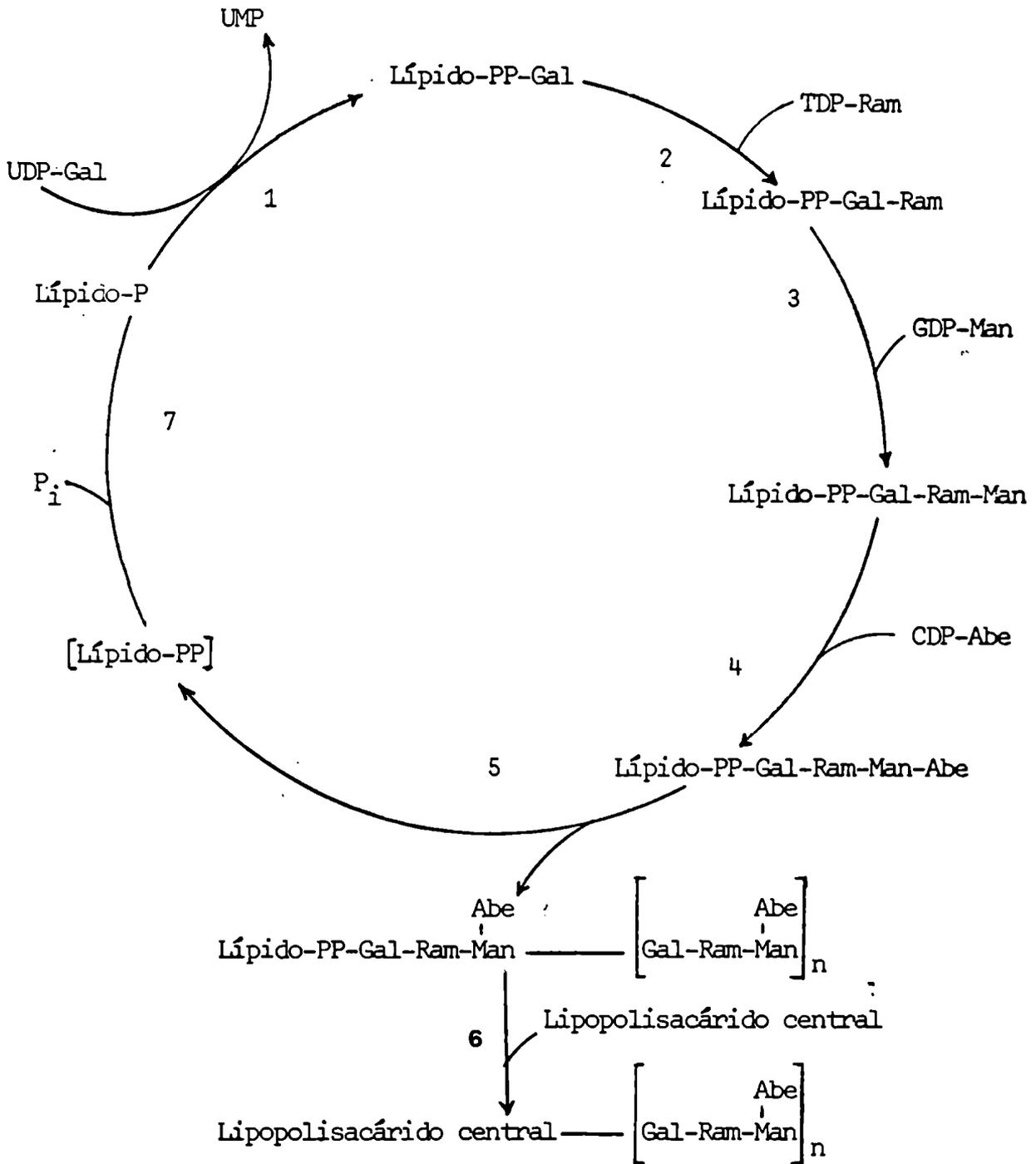


FIGURA 9. Biosíntesis del lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* (Osborn, 1969).

Las reacciones 2 y 3 siguen el esquema clásico y una vez formada la unidad repetitiva esta se polimeriza sobre el lípido dando origen al polisacárido 0. La función de los "lípidos intermedios" sería entonces no solo adaptarse a un medio hidrofóbico sino también facilitar el montaje de la unidad repetitiva como etapa previa a la polimerización.

Otra novedad del sistema consistió en que a diferencia de lo que sucede en la síntesis de otros polisacáridos el crecimiento de la cadena es por el extremo reductor (Robbins y col., 1967) tal cual se ve esquemáticamente en la figura 10. Es decir, la cadena oligosacárida creciente es transferida a una nueva unidad repetitiva a semejanza de lo que sucede en la síntesis de polipéptidos y ácidos grasos.

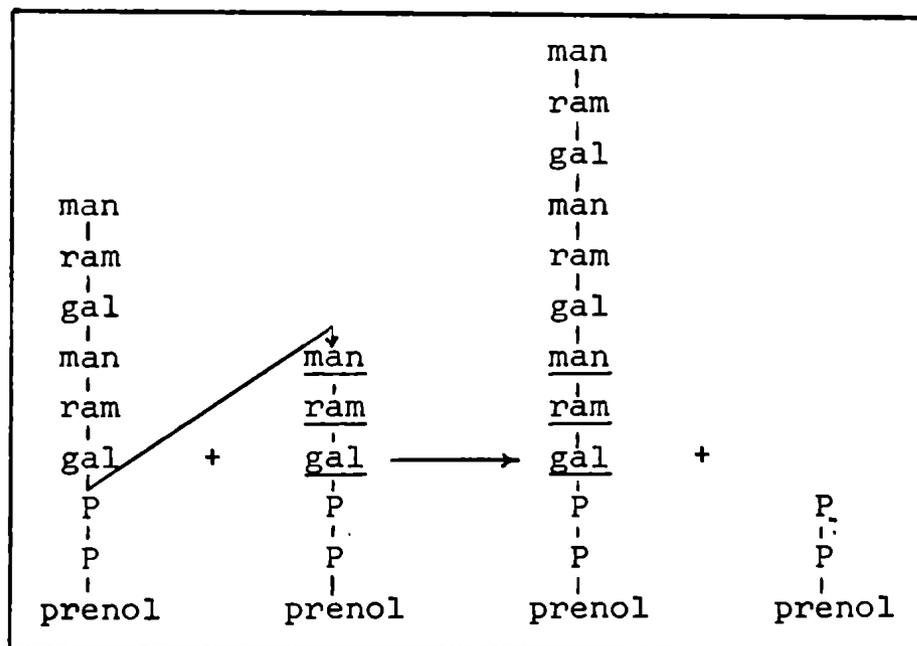


FIGURA 10. Mecanismo de polimerización del polisacárido 0 (Robbins y col., 1967).

La reacción 6 fue estudiada especialmente en la biosíntesis de la mureína o pared celular (Goldman y Strominger, 1972). Participa una fosfatasa que quita un fósforo al prenil difosfato, lo cual le permite al lípido entrar nuevamente en el ciclo. Di-

cha enzima es específicamente inhibida por la bacitracina (Siewert y Strominger, 1967; Stone y Strominger, 1971).

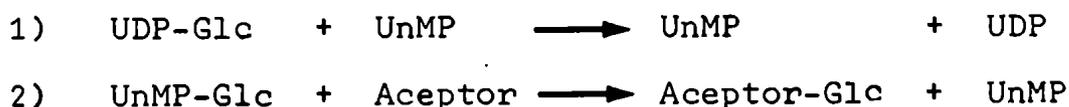
Se ha señalado la presencia de una segunda fosfatasa que lleva al prenil monofosfato a alcohol libre (Higashi y col., 1970) y de una quinasa que hace la reacción inversa, es decir, fosforila el prenil (Willoughby y col., 1972).

Esquemas análogos al presentado han sido descritos para la síntesis del polisacárido O en S. typhimurium (Weiner y col., 1965; Osborn, 1969), del peptidoglicano o pared celular (Anderson y col., 1965; Osborn, 1969; Higashi y col., 1967), y de un polisacárido en Aerobacter (Troy y col., 1975).

En algunos sistemas formados por unidades repetitivas tetraméricas, en que uno de los azúcares forma una rama lateral, tales como las unidades que intervienen en la síntesis del polisacárido O en S. typhimurium (Osborn, 1969), o en la síntesis de un polisacárido capsular en Aerobacter (Troy y col., 1975), el azúcar de la ramificación es cedido por un nucleótido-azúcar en presencia de la transferasa respectiva.

En S. typhimurium, se ha demostrado que "in vitro" la abecucosa solo se incorpora cuando el trisacárido man-ram-gal está unido al prenil pirofosfato. Una vez producida la polimerización, el polisacárido formado deja de ser sustrato para la abecucosil transferasa (Osborn y Weiner, 1968).

Existen sin embargo otros sistemas en los cuales la rama glicosídica lateral no es cedida por el nucleótido-azúcar sino por un lípido monofosfato azúcar (Wright, 1971; Nikaido y col., 1971; Nikaido y Nikaido, 1971). El caso mejor estudiado y el primero descrito es el de la síntesis del polisacárido O en S. minneapolis, en donde Wright (1971) demostró que la rama lateral de glucosa se incorpora de acuerdo a la secuencia de reacciones siguiente:



Nuevamente acá aparece un prenol fosfato, pero a diferencia de lo visto en los ciclos biosintéticos del tipo descrito para el polisacárido O, el lípido está unido al resto glicosilo por un puente monofosfato. El lípido resultó ser también undecaprenol, indistinguible con los métodos actuales del que participa en la síntesis del polisacárido O. En la reacción 2 el aceptor más probable sería un hexa o nonasacárido unido al undecaprenil difosfato (Wright, 1971).

Sistemas análogos han sido estudiados por Nikaido y col. (Nikaido y col., 1971; Nikaido y Nikaido, 1971) en S. typhimurium. Sasaki y col. (1974) confirmaron los resultados de Wright.

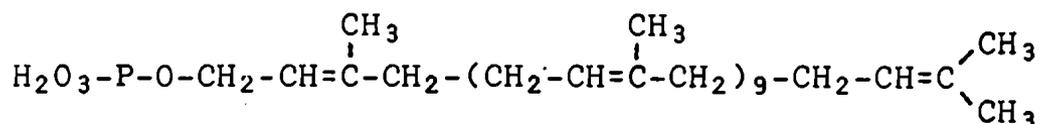
Luego de haber visto en forma somera la síntesis de 2 de las 3 partes que componen el LPS se puede decir que en ese caso la naturaleza ofrece dos soluciones diferentes al problema de, a partir de precursores hidrofílicos, sintetizar una macromolécula en un medio lipofílico como es la membrana celular. Estas dos soluciones son:

- a) Mediante un fosfolípido, la fosfatidiletanolamina, que provee el medio hidrofóbico necesario, pero no participa directamente en las reacciones que dan origen a la región central de la molécula.
- b) Mediante el undecaprenil fosfato que participa directamente en el ciclo biosintético del polisacárido O.

En este último caso existen dos tipos de unión azúcar-prenol que parecen cumplir funciones diferentes. Si el puente es difosfato, permite la formación de polímero. Si la unión es a través de un solo fosfato, se agregan azúcares al oligómero o polímero ya formado.

En general los azúcares unidos mediante el enlace difosfato dan origen a la formación de la cadena principal de la macromolécula como se vio en la biosíntesis del polisacárido O.

El lípido que participa en la síntesis del péptido-glicano y del antígeno 0 ha sido identificado por Higashi y col. (1967) y Wright y col. (1967) como un fosfomonoéster de alcohol isoprénico de C₅₅ con la siguiente fórmula:



En ambos casos la identificación se basó primariamente en la espectroscopía de masas del lípido obtenido por hidrólisis ácida suave del oligosacárido intermediario altamente purificado.

c) Biosíntesis de otros glicanos complejos

Desde el descubrimiento de intermediarios lipídicos en la síntesis de peptidoglicanos y cadena hidrocarbonada del antígeno 0, se comunicó la participación de compuestos similares en la síntesis de una gran variedad de glicanos.

1) Mananos. Un intermediario lípido-fosfodiéster-azúcar está relacionado con la síntesis de manano en Micrococcus lysodeiktus (Scher y Lennarz, 1969). El lípido aceptor fue aislado y caracterizado como undecaprenil fosfato (Lahav y col., 1969). La fracción isoprénica del intermediario parece ser idéntica a la descrita en la síntesis del peptidoglicano y del antígeno 0, pero el azúcar está unido al lípido por un puente fosfodiéster en vez del pirofosfato encontrado en los sistemas mencionados.

El undecaprenol fosfato manosa parece tener como función solamente completar la síntesis del manano endógeno de manera similar a la que el undecaprenil fosfato glucosa lo hace en las ramificaciones del antígeno 0 de Salmonella. El agregado de unidades manosa al extremo no reductor es análogo al sistema clásico de síntesis de glucógeno y almidón: por agregado de unidades glucosa a los extremos no reductores de las cadenas en crecimiento (Leloir y col., 1961); en contraste con el mecanismo de síntesis del antígeno 0.

2) Manoproteínas de levaduras. En la biosíntesis de las manoproteínas de Saccharomyces cerevisiae se encuentran involucrados lípidos intermediarios (Babiezinski y Tanner, 1973; Sharma y col., 1974; Sentandreu y Lamper, 1971; Bretthauer y col., 1973) que fueron identificados como derivados de dolicol monofosfato (Jung y Tanner, 1973). Únicamente el residuo manosa unido a la serina o treonina es transferido vía dolicol fosfato (Babiezinski y Tanner, 1975; Sharma y col., 1974). Las demás manosas que forman el oligosacárido son transferidas en forma directa de GDP-Man sin participación de poliprenil fosfatos (Lehle y Tanner, 1974). Se demostró que una cadena de considerable tamaño de manosas formando parte del polimanósido, está unida por un puente di-N-acetilquitobiosa probablemente a un residuo asparragina de la proteína (Tarentino y col., 1974). El polisacárido de la glicoproteína mostró tener dos partes: una región central de aproximadamente 15 unidades de azúcar y una región periférica externa de cadena considerablemente más larga (Nakajima y Ballou, 1974). Es posible que un Dol-P-P-oligosacárido conteniendo di-N-acetilquitobiosil-(Man)_n tenga participación en la formación de la región central, o por lo menos parte de ella (Lehle y Tanner, 1975).

3) Polisacáridos capsulares. El polisacárido capsular de Aerobacter aerogenes está compuesto por un trisacárido repetitivo galactosil-manosil-galactosa, con una ramificación de un residuo de ácido glucurónico en cada unidad de manosa. La participación de lípidos intermediarios fue demostrada en este sistema por Troy y col. (1971). El lípido aceptor fue caracterizado por espectrometría de masa como undecaprenil fosfato. La primera reacción, reversible, permite la formación de undecaprenil fosfato galactosa. Las unidades manosa y ácido glucourónico son subsecuentemente agregadas en forma secuencial al lípido intermediario galactosa. Luego de formado el lípido tetrasacárido, este debe combinarse con otro lípido complejo de manera similar, resultando la formación de un intermediario octasacárido.

Finalmente, el octasacárido (resultante de dos unidades repetitivas de tetrasacárido) es transferido del lípido al aceptor para formar el producto, liberándose el lípido pirofosfato que previa pérdida de un fosfato, puede reciclarse.

4) Síntesis de manolípido micobacteriano

Preparaciones particuladas de Mycobacterium tuberculosis catalizaron la síntesis de un glicolípido identificado como decaprenil fosfato manosa (Takayama y Goldman, 1970). Si bien es conocida la estructura de este compuesto, parece estar únicamente involucrado en la biosíntesis de polimananos y no en la de dimanosil diglicéridos o de oligomanósidos unidos a mioinositol (Hemming, 1974).

5) Acidos teicoicos

El ácido teicoico constituye el polímero constitutivo de la pared celular de las bacterias Gram positivas, y tiene, en su composición N-acetil-glucosamina y glicerol unidos ambos por puentes fosfodiéster. Durante la biosíntesis de ácido teicoico en Staphylococcus lactis se detectó la presencia de lípidos intermediarios conteniendo N-acetilglucosamina y glicerol (Douglas y Baddiley, 1968; Baddiley, 1972; Hussey y Baddiley, 1972). La estructura de este lípido no está aun determinada, sin embargo los autores sugieren que se trata de poliprenol fosfato basados en la labilidad al ácido del intermediario (figura 11).

Por otra parte Friedler y Glaser (1974b) no hallaron evidencias de intervención de undecaprenil fosfato en la síntesis de polirribitol fosfato en Staphylococcus aureus. Estos autores notaron que sí existía un transportador con ácido lipoteicoico, pero que el mismo contenía glicerol fosfato glucosa y ácidos grasos en una relación 1:1:0,1:0,1, el cual funciona como aceptor en este sistema (Friedler y Glaser, 1974a).

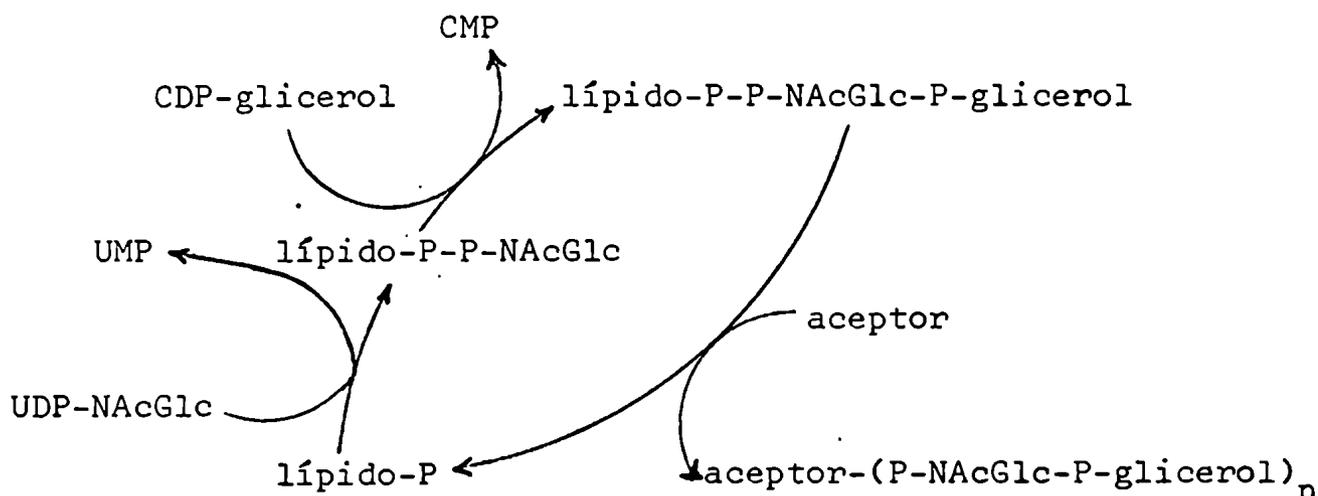


FIGURA 11. Sistema de síntesis de ácido teicoico en S. lactis según Baddiley y col.

La distribución en microorganismos de enzimas que catalizan la síntesis de derivados glicosídicos es muy amplia y día a día se comunican nuevas especies en las que se las encuentra. La tabla III resume esta distribución.

TABLA III: Sistemas en los que se han descrito lípido-fosfo-azúcares en microorganismos (Romero, 1977).

| Lípido | Fuente |
|---------------|---|
| -P-Man | <u>Micrococcus lysodeikticus</u> , <u>Mycobacterium tuberculosis</u> , <u>Mycobacterium smegmatis</u> , <u>Saccharomyces cerevisiae</u> , <u>Hansenula holstii</u> , <u>Aspergillus niger</u> |
| -P-Glc | <u>Salmonella</u> , <u>Shigella flexneri</u> , <u>Mycobacterium smegmatis</u> , <u>Bacillus licheniformis</u> , mutantes de <u>Escherichia coli</u> , <u>Saccharomyces cerevisiae</u> , <u>Tetrahymena pyriformis</u> |
| -P-Gal | <u>Acetobacter xylinum</u> |
| -P-2-deoxiGlc | <u>Saccharomyces cerevisiae</u> |
| -P-NAcNeu | <u>Escherichia coli</u> |
| -PP-Gal | <u>Salmonella newington</u> , <u>Salmonella typhimurium</u> , <u>Aerobacter aerogenes</u> |

| Lípido | Fuente |
|---|---|
| -PP-Glc | <u>Klebsiella aerogenes</u> , <u>Acetobacter xylinum</u> |
| -PP-Gli | <u>Bacillus licheniformis</u> |
| -PP-NAcGlc | <u>Staphylococcus lactis</u> , <u>Saccharomyces cerevisiae</u> |
| -PP-(NAcGlc) ₂ | <u>Saccharomyces cerevisiae</u> |
| -P ó -PP-(Man) ₂ | <u>Mycobacterium smegmatis</u> |
| -PP-(Glc) ₂ | <u>Acetobacter xylinum</u> |
| -PP-Gal-Ram | <u>Salmonella newington</u> , <u>Salmonella typhimurium</u> |
| -PP-Gal-Man | <u>Aerobacter aerogenes</u> |
| -PP-Glc-Gal | <u>Klebsiella aerogenes</u> |
| -P-Glc-P-Gli | <u>Bacillus licheniformis</u> |
| -PP-NAcGlc-P-Gli | <u>Staphylococcus lactis</u> |
| -PP-(Glc) ₃ | <u>Acetobacter xylinum</u> |
| -PP-Gal-Ram-Man | <u>Salmonella newington</u> , <u>Salmonella typhimurium</u> |
| -PP-Gal-Man-AcGlc | <u>Aerobacter aerogenes</u> |
| -PP-Gal-Ram-Man(Abe) | <u>Salmonella typhimurium</u> |
| -PP-Gal-Man-(AcGlc)Gal | <u>Aerobacter aerogenes</u> |
| -PP-Glc(Glc ₂ , Fuc ₃) | Mutante de <u>Escherichia coli</u> |
| -PP-(Gal-Ram-Man) _n | <u>Salmonella newington</u> |
| -PP-[Gal-Ram-Man(Abe)] _n | <u>Salmonella typhimurium</u> |
| -PP-[Gal-Man-(AcGlc)Gal] _n | <u>Aerobacter aerogenes</u> |
| -PP-pentapéptido-NAcMur | <u>Micrococcus</u> , <u>Staphylococcus</u> |
| -PP-pentapéptido-NAcMur-NAcGlc | <u>Micrococcus</u> , <u>Staphylococcus</u> |
| -PP-hexapéptido-NAcMur-NAcGlc | <u>Micrococcus</u> |
| -PP-decapéptido-NAcMur-NAcGlc | <u>Staphylococcus</u> |
| -PP-oligosacáridos | <u>Saccharomyces cerevisiae</u> , <u>Tetrahymena piriformis</u> |

3) Sistemas animales

Se podía predecir que muy probablemente esta clase de compuestos debían tener relación en la biosíntesis de los heteropolisacáridos superficiales que forman parte del glicocálix que recubre las células animales. La primera evidencia en este sentido fue provista por el laboratorio de Leloir, 20 años después del descubrimiento de los nucleótido-azúcares.

a) Derivados monosacáridos del dolicol fosfato

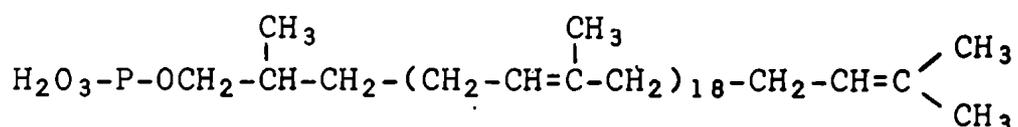
Behrens y Leloir (1970) aislaron un aceptor lipídico de hígado de cerdo y demostraron la existencia de una enzima presente en microsomas de hígado de rata que cataliza la transferencia de glucosa de UDP-Glc a este lípido. A diferencia del sistema bacteriano, que transfería galactosa-1-P para formar derivados del tipo pirofosfato, la glucosa en este caso es transferida sin fosfatos con la enzima mencionada. Por otro lado la reacción es fuertemente inhibida por UDP, como es de esperarse si éste fuese liberado como segundo producto. El lípido glucosilado es, además, lábil a condiciones ácidas como lo son los lípido-azúcares bacterianos; pero en contraste a la inestabilidad de la unión lípido glucosa, el lípido aceptor en sí mismo es extremadamente estable en las mismas condiciones y resistía tanto tratamientos ácidos como alcalinos. La fracción lipídica fue tentativamente identificada como dolicol y esta afirmación confirmada luego por otros autores.

El dolicol fue descubierto por primera vez en tejidos de mamíferos por Burgos y col. (1963). Está compuesto por una serie de poliprenoles que varía en su largo de cadena entre C₉₀ y C₁₀₅, siendo, por lo tanto, los compuestos alifáticos de mayor peso molecular encontrados en la naturaleza.

Difieren de los poliprenoles bacterianos (C₅₀ a C₆₀) no solo en el largo de su cadena, sino también porque su extremo isoprénico

inicial, que lleva el grupo hidroxilo, está saturado. En consecuencia la unión del fosfato al dolicol es estable, mientras que el enlace del fosfato al undecaprenol, ficaprenol y otros alcoholes alílicos es lábil en condiciones ácidas suaves.

La estructura del dolicol fosfato es:



A posteriori del descubrimiento del Dol-P-Glc se demostró la síntesis enzimática de un enorme número de azúcares unidos a dolicol. Estos incluyen el Dol-P-Man (Behrens y col., 1971a; Richards y col., 1971), el Dol-P-Xil (Waechter y col., 1974), el Dol-P-P-NAcGlc-NAcGlc (Leloir y col., 1973) y el Dol-P-P-NAcGlc (Molnar y col., 1971; Ghalamber y Jeanloz, 1974).

La distribución de enzimas que catalizan la síntesis de derivados de poliprenil fosfatos en muy variados tejidos animales se ejemplifica en la tabla IV.

En algunos casos el lípido-azúcar, enzimáticamente sintetizado se caracterizó solo parcialmente. Frecuentemente para denominar derivado de dolicol a un compuesto los autores se basan en sus propiedades cromatográficas y en la capacidad de estimular la síntesis de glicolípidos a partir del agregado de dolicol exógeno al sistema enzimático.

Mayores evidencias fueron aportadas por Richards y Hemming (1972) al sintetizar Dol-P-Man a partir de (^3H)Dol-P y GDP-(^{14}C)-Man. La estructura del Dol-P-Man fue analizada, además, por métodos químicos y físicos (Baynes y col., 1973; Evans y Hemming, 1973) y su síntesis química obtenida por Warren y Jeanloz (1973).

TABLA IV: Lípido-azúcares descritos en tejidos animales
(Romero, 1977).

| Azúcar unido a dolicol | Distribución |
|---------------------------|---|
| -P-Man | Aves: oviducto de gallina; retina, hígado y cerebro de embrión de pollo. Insectos Mamíferos: hígados de conejo, rata, cobayo, cerdo, vaca y hamster; cerebros de rata, ratón, ternero; aortas porcina y bovina; tiroides bovina; mieloma de páncreas de ternero; linfocitos humanos; parótida de rata; médula adrenal bovina; células normales y transformadas (fibroblastos de ratón). |
| -P-Glc | Aves: oviducto de gallina, cerebro de embrión de pollo. Insectos Mamíferos: hígado de rata, linfocitos humanos, cerebro de rata. |
| -P-Gal | Hígado de vaca. |
| -P-Xil | Oviducto de gallina. |
| -PP-NAcGlc | Hígados de conejo, rata, cerdo y vaca; aortas bovina y porcina; páncreas de ternero. Insectos. |
| -PP-(NAcGlc) ₂ | Aves: oviducto de gallina. Mamíferos: hígados de rata, cerdo, vaca; aortas bovina y porcina; páncreas de ternero. |
| -PP-NAcMan | Hígados porcino y murino. |
| -PP-oligosacárido | Aves: oviducto de gallina; células de oviducto. Mamíferos: hígados de rata, cerdo y vaca; cerebro de rata y ternero; aorta bovina y porcina; células de aorta de ternero; riñón de rata; parótida de rata; mieloma de ratón; médula adrenal bovina; tiroides de cerdo; linfocitos humanos. |

b) Derivados oligosacáridos de dolicol fosfato

El primer trabajo de Behrens y Leloir (1970) en el tema, sugirió al Dol-P-Glc en un rol de intermediario en la síntesis de proteínas que contienen glucosa. Estudios subsiguientes revelaron la formación de un oligosacárido conteniendo glucosa unida a lípido (Behrens y col., 1971b; Parodi y col., 1972a). El lípido oligosacárido mostró tener aproximadamente 18 hexosas unidas por un fosfato o un pirofosfato al dolicol. Además de glucosilos el oligosacárido probablemente contiene unidades N-acetilglucosamina (Parodi y col., 1973). El lípido oligosacárido enzimáticamente sintetizado fue capaz de mostrar transferencia de la cadena de azúcares a aceptores microsómicos endógenos que, por varios criterios, demostraron ser proteínas (Parodi y col., 1972b).

Richards y Hemming (1972) utilizando hígado porcino, Baynes y col. (1973) mieloma de ratón y Waechter y col. (1973) con oviducto de gallina, demostraron que el Dol-P-Man aislado actúa como dador de manosa en la formación de proteínas que contienen ese azúcar. Los resultados prueban además que el mismo es un intermediario obligatorio en el proceso. Todo esto sugiere que un lípido oligosacárido se forma a partir de Dol-P-Man y que el mismo transfiere la cadena de azúcares a proteínas endógenas. Behrens y col. (1973) obtuvieron finalmente pruebas directas de la participación de lípidos oligosacáridos en la síntesis de glicoproteínas en hígado. El oligosacárido contiene no solo manosa sino también N-acetilglucosamina, en una relación molar de 5:2 (Hsu y col., 1974). Se propuso la siguiente estructura para el lípido oligosacárido:



La síntesis de este intermediario fue objeto de muchos estudios y un esquema resumiendo los mismos se presenta en la figura 12.

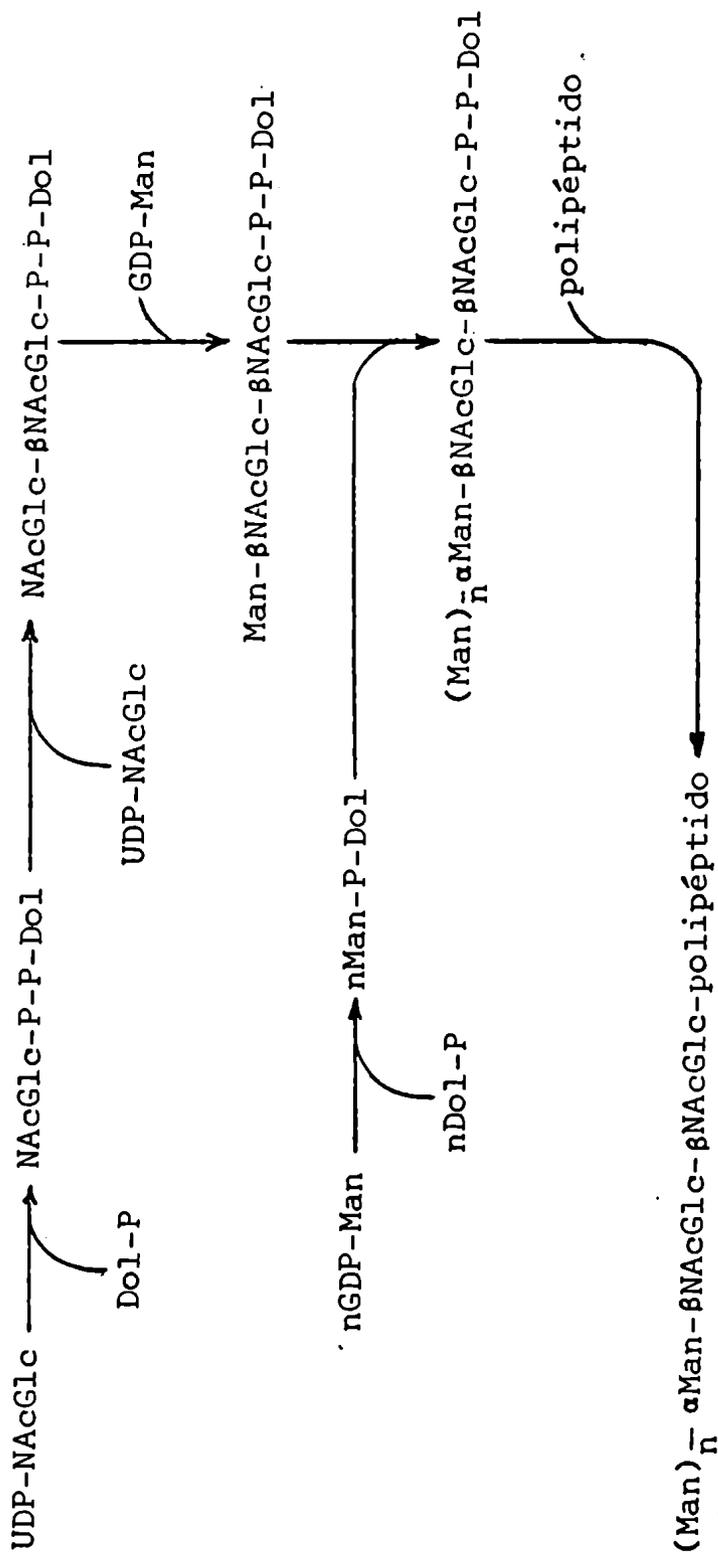


FIGURA 12. Esquema postulado para la participación de intermediarios lipídicos en la síntesis de glicoproteínas basada en estudios hechos en membranas de hígado, mieloma, oviducto y linfocitos (Chen y col., 1975).

Una gran variedad de lípido-oligosacáridos fue sintetizada en preparaciones libres de células de distintos orígenes y se resumen en la tabla V.

TABLA V: Lípido-oligosacáridos formados por preparaciones particuladas de varios tejidos.

| Componentes glicosídicos | Número de unidades glucosídicas | Tejido |
|--|---------------------------------|--|
| Glucosa, hexosamina | 20 | Hígado de rata |
| Glucosa | 20 | Cerebro de rata, linfocitos humanos y tiroides de cerdo |
| Manosa (5), N-acetil-glucosamina (2) * | 7 | Mieloma |
| Manosa (5-7), N-acetil-glucosamina (2) | 7-9 | Oviducto de gallina |
| Manosa, N-acetil-glucosamina | 3-16 | Hígado de rata |
| Manosa | - | Médula adrenal bovina, parótida de rata y cerebro de ternero |
| Manosa, N-acetil-glucosamina | 5-15 ** | Aorta bovina |
| Xilosa | 7-9 | Oviducto de gallina |

* Los valores entre paréntesis indican el número estimado de restos glicosídicos.

** Oligosacáridos múltiples, presumiblemente diferentes en largos de cadena, con pesos moleculares estimados entre 1000 a 3000 (Waechter y Lennarz, 1976).

c) Naturaleza de las proteínas glicosiladas

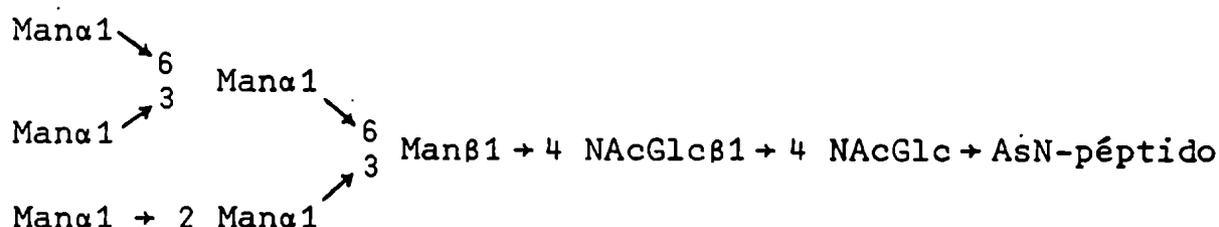
Si bien existen considerables evidencias respecto a la síntesis de glicoproteínas vía lípidos intermediarios, no se sabe tanto acerca de la naturaleza y número de proteínas glicosiladas. Se propuso

(Behrens y col., 1973) que el lípido oligosacárido es precursor de toda una clase de glicoproteínas conteniendo una región oligosacárida central común.

La mayoría de las glicoproteínas con esta estructura son del tipo soluble o secretorias (Tarentino y col., 1970; Tarentino y col., 1972; Lee y Scoocca, 1972; Kawaski y col., 1974; Baenziger y Kornfeld, 1974). La reciente comunicación de Struck y Lennarz (1977) confirma esta suposición en el caso de la ovoalbúmina.

La principal glicoproteína que se forma en las células del oviducto de gallina: la ovoalbúmina, está constituida por una única cadena de aminoácidos unida a un oligosacárido mediante un puente N-glucósido a un residuo asparragina. La estructura del oligosacárido más frecuente es la siguiente:

FIGURA 13. Estructura de la ovoalbúmina (Tai y col., 1975).



Su similitud con la composición del oligosacárido unido a dolicol descrito en la sección anterior salta a la vista.

Struck y Lennarz (1977) mediante el uso de tunicamicina, antibiótico que inhibe en forma específica la síntesis de Dol-PP-NAcGlc a partir de UDP-NAcGlc y Dol-P, demostraron que este compuesto y por ende el lípido oligosacárido es un intermediario en la glicosilación de ovoalbúmina. El agregado del antibiótico implicó la formación de ovoalbúmina carente de azúcar alguno.

Keiley y col. (1976) comunicaron la realización de experimentos in vivo que permiten obtener una forma glicosilada de ovoalbúmina

(conteniendo tanto NAcGlc como Man) cuyo extremo carboxílico de la cadena polipeptídica está unido a RNA de transferencia. De todo esto se deduce que la glicosilación de esta proteína ocurre tempranamente, incluso antes de que la porción peptídica termine de formarse. Se ha sugerido (Heath y col., 1974; Levy y col., 1974; Lennarz, 1975) que el oligosacárido unido a lípido tiene una composición idéntica a la de muchas cadenas centrales de glicoproteínas además de la ovoalbúmina (Tarentino y col., 1970; Sukeno y col., 1971; Tarentino y col., 1972; Tarentino y col., 1973) lo cual apoya la hipótesis mencionada de Behrens.

También fue sugerido (Lucas y col., 1975) que los mismos intervienen en la síntesis de glicoproteínas integrales de membrana. Las glicoproteínas que contienen manosa, sintetizadas por enzimas particuladas de oviducto (Lucas y col., 1975), mieloma murino (Hsu y col., 1974) e hígado de rata (Behrens y col., 1975) parecen corresponder a esta clase.

Utilizando GDP-(^{14}C)Man y membranas de oviducto, Pless y Lennarz (1975) demostraron la incorporación de marca a por lo menos 6 polipéptidos distintos, distinguibles por electroforesis en gel de poli-acrilamida. La mayor parte de la radioactividad incorporada apareció asociada a membranas. Resultados similares se obtuvieron utilizando el lípido oligosacárido radioactivo como sustrato. Un esquema teórico de la forma en que actúan los lípidos intermediarios en la síntesis de glicoproteínas de membrana se muestra en la figura 14.

En este contexto de glucosilación de proteínas integrales de membrana debe mencionarse la hipótesis de Roseman (1974) según la cual se produce una trans glicosilación entre células adyacentes durante el proceso de reconocimiento y diferenciación celular. Esta hipótesis sostiene que una enzima en la superficie de una célula cataliza la glicosilación de una proteína en la superficie de otra célula. Sin embargo, no se aclara como el necesario nucleótido-azúcar atraviesa la barrera de permeabilidad de la membrana celular para pasar al espacio extracelular. Sin embargo, si el esquema postulado en la

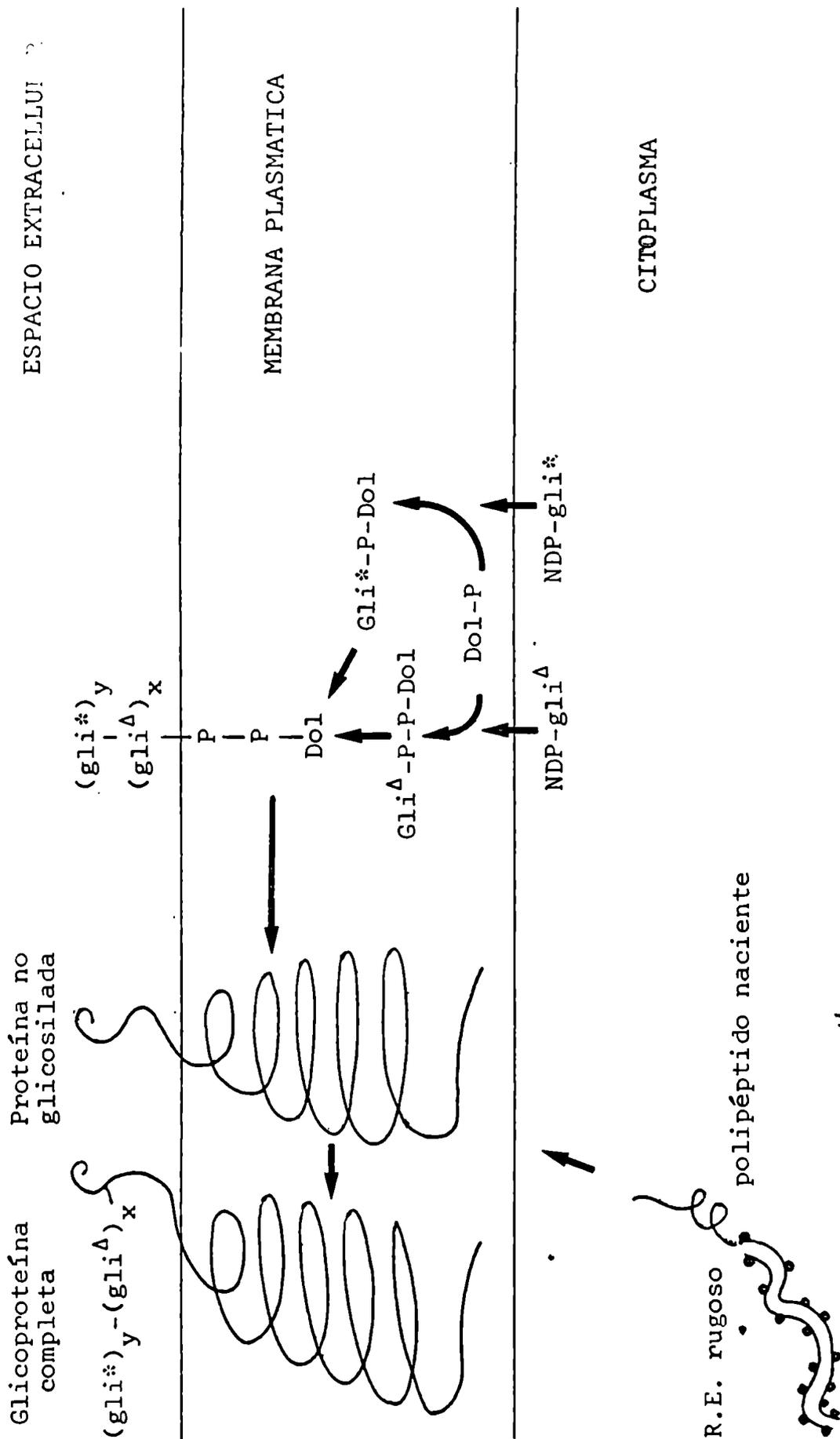


FIGURA 14. Un modelo hipotético para la glicosilación de proteínas integrales de membrana a través de lípidos intermediarios. Gli^Δ y Gli* representan dos residuos glicosídicos distintos (Lennarz, 1975).

figura 14 es correcto, el problema se resuelve debido a que el azúcar activado que debe atravesar la membrana lo hace unido a un lípido y puede fácilmente trasladarse a la superficie exterior de la membrana. El azúcar activado (u oligosacárido activado) puede ser utilizado como substrato tanto en una trans glicosilación de una célula vecina como en una cis glicosilación en la misma célula. Debe aclararse, sin embargo, que los recientes hallazgos de lípido-azúcares unidos a membrana no proveen evidencias directas a favor o en contra de la teoría de Roseman. Simplemente dan a conocer una posible explicación a un aspecto de la hipótesis que no fue convenientemente detallado.

4) Sistemas vegetales

El descubrimiento de lípidos intermediarios en la síntesis de polisacáridos no se confinó a bacterias y animales. Los poliisoprenoles están presentes en las plantas en gran variedad (Wellburn y Hemming, 1966a,b) y poseen funciones análogas a las de los otros sistemas mencionados.

a) Phaseolus aureus

Kauss (1969) observó la transferencia enzimática de GDP-(^{14}C)-Man a un lípido radioactivo, derivado de (^3H)MVA, en preparaciones particuladas de epicotilos de P. aureus. En el mismo sistema se forma a su vez un manano radioactivo. La reversibilidad de la reacción fue demostrada por adición de GDP, el cual inhibe la formación de glicolípido. Además, el agregado de (^{14}C)GDP a una mezcla de incubación que contenía lípido aceptor endógeno y GDP-Man no radioactiva, resultó en la formación de GDP-Man marcada. En forma consecuente cuando se incubó lípido-(^{14}C)Man con la enzima y GDP, se recuperó GDP-Man radioactiva. Esto demuestra que la síntesis de lípido manosa a partir de GDP-Man es una reacción de tipo reversible, y que el potencial de transferencia del grupo en ambas sustancias debe ser

del mismo orden de magnitud. Experimentos de incorporación en el tiempo en la síntesis de glicolípido y manano son consistentes con la posibilidad de que el lípido sea un intermediario en la biosíntesis del manano. Sin embargo, solo una mínima incorporación de manosa a partir del manolípido al polisacárido fue detectada. La función del lípido como intermediario, tanto como su estructura debe aun ser establecida en forma concluyente.

Evidencias preliminares sobre la función del manolípido como intermediario en la transferencia de manosa de GDP-Man a polisacáridos fueron provistas por Villemez y Clark (1969). Ellos encontraron un intermediario que puede ser extraído con fenol del precipitado con TCA, conteniendo tanto intermediario como polímero. Además se observó bajo nivel de incorporación en el polisacárido de radioactividad asociada al intermediario purificado en presencia de enzima.

Estudios de cinética y dilución isotópica dieron más apoyo a la teoría de lípidos intermediarios. Más adelante, Villemez (1970) encontró que por otras técnicas de extracción se obtenía la formación de un manolípido y una glicoproteína en P. aureus. El manolípido es lábil a condiciones ácidas suaves, liberando manosa como único azúcar. Dado que condiciones aún más suaves producen manosa-1-P, se concluyó que el azúcar está unido al lípido por un puente fosfato. Estas propiedades como así también su comportamiento cromatográfico sugieren la presencia de un derivado poliprenil fosfórico.

Utilizando el mismo sistema enzimático, Alam y col. (1971) demostraron que adiciones de dolicol fosfato o betulaprenol fosfato exógenos causan una estimulación en la incorporación de manosa de GDP-Man a lípidos. Esto apoya la suposición de que el manolípido es de naturaleza poliprenólica (Alam y Hemming, 1971).

El agregado de distintos poliprenil fosfatos al sistema de P. aureus mostró que sólo Dol-P y betulaprenol fosfato estimulan la transferencia de manosa. En cambio los fosfatos de solanesol, ficaprenol y farnesol fallan como aceptores de manosa (Alam y Hemming, 1973). Sorprendentemente ni el tamaño molecular del poliprenol ni

la saturación del residuo α fueron críticos en cuanto a su función aceptora en este sistema.

La falta de estimulación en la incorporación de manosa al polímero insoluble por todos los poliprenil fosfatos ensayados, hizo dudar del papel de los mismos como intermediarios en la síntesis de polímeros (Alam y Hemming, 1973), aunque la naturaleza manoproteica del polímero formado por este sistema fue confirmada. Roberts y Pollard (1975) comunicaron la incorporación de (^{14}C)glucosamina a glicoproteínas de membrana mediante preparaciones particuladas de hipocotilos de P. aureus.

También se formaron glucolípidos radiactivos en este sistema, pero no fue hecha una caracterización más detallada de los mismos, ni se estudió la posibilidad de que los mismos fueran intermediarios en la síntesis de proteínas conteniendo glucosamina.

En un trabajo reciente Lehle y col. (1976) estudiaron la incorporación de azúcares de GDP-Man y UDP-NAcGlc a lípidos. Comunicaron la biosíntesis de lípidos unidos a manosa, N-acetilglucosamina y di-N-acetilquitobiosa. El derivado manosídico está unido al lípido por un puente fosfato y los otros por puentes pirofosfato. Ciertas propiedades cromatográficas de los glicolípidos sugieren que la porción lipídica sería dolicol. También se presentaron algunas evidencias indicando que un producto insoluble, probablemente una glicoproteína, sería el aceptor final de los azúcares. El conocimiento actual del sistema de P. aureus lleva a pensar que poliprenil fosfatos (probablemente dolicol fosfato) actúan como lípidos intermediarios en la formación de manoproteínas.

b) Fibras de algodón

Forsee y Elbein (1972, 1973) demostraron que cuando preparaciones de membrana de fibras de algodón son incubadas con GDP-(^{14}C)Man se forma un lípido ácido que contiene manosa. Se consideró que el lípido es un poliprenil fosfato en base a las siguientes evidencias:

- 1) La enzima particulada extraída con acetona requiere un fosfolípido para transferir manosa de GDP-Man a lípidos. El lípido activo aislado que presumiblemente actúa como aceptor tiene un R_f similar al Fic-P en CCD.
- 2) El Fic-P puede substituir al lípido de algodón como activador y presumiblemente sea el aceptor de manosa en este sistema enzimático. El producto formado en esta reacción es idéntico al manolípido formado por lípido aceptor endógeno siguiendo criterios cromatográficos.
- 3) El manolípido de algodón puede servir como substrato en una preparación de Mycobacterium smegmatis para formar GDP-Man a partir de GDP.

La formación de lípidos oligosacáridos fue comunicada por los mismos autores (Forsee y Elbein, 1975). Estos oligosacáridos contienen 3 a 10 unidades glicosídicas llevando NAcGlc en el extremo reductor. También se forman en este sistema glicoproteínas que contienen manosa y N-acetilglucosamina. Evidencias indirectas sugieren que los lípido-oligosacáridos son precursores en la glicosilación de estas proteínas.

c) Pisum sativum

Pont Lezica y col. (1975) aportan la primera evidencia concluyente de la naturaleza poliprenólica del aceptor lipídico en plantas y de su similitud al dolicol de hígado. El aceptor lipídico resultó ser resistente a condiciones ácidas suaves, mientras que el derivado glucosilado se mostró estable a tratamiento fenólico e hidrogenación catalítica, propiedades que indican la presencia de un residuo isoprenico inicial saturado. Por otro lado, el mismo compuesto mostró tener propiedades cromatográficas similares al Dol-P-Glc. El largo de cadena fue confirmado por biosíntesis a partir de IPP (Daleo y Pont Lezica, 1977).

El sistema de arvejas mostró tener especificidad de sustrato hacia la UDP-Glc. A partir del mismo se demostró la síntesis de

lípidos-P- β -glucosa (Pont Lezica y col., 1975), lípidos-P-P- α -glucosa (Romero y Pont Lezica, 1977), lípidos-P-P-(glucosa)₂ y un lípido oligosacárido soluble en cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3) (Pont Lezica, 1977). En función de encontrar el aceptor definitivo en este sistema se hicieron incubaciones con agregado de Dol-P-(¹⁴C)Glc. La radioactividad fue asociada a proteínas de membrana y resultados preliminares indican que se trataría de lectinas.

d) Síntesis de glicoproteínas en plantas

Ericson y Delmer (1977) comunicaron la incorporación de manosa y N-acetil-D-glucosamina a partir de GDP-Man y UDP-NAcGlc a glicolípidos que fueron caracterizados como poliprenil fosfato azúcares, y a glicoproteínas en semillas de poroto. En base a experimentos cinéticos alternando pulsos de nucleótido-azúcares no radioactivos y radioactivos, demostraron una relación de tipo precursor-producto entre los glicolípidos y glicoproteínas, siendo la primera demostración de la participación de poliprenoles en la síntesis de glicoproteínas en plantas. Las proteínas aceptoras fueron caracterizadas como particuladas y todo hace presuponer que el sistema es el mismo que el encontrado en tejidos animales.

La particularidad de las semillas de Phaseolus vulgaris es que producen una gran cantidad de vicilina (principal glicoproteína de reserva en esta planta) en un tiempo específico, por lo que constituye un excelente sistema para el estudio de la síntesis de glicoproteínas. La vicilina tiene en su composición manosa y N-acetilglucosamina por lo que todo hace presuponer que es la proteína aceptora en el sistema descrito por las autoras, si bien esto no fue demostrado aun en forma concluyente.

5) Conclusiones generales

Si bien los lípidos intermediarios fueron descubiertos y exhaustivamente estudiados en bacterias, rápidamente el estudio de los

mismos se extendió a otros organismos (animales, plantas superiores, hongos). Sin embargo, los lípidos hallados en organismos superiores mostraron diferencias respecto de los encontrados en bacterias (de C_{55}); su cadena es más larga y el extremo α es saturado y no alílico. Esta última clase de poliprenoles fue llamada en forma genérica dolicol (del griego dolikos: largo). Prototheca zopfii, Chlorophyta unicelular, es un organismo ubicado, sistemáticamente, en un taxón considerado como predecesor evolutivo de las plantas superiores y como relativamente primitivo entre los eucariotas. En este contexto sería de gran interés, desde el punto de vista evolutivo, la caracterización de los lípidos intermedios, dado que no se han descrito en algas.

Poco se conoce, además, de la biosíntesis de estos compuestos y de la regulación de las enzimas involucradas. Debe ser enfatizado el hecho de que ciertas hormonas vegetales (giberelinas, ácido abscísico, y porciones isoprénicas de las citoquininas, todas ellas descritas también en algas) tienen también un origen isoprénico. La interacción de estos compuestos que regulan el crecimiento de la planta, y los lípidos intermediarios, presumiblemente involucrados en la síntesis del material de la pared celular, puede llegar a ser importante. Por ello el segundo objetivo de este trabajo es el estudio de la biosíntesis de estos compuestos.

Finalmente, el tercer punto de interés de este trabajo es elucidar el papel de los poliprenil fosfatos en la transferencia de azúcares a polímeros. Es evidente que la función de estos lípidos en bacterias es convertir azúcares solubles en agua en moléculas hidrofóbicas que puedan glicosilar macromoléculas en un ambiente lipofílico como es el de la membrana celular. Existen evidencias de que la glicosilación de proteínas en mamíferos se realiza en el aparato de Golgi y se comunicó recientemente la participación de lípidos intermediarios en la síntesis de glicoproteínas en animales y plantas. En el caso particular de las plantas, la presencia de polisacáridos en la pared celular sugiere la posibilidad de un mecanismo de síntesis similar al existente en bacterias.

La biosíntesis del principal polisacárido presente en las paredes celulares de las plantas, la celulosa, no está muy clara hasta el presente. Se ha postulado la participación de intermediarios lipídicos y proteicos, pero su papel no ha sido demostrado en forma fehaciente hasta la fecha. En orden de investigar los aceptores glucosídicos finales en el sistema de algas, se explora la posibilidad de que la síntesis de celulosa se realice por la vía metabólica denominada de los "lípidos intermediarios".

MATERIALES Y METODOS

I. PRODUCTOS QUIMICOS

1. Compuestos radiactivos

UDP-[U-¹⁴C]-Glc (263 Ci/mol), UDP-[³H]-Glc (2,42 Ci/mmol), UDP-[U-¹⁴C]-Gal (268 Ci/mol), UDP-[U-¹⁴C]-Ara (208 Ci/mol), UDP-[U-¹⁴C]-Xil (213 Ci/mol), UDP-[U-¹⁴C]-NAcGlc (269 Ci/mol), ADP-[U-¹⁴C]-Glc (189 Ci/mol) fueron obtenidos en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

GDP-[U-¹⁴C]-Glc (203 Ci/mol) de ICN Pharmaceuticals, Inc.

GDP-[U-¹⁴C]-Man (221 Ci/mol) de NEN (New England Nuclear).

RS-[2-¹⁴C]-MVA lactona (13 Ci/mol), RS-[2-³H]-MVA lactona (382 Ci/mol) y Δ^3 -[1-¹⁴C]-IPP (61 Ci/mol) fueron obtenidos en Amersham/Searle Corp.

Dol-P-[¹⁴C]Glc fue una donación de los doctores R. Staneloni (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar") y P.A. Romero (Fundación Bariloche).

2. Esteroles y derivados

a) Esteroles:

β -sitosterol fue un generoso obsequio del Dr. M. Dankert (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar").

Colesterol humano purificado fue ofrecido por la Lic. Cristina Brugni.

b) Preparación de las dispersiones de β -sitosterol

Las preparaciones de β -sitosterol se hicieron siguiendo la técnica de Forsee y col. (1974) con modificación en las cantidades empleadas. 10 mg de β -sitosterol y 80 mg de L- α -lecitina (alternativamente fosfatidil etanolamina purificada) se disolvieron en un pequeño volumen de cloroformo-metanol (2:1, v/v). Luego se agregaron 145 mg de Triton X-100. El cloroformo y el metanol se evaporaron a sequedad bajo N₂. Luego se agregó, gota a gota, agua mientras se agitaba vigorosamente con un Vortex.

c) Aislamiento y purificación de esteroides libres de *Prototheca zopfii*

30 g de algas frescas fueron extraídas toda una noche con 500 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v), manteniendo la suspensión en constante agitación con un agitador magnético. Se filtró el extracto clorofórmico lavándolo por el método de Folch y col. (1957). El extracto se concentró a presión reducida y se llevó a 20% de KOH en cloroformo-metanol (2:1, v/v) 1 hora a 37°C. Se agregó de HCl hasta 1 N concentración final. Se lavó 3 veces por el método de Folch para eliminar sales y ácido, y se evaporó a sequedad con presión reducida. Se resuspendió en un pequeño volumen de etanol y los esteroides fueron precipitados con digitonina al 1% en una mezcla etanol-agua (3:2) según la técnica de Doyle y col. (1971). Después de centrifugar y decantar el sobrenadante, se agregó dimetilsulfóxido hasta la remoción total del precipitado. Los esteroides fueron finalmente extraídos por formación de un sistema bifásico al agregar hexano.

d) Aislamiento y purificación de EG y AEG

30 g de algas frescas fueron tratadas como en la sección anterior y el extracto clorofórmico lavado fue combinado con glicolípi-

dos radiactivos provenientes de incubaciones enzimáticas y concentrado a presión reducida. En otras ocasiones el aislamiento se limitó únicamente a este material radiactivo. Los lípidos fueron resuspendidos en un pequeño volumen de cloroformo y purificados por cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo y eluída en forma escalonada con cantidades crecientes de metanol en cloroformo según la técnica de Hitchcock y Nichols (1971). Los solventes de elución fueron los siguientes: CHCl_3 : 400 ml; CHCl_3 - CH_3OH (95:5, v/v): 200 ml; CHCl_3 - CH_3OH (90:10, v/v): 200 ml; CHCl_3 - CH_3OH (60:40, v/v): 200 ml; CHCl_3 - CH_3OH (2:1, v/v saturado con NH_4OH concentrado): 200 ml.

Se colectaron fracciones de 10 ml. El eluido de cloroformo-metanol (95:5, v/v; fracciones 50 a 60) fue concentrado y sometido a cromatografía preparativa en placa delgada de sílica gel G (2 mm de espesor) con el solvente N. Las dos bandas radiactivas (correspondientes a EG y AEG) fueron raspadas de la placa y eluidas de la sílica gel con cloroformo-metanol (2:1, v/v conteniendo un 4% de agua). Cada una de ellas, separadamente, fue cromatografiada una vez más con el solvente L y eluidas de la misma manera de la sílica gel (Forsee y col., 1974).

3. Lecitina y fosfatidil etanolamina

El extracto crudo de lecitina de soja L- α -lecitina; (Sigma, tipo II-S) utilizado en los ensayos, contiene un 10-20% de L- α -lecitina y fue ofrecido por el Dr. N.G. Bazán (Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Universidad Nacional del Sur).

Aislamiento y purificación de fosfatidil etanolamina

La fosfatidil etanolamina (de soja y alga) fue purificada siguiendo la técnica de separación de lípidos de Hitchcock y Nichols (1971). 20 g de algas frescas fueron tratadas con cloroformo-metanol

noi (2:1, v/v) como se indicó en secciones anteriores. El extracto (lavado y concentrado) se resuspendió en un pequeño volumen de cloroformo (haciendo otro tanto con 50 mg de lecitina cruda de soja) y cromatografió en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo y eluída con un gradiente discontinuo de metanol en cloroformo, como se mencionó en la sección anterior.

Las fracciones 1 a 79, que eluyeron con las mezclas cloroformo-metanol (95:5, v/v y 95:10, v/v) y cloroformo puro conteniendo monogalactosil diglicéridos, fosfatidil colina, cerebrósidos, esteril glucósidos y digalactosil diglicéridos, fueron recogidas y utilizadas como testigos en los ensayos de acilación de EG (fracción lipídica I). Otro tanto se hizo con las fracciones 96 a 120 que eluyeron ante la mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v y NH_4OH concentrado) conteniendo fosfatidil inositol, fosfatidil glicerol, cardiolipinas, ácidos fosfatídicos, poliprenil fosfatos y sulfolípidos (fracción lipídica II).

Las fracciones ricas en FE (80 a 95) que eluyeron con la mezcla cloroformo-metanol (60:40, v/v) fueron concentradas y sometidas a cromatografía preparativa en capa delgada de sílica gel G (de 2 mm de espesor) en el solvente M. La banda correspondiente a la FE fue revelada por tratamiento de la placa con vapores de yodo y raspada de la misma a fin de ser extraída con cloroformo-metanol (2:1, v/v). La concentración de fosfolípidos en las distintas preparaciones fue estimada por su contenido en fósforo total (Tausky y Shorr, 1953).

4. Derivados isoprénicos

Dol, lote # 65C-7202 de Sigma, está compuesto por 5 especies moleculares: C_{85} a C_{105} siendo C_{95} la de más alta concentración.

Dol-P aislado de hígado y parcialmente purificado, fue un ofrecimiento del Dr. N.H. Behrens (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar") u obtenido de Sigma.

El poliprenol alílico ficaprenol fue aislado de hojas de Ficus elastica, como lo indican Stone y col. (1967) y fosforilado por el método de Popjak y col. (1962). La pureza del ficaprenol fue determinada por CCD y por espectrometría infrarroja y de resonancia magnética nuclear. La espectrografía de masas mostró que se compone de una mezcla de undecaprenol (C₅₅) y dodecaprenol (C₆₀) en iguales proporciones.

Aislamiento de poliprenil fosfatos endógenos

500 g de algas frescas fueron extraídas 2 veces durante una noche con cloroformo-metanol (2:1, v/v) y el extracto resultante filtrado y lavado por el método de Folch. La solución resultante fue combinada, en algunos casos, con lípido biosintético obtenido a partir de incubaciones de fracciones enzimáticas con (³H)MVA. Luego se evaporó bajo presión reducida hasta sequedad y se resuspendió en un pequeño volumen de etanol. Los esteroides fueron precipitados por agregado de digitonina como se describe en la sección 2c) y el sobrenadante que resulta de este tratamiento fue decantado y cromatografiado en columna de DEAE-celulosa (12 x 450 mm) equilibrada con cloroformo-metanol (2:1, v/v) y eluída con un gradiente lineal de acetato de amonio de 0 a 0,4 M en el mismo solvente. Se recogieron fracciones de 4 ml. De cada fracción se lavó por el método de Folch y se ensayó la capacidad aceptora de glucosa por incubación con extractos enzimáticos en la forma que se detalla más adelante. En los casos en que se incluyó lípidos marcados en la purificación, se tomaron alícuotas para medición de radiactividad. Las fracciones que mostraron aumento de la actividad glucosilante fueron recogidas, lavadas y concentradas bajo nitrógeno.

5. Preparación de glucósidos

a) 1,6-anhidroglucosano

La preparación de 1,6-anhidroglucosano a partir de salicina se hizo empleando el método de Behrens y Leloir (1970). El glucósido fue tratado con NaOH 0,1 N a 62-68°C por 90 minutos y neutralizado finalmente con Dowex 50 (H⁺). El 1,6-anhidroglucosano fue separado de la salicina remanente y de la glucosa por cromatografía en papel con solvente A.

b) Disacáridos

Los disacáridos laminaribiosa y soforosa fueron un gentil obsequio del Dr. M.A. Dankert (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar").

6. Condiciones de crecimiento de *Prototheca zopfii*

a) Medios de cultivo

Prototheca zopfii, cepa PR-5, alga unicelular aclorótica considerada como la contrapartida no fotosintética de *Chlorella*, fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC 16533). Las células fueron cultivadas en el siguiente medio: 0,8% de glucosa (Fluka) y 0,2% de peptona de carne comercial (N° 1, Britania) en constante agitación en agitador rotatorio magnético. Los volúmenes variaron según las preparaciones, de 1 a 15 litros en botellones Pyrex. Al cabo de aproximadamente 30 hs de inoculadas, el crecimiento alcanzó el 50% de la fase logarítmica y, previo examen fotocolorimétrico y microscópico, las algas se cosecharon por centrifugación, como se describe más adelante. Para el mantenimiento de la cepa y como fuente de inóculo para cultivos en medio líquido, se realizaron en forma paralela, cultivos con ágar en pico de flauta (2,4% de glucosa, 2,0% de ágar Difco y 0,6% de peptona de carne en agua). Cada 2 meses, como promedio, se realizaron

repiques en el mismo medio.

b) Cinética de crecimiento

Al estudiar la cinética de crecimiento de Prototheca zopfii en las condiciones mencionadas se efectuaron tres tipos de mediciones:

- i) turbidimetría en un fotocolorímetro Klett;
- ii) conteos directos en cámara de Neubauer al microscopio óptico, mediante la técnica usualmente seguida para glóbulos blancos;
- iii) método de siembra de diluciones seriadas de inóculo en cajas de Petri y conteo de aquellas cajas que contenían entre 30 y 300 colonias.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Para el cálculo del número medio de células por ml, como así también para el error, se consideró que las células y colonias en los métodos ii) y iii) seguían una distribución de Poisson clásica, utilizándose la fórmula correspondiente.

Al comparar el número de células viables por ml calculadas por los métodos ii) y iii) con la lectura de unidades fotocolorimétricas Klett se observó que existía una correlación lineal entre las mismas, hasta que el cultivo alcanza la fase de meseta. A partir de ese momento no se observó relación alguna entre células viables y mediciones fotocolorimétricas (ver figura 15). Durante la fase logarítmica de crecimiento una unidad fotocolorimétrica Klett equivale a 50 células por ml (con un error porcentual del 20%).

La cinética de crecimiento de Prototheca zopfii se representa en la figura 15 en un gráfico semilogarítmico.

La velocidad de crecimiento específico fue calculada mediante la fórmula:

$$\mu = \frac{1}{N \cdot \ln 2} \frac{dN}{dt}$$

donde N es el número de algas y t es tiempo (Davis y col., 1967) y hallada de 0,42 horas⁻¹.

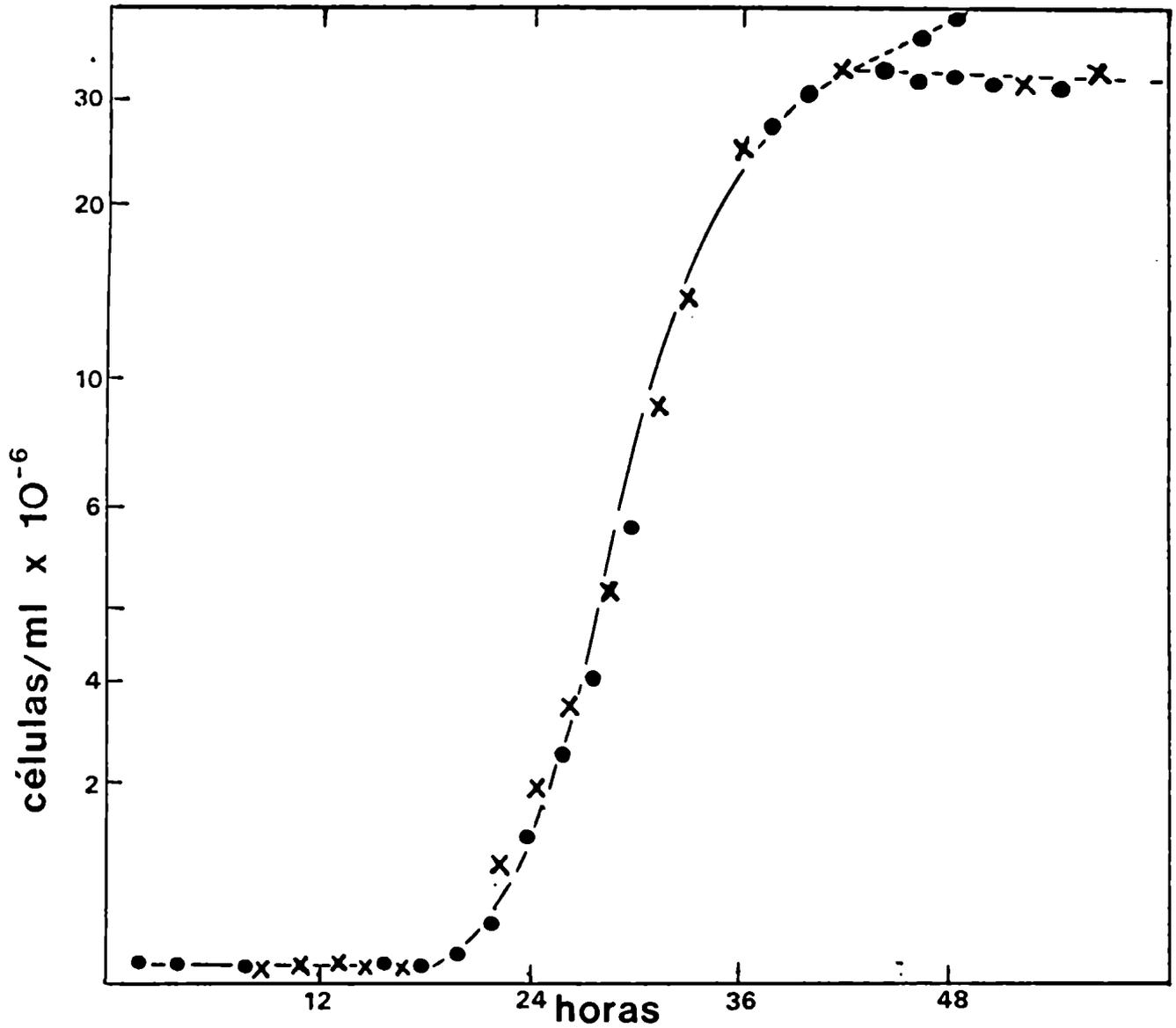


FIGURA 15. Cinética de crecimiento de Prototheca zopfii.

Las células fueron cultivadas en medio líquido como se indica en el texto.

- — ● valores hallados por fotocolorimetría.
- x — x valores hallados por conteo de colonias o de células en caja de Neubauer.

Asumiendo que el crecimiento sigue el modelo postulado por Monod (1942) mediante la fórmula:

$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{S}{K_s + S} \right]$$

donde S es la concentración de sustrato, μ la velocidad de crecimiento específica y K_s la constante de saturación. K_s es una buena medida de la demanda neta del medio ambiente por el organismo e incluye todo sustrato; mientras que μ_{\max} mide el potencial del organismo en la circunstancia específica. Las constantes de saturación más altas ya sea en algas como en bacterias, halladas hasta el momento, no superan en ningún caso el gramo por litro de medio en el caso de la glucosa (Droop, 1974) por lo que se considera que en este caso nos hallamos en condiciones saturantes por parte del sustrato y la velocidad de crecimiento específica calculada es equivalente a la μ_{\max} de la ecuación de Monod.

II. PREPARACIONES Y ENSAYOS ENZIMATICOS

1. Fracciones enzimáticas de Prototheca zopfii

Las células fueron cosechadas de cultivos en medio líquido en fase logarítmica cuando se alcanza el 50% del crecimiento máximo. Se lavaron 3 veces consecutivas con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); β -mercaptoetanol 5 mM y EDTA 1 mM. El mismo buffer se utilizó para resuspender a las células y someterlas a ruptura por sonicación (100 W, 30 minutos con polvo de vidrio de 5 μ m de diámetro, en una celda refrigerada por flujo constante de metanol a -30°C) o mediante la prensa de French en la forma que se describe más adelante. El homogenato resultante fue centrifugado a 25.000g por 30 minutos. Aliquotas del sobrenadante (S_{25}) fueron usadas como fuente de enzimas

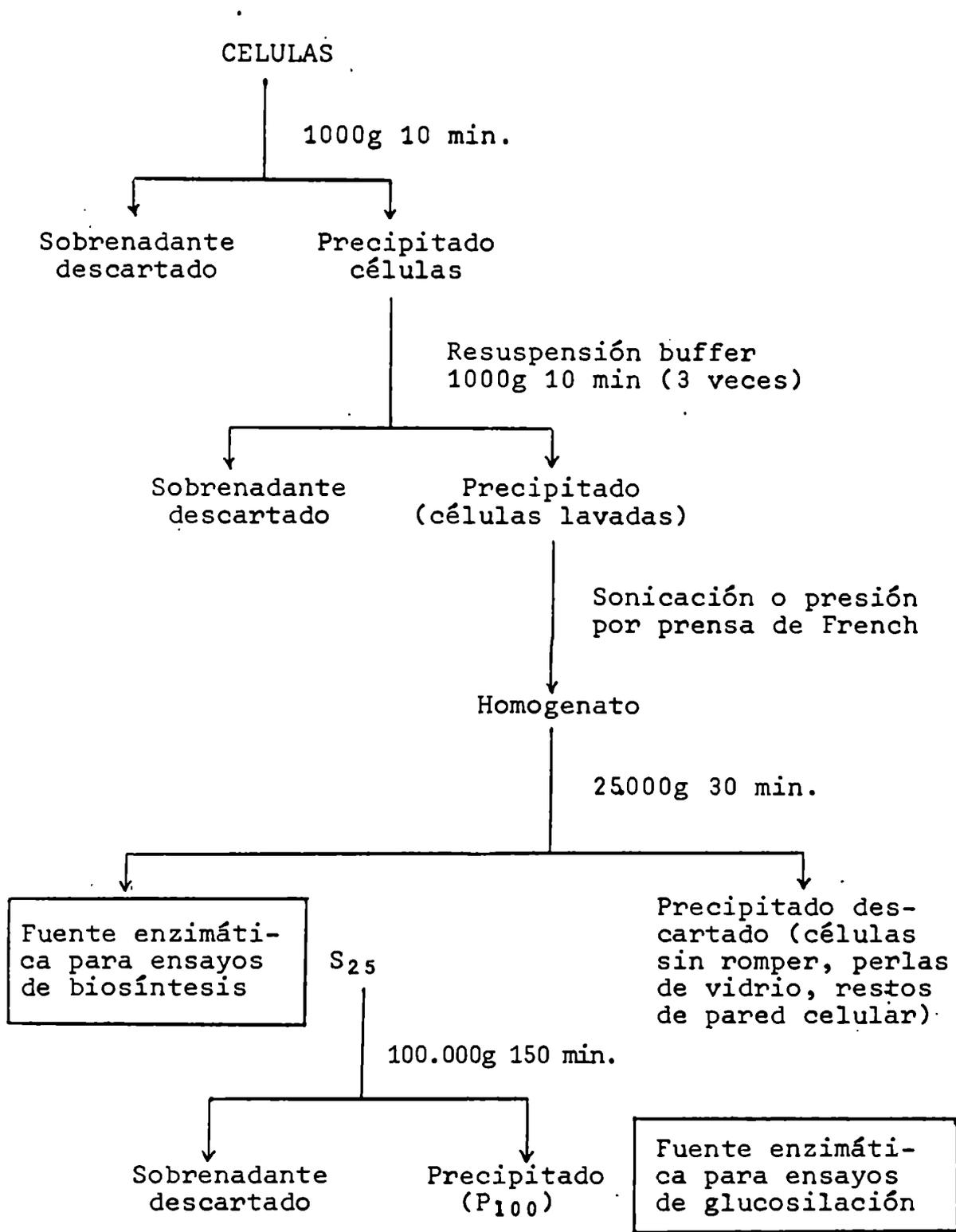


FIGURA 16. Esquema de preparación enzimática.

para los ensayos de biosíntesis.

Por centrifugación de la fracción S₂₅ a 100.000g por 150 minutos se obtuvo el precipitado (P₁₀₀) utilizado para los ensayos de glucosilación. Es necesario recordar que la fracción S₂₅ contiene fragmentos de todas las organelas dado que el proceso de ruptura celular utilizado no resguarda la integridad de las mismas y por lo tanto no puede deducirse la localización subcelular de enzimas a partir de la componente de fraccionamiento utilizada como fuente para los ensayos. Tanto en el caso de las enzimas glucosilantes como las responsables de biosíntesis de poliprenil fosfatos solo exhibieron actividad preparaciones frescas.

2. Purificación de la UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa

El homogenato procedente de la ruptura celular fue centrifugado a 20.000g por 10 minutos y el sobrenadante resultante centrifugado nuevamente a 100.000g por 180 minutos. El precipitado (300 mg de proteínas) fue resuspendido en buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 5 mM, β-mercaptoetanol y 1 mM EDTA con volumen suficiente para su disolución, más un 0,6% de concentración final de Triton X-100. Después de centrifugar a 175.000g por 60 minutos, el precipitado fue descartado y el sobrenadante sometido a cromatografía en columna de DEAE-celulosa (1,2 x 35 cm) equilibrada con el buffer mencionado más 0,05% de Triton X-100 y eluída con 50 ml de 0,4 M KCl en la misma solución. Se recogieron fracciones de 2,5 ml y las que mostraron mayor actividad enzimática se juntaron y dializaron contra el mismo buffer. Posteriormente fue centrifugada y se agregó, gota a gota y con agitación constante, una solución saturada de (NH₄)₂SO₄ (pH 8,0) hasta 20% de saturación final. El precipitado se descartó, previa centrifugación, y luego se agregó (NH₄)₂SO₄ hasta 60% de saturación. Se centrifugó y el precipitado se dializó toda una noche contra el buffer mencionado. La solución resultante fue cromatografiada en columna de Sephadex G-100 (1 x 60 cm) equilibrada con el buffer de diálisis más 0,05% de Triton X-100 y eluída con 0,4 M

KCl en la misma solución. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y aquellas que mostraron actividad glucosilante fueron dializadas en la forma mencionada.

3. Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular de P. zopfii se realizó utilizando una combinación de técnicas descritas por distintos autores. El procedimiento general se esquematiza en la figura 17 y resume los pasos seguidos en el aislamiento de las fracciones. Unos 20 gramos de algas frescas fueron homogeneizadas en una celda de prensa de French, marca Aminco, modelo 4-3339, a una presión de 1550 kg/cm², en buffer 10 mM HEPES (pH 7,5) y 0,25 M sacarosa a una temperatura de 4°C. El homogenato resultante de la ruptura celular se centrifugó a 1.000g por espacio de 10 minutos en centrífuga refrigerada (paso A). El sobrenadante (S₁) se decantó cuidadosamente y sirvió como fuente para la obtención de las distintas fracciones.

a) Mitocondrias

El sobrenadante (S₁) del paso A fue centrifugado a 25.000g por 10 minutos (paso B). El precipitado resultante (P₂₅) estaba formado por dos capas superpuestas, una superior de color blancuzco y una inferior rosácea. La capa superior fue cuidadosamente raspada con espátula, aun a costa de pérdidas de material de la capa inferior (método de Fleisher y Kervina, 1974). Después de esta operación se resuspendió en 10 mM HEPES (pH 7,5) 1mM EDTA y 0,25 M sacarosa y se centrifugó a 25.000g por 10 minutos. La operación se repitió un total de 3 veces y el precipitado resultante del último lavado fue utilizado como fuente para los ensayos.

Contenido de ubiquinona: El contenido de ubiquinona se midió por el método de Lloyd (1966). La reducción con NaBH₄ produjo el característico corrimiento del máximo de absorción de 275 nm a 290 nm (en etanol) y la cantidad de ubiquinona se calculó mediante un $\Delta\epsilon$ 1 cm/275 nm = 12,26 x 10⁶ cm mol⁻¹ en una reducción completa (Lloyd, 1966).

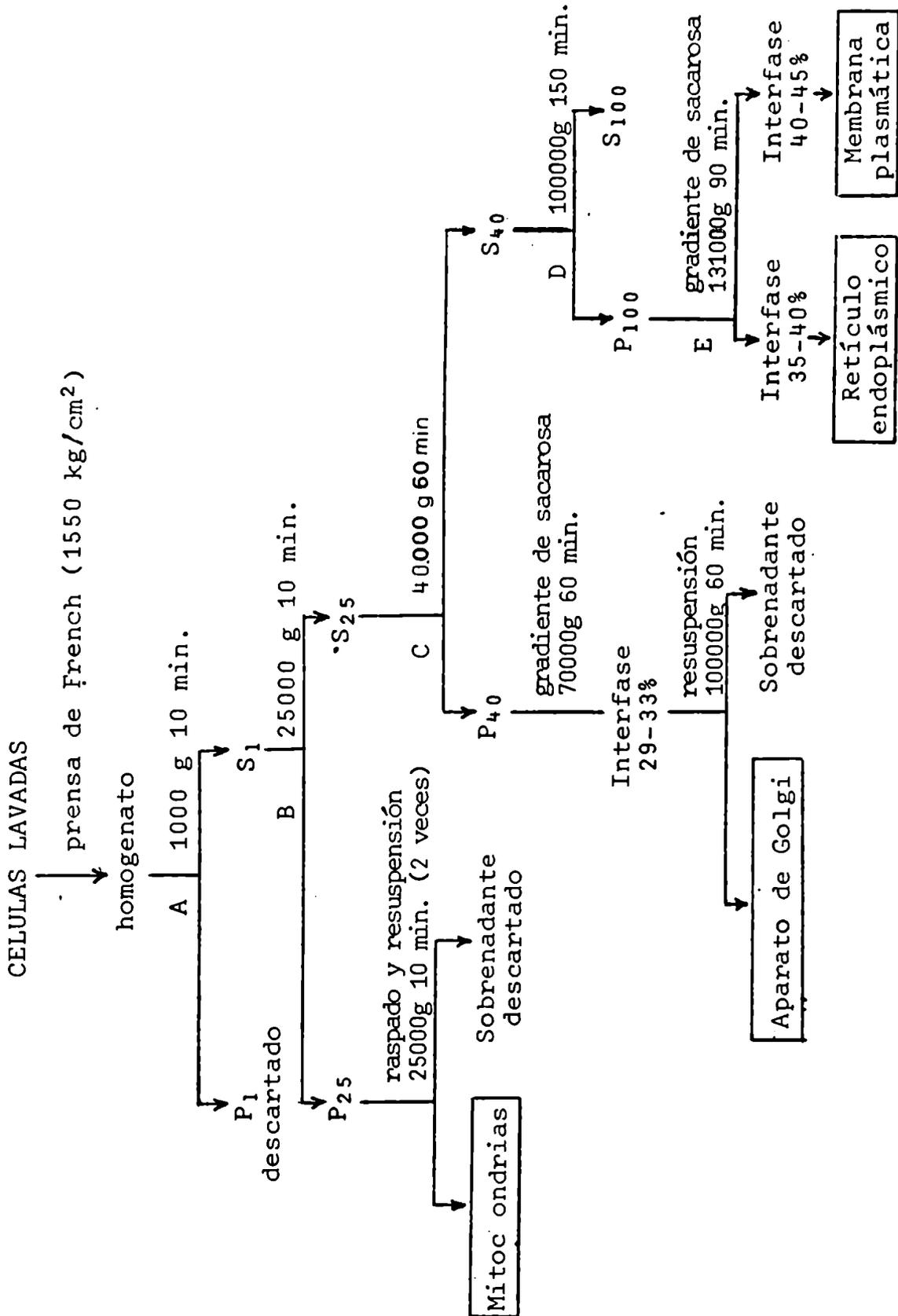


FIGURA 17. Esquema de fraccionamiento subcelular.

b) Aparato de Golgi

El sobrenadante (S₂₅) del paso B se centrifugó a 40.000g por 60 minutos (paso C) a fin de sedimentar los microsomas "pesados" (Fleisher y Kervina, 1974) ricos en dictiosomas. El sobrenadante (S₄₀) fue cuidadosamente decantado y el precipitado resuspendido en 10 ml de 52% sacarosa, 0,1 M buffer fosfato (pH 7,1) de manera que la densidad final fuera la correspondiente a una concentración de 44%. Esta fracción fue recubierta en un tubo de centrífuga por 10 ml, 10 ml, 10 ml y 12 ml de 38,7%, 36%, 33% y 29% de sacarosa respectivamente y centrifugado a 70.000g por 60 minutos (Morré, 1971). La interfase 29-33% fue recogida, diluída con agua fría y centrifugada a 100.000g por 60 minutos. El precipitado obtenido representa la fuente de dictiosomas usados en los ensayos.

Tiamino pirofosfatasa: El ensayo de tiamino pirofosfatasa (EC 2.5.1.3, 2-metil-4-amino-5-hidroximetil-pirimidin-pirofosfato: 4-metil-5-(2'-fosfoetil)-tiazol-2-metil-4-aminopirimidin-5-metenil-transferasa) fue realizado como lo indica Morré (1971).

La reacción se inició por agregado de 0,1 ml de suspensión celular a 2,0 ml de 33 mM buffer barbital sodio (pH 8,0), 15 mM CaCl₂ y 3,3 M pirofosfato de tiamina. Después de 15 minutos a 37°C la reacción fue detenida por agregado de 1 ml de 10% TCA. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para la determinación de fosfato (Tausky y Shorr, 1953).

c) Retículo endoplásmico y membrana plasmática

La fracción S₄₀ fue centrifugada a 100.000g por 150 minutos (paso D) y el precipitado (P₁₀₀) sometido a un gradiente de sacarosa. Los microsomas se resuspendieron en 8 ml de 50% concentración final de sacarosa y se los recubrió con una capa de 4 ml de 45% sacarosa. Por sobre las dos capas, se colocaron 3,5 ml de 40% sacarosa y 3 ml de 35% sacarosa. Se centrifugó (paso E) a 131.000g por espacio de 90 minutos. La interfase 35-40% fue recogida y uti-

lizada para los ensayos como retículo endoplásmico purificado y la fracción que permanece en la interfase 40-45% como membrana plasmática (Korn, 1974).

5'-nucleotidasa: La 5'-nucleotidasa (EC 3.1.3.5, 5'-ribonucleotido fosfohidrolasa) fue ensayada como lo indica Morré (1971). La reacción se realizó en un volumen total de 1 ml conteniendo 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM AMP, 10 mM MgCl₂ y 0,1 ml de suspensión celular a 37°C por 15 minutos. Se detuvo y analizó como en el caso de la tiamino pirofosfatasa.

Glucosa-6-fosfatasa: La glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9, D-glucosa-6-fosfato fosfohidrolasa) se determinó como lo hace Morré (1971) a 0,9 ml de 55 mM Tris-HCl (pH 6,6), 11 mM glucosa-6-fosfato y 11 mM β-mercaptoetanol se le agregaron 0,1 ml de suspensión celular y se incubó 15 minutos a 37°C. La reacción se detuvo y analizó como en el caso de la tiamino pirofosfatasa.

4. Ensayo de glucosilación

Las incubaciones tipo se realizaron a 25°C por espacio de 30 minutos. Los componentes de la reacción (en un volumen final de 50 µl) fueron los siguientes:

| | |
|---|-------------------------|
| Tris-HCl (pH 7,5) | 2,5 µmoles |
| β-mercaptoetanol | 0,5 µmoles |
| UDP-[¹⁴ C]Glc (200.000 cpm) | 0,4 nmoles |
| Enzima P ₁₀₀ | 100-300 µg de proteínas |

En los casos en que se agregó poliprenil fosfatos exógenos (Dol-P, Fic-P, aceptor endógeno purificado, o lípido biosintético), éstos fueron previamente llevados a sequedad bajo nitrógeno en el tubo de incubación, junto a 0,5 µmoles de Na₂-EDTA y 1 µmol de MgCl₂. Luego se agregó buffer y Triton X-100 hasta una concentración final de 0,6%; se agitó vigorosamente en Vortex a fin de obtener una buena resuspensión y se adicionó enzima y sustrato radiactivo.

En los ensayos en que no se suplementaron poliprenil fosfatos exógenos y se analizó la glucosilación de lípidos polares, el medio de incubación contenía, además, 0,5 μ moles de $MgCl_2$.

En la glucosilación de lípidos neutros se utilizó en forma alternativa buffer 50 mM HEPES (pH 6,0) y se suplementó con una suspensión micelar de β -sitosterol de 0,75 mM de concentración final de esteroles preparada como se indicó anteriormente.

Las incubaciones se detuvieron y fueron posteriormente extraídas por medio de dos procedimientos.

A) Extracción con butanol

La reacción es detenida con 0,1 ml de butanol y extraída 3 veces con el mismo volumen de solvente orgánico. Las fases superiores así obtenidas fueron combinadas y lavadas a su vez 3 veces con 0,1 ml de agua (García y col., 1974). En forma rutinaria el extracto butanólico fue analizado por cromatografía en papel con solvente F a fin de descartar cualquier posibilidad de contaminación por parte del sustrato.

Las preparaciones produjeron dos tipos de glicolípidos, neutros y polares, los cuales fueron separados por cromatografía en papel de intercambio iónico (Whatman DE-20) corrida con butanol saturado con agua. Las áreas del cromatograma correspondientes al origen (glicolípidos polares) y frente de solvente (glicolípidos neutros) fueron cortadas y contadas por espectrometría de centelleo líquida.

En otras ocasiones fueron separados por cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada en metanol 99%.

La fase acuosa inferior y tres sucesivos lavados del precipitado resultante con agua-metanol (5:1, v/v) fueron reunidos, liofilizados y cromatografiados en papel con solvente K. La radiactividad remanente en el origen del cromatograma fue considerada como perteneciente a polímeros.

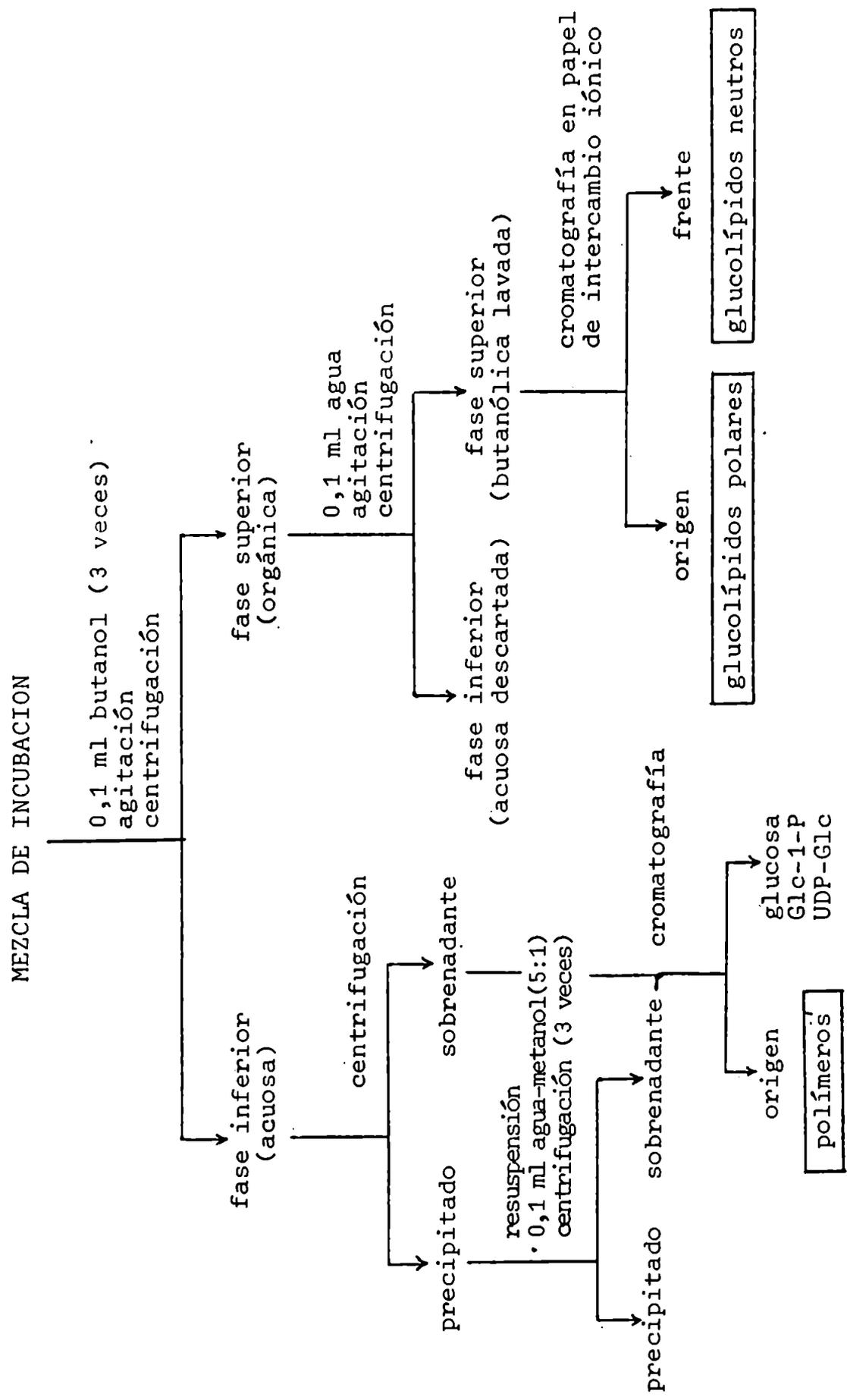


FIGURA 18. Esquema de extracción A (García y col., 1974).

B. Extracción con cloroformo-metanol

La reacción es detenida por el agregado de 3 volúmenes de cloroformo y 2 de metanol. Después de agitación y posterior centrifugación, la interfase proteica es reextraída con la mezcla cloroformo-metanol-agua (3:2:1, v/v). Este proceso se repite una vez más y el precipitado es esta vez tratado con 2 volúmenes de metanol para extraer los restos de agua, y finalmente con cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v), mezcla que tiene la propiedad de extraer lípido-oligosacáridos insolubles en la mezcla utilizada en primer término. La figura 19 esquematiza el proceso.

5. Biosíntesis de dolicol fosfato

Preparaciones de alga (S_{25}) fueron incubadas por 90 minutos a 30°C con los siguientes componentes en un volumen total de 50 μl : 2,5 μmoles Tris-HCl (pH 7,5), 0,25 μmoles β -mercaptoetanol, 50 nmoles Na_2 -EDTA, 50 nmoles NaF, 50 nmoles MgCl_2 , 50 nmoles ATP, 0,35 nmoles $\text{RS-[2-}^{14}\text{C]MVA}$ y 100-200 μg de proteínas (S_{25}). La incubación fue detenida por agregado de 0,1 ml de eter de petróleo (rango de destilación 35 - 65°C) y extraída 2 veces más con idéntico volumen. De esta manera son extraídos alcoholes libres e hidrocarburos.

La fase acuosa resultante fue tratada con 0,1 ml de cloroformo-metanol (2:1) y extraída 2 veces más de idéntica forma. Se combinaron luego las fases orgánicas y se lavaron por el método de Folch y col. Este extracto contenía los poliprenil fosfatos sintetizados por el sistema.

El extracto clorofórmico fue tratado luego con ácido (0,01 M HCl, 100°C , 10 min.) y los alcoholes alílicos liberados por este tratamiento fueron extraídos con hexano. La solución remanente contenía los poliprenil fosfatos α -saturados. La figura 20 muestra el esquema de extracción.

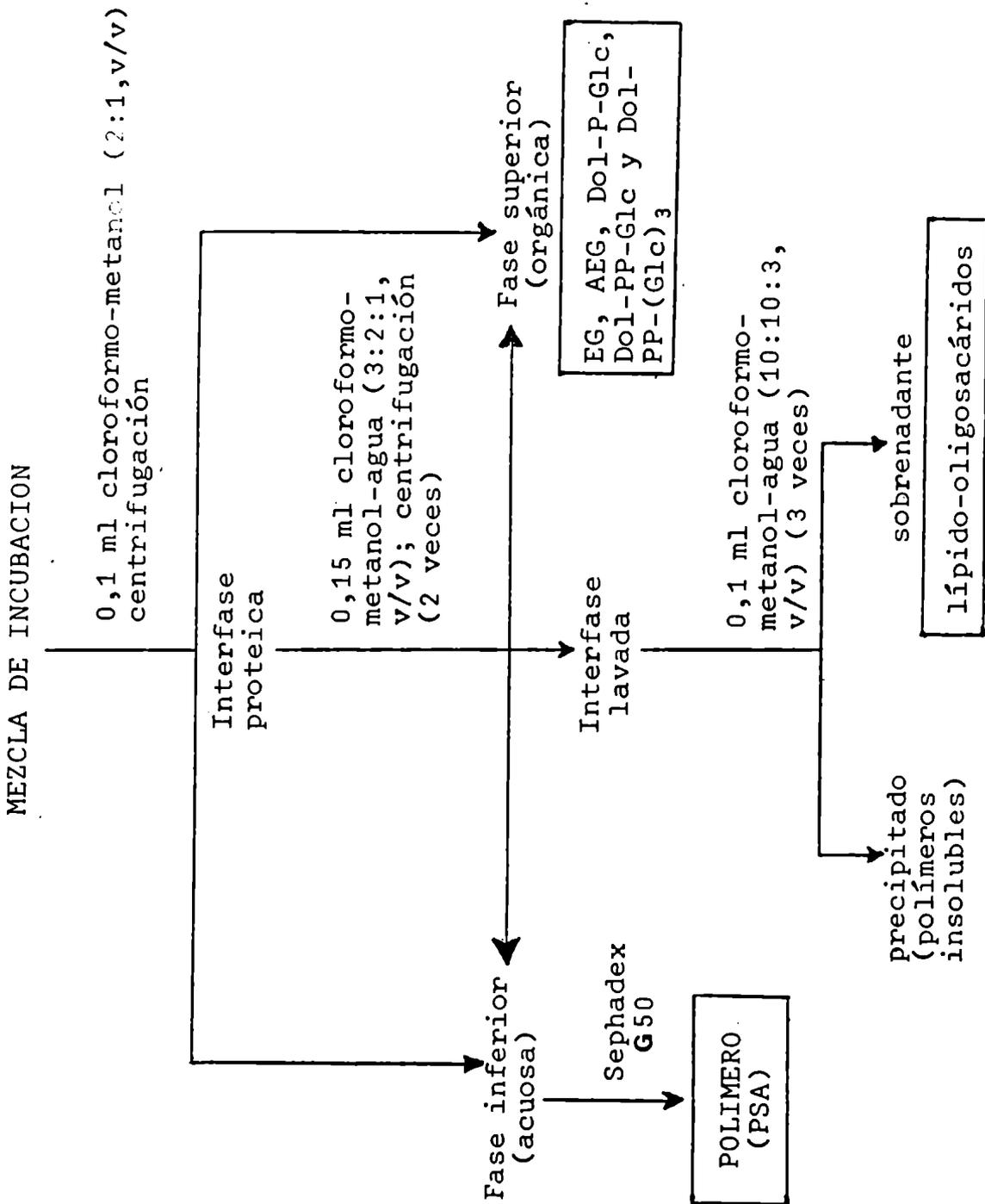


FIGURA 19. Esquema de extracción B (Behrens y col., 1971).

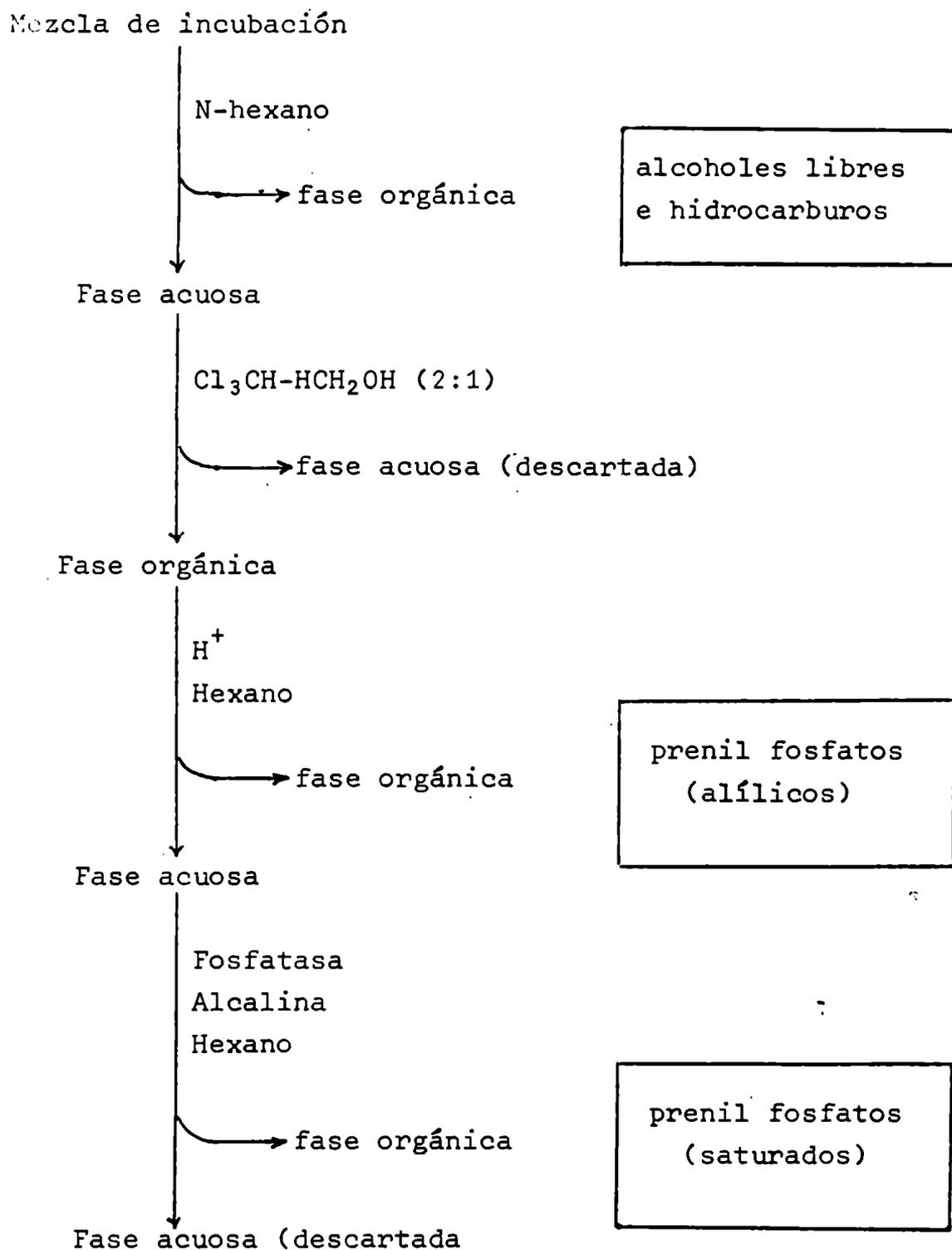


FIGURA 20. Esquema de extracción (Daleo y Pont Lezica, 1977).

6. Hidrólisis enzimática de poliprenil fosfatos

Los poliprenil fosfatos resistentes a hidrólisis ácida suave fueron incubados con fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1, monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa) de Escherichia coli (Sigma) a 37°C por 20 h en el siguiente medio en un volumen total de 30 μ l: 2,5 μ moles Tris-HCl (pH 8,4), 0,5 μ moles $MgCl_2$, 0,1% Triton X-100, 100 μ g fosfatasa alcalina y 50% metanol. Otros 100 μ g de fosfatasa alcalina fueron agregados después de las primeras 10 h de incubación. Los alcoholes libres resultantes fueron extraídos con éter de petróleo (35-65°C rango de destilación).

7. Síntesis de celulosa

La formación de $\beta(1\rightarrow4)$ glucanos se detectó utilizando la técnica de Elbein y col. (1964). El medio de incubación contiene los siguientes componentes en un volumen final de 50 μ l: 2,5 μ moles Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 μ moles β -mercaptoetanol, 0,5 μ moles $MgCl_2$, 590 pmoles (200.000 cpm) GDP-[U- ^{14}C]Glc y 100-300 μ g de enzima.

La enzima utilizada es una combinación de los precipitados de 100.000 y 25.000g y en ciertas ocasiones se agregó, además, UDP-[3H]-Glc (107 pmoles, 100.000 cpm) o UDP-Glc no radiactiva. En otros ensayos se agregó a la mezcla de incubación polímero soluble en agua (PSA).

La reacción fue detenida con 0,1 ml de cloroformo-metanol (2:1, v/v) y extraída por el método B (Behrens y col., 1971). El precipitado final fue extraído posteriormente, como indican Elbein y col. (1966).

Se agregó 1 ml de agua, 1 mg de celulosa hidratada y 1 mg de celulosa no tratada (Whatman CF11) calentándose a 100°C por 2 minutos. Posteriormente se centrifugó y el precipitado se extrajo 2 veces con 1 ml de 2% NaOH por 5 minutos a 100°C, y el precipitado resultante

fue lavado 2 veces más con 1 ml de agua.

La celulosa hidratada (10-20 mg/ml) se preparó (Jayme y Lang, 1963) disolviendo celulosa (Whatman CF11) en ácido fosfórico concentrado, agregando la solución a 20 volúmenes de agua y lavando el precipitado amorfo con agua hasta que la suspensión perdió su acidez.

8. Hidrólisis enzimática de glucanos

Se realizaron incubaciones enzimáticas a fin de determinar la estructura de glucolípidos, polímeros solubles (PSA) o insolubles en agua.

En el caso de los esteril glucósidos, el medio de incubación se suplementó con 0,1% de Triton X-100; las incubaciones fueron de 5 h y la reacción fue detenida con 0,1 ml de butanol. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación y se las combinó con líquido de centelleo para ser contadas.

En los casos de derivados de poliprenil fosfatos, los azúcares fueron liberados por hidrólisis ácida suave antes de someterlos a incubación. Las enzimas fueron incubadas con p-nitrofenil derivados de distintos glicósidos para estimar actividades contaminantes. A continuación se detallan las enzimas con los medios de incubación utilizados y las actividades detectadas.

a) α -glucosidasa (EC 3.2.1.20, α -D-glucósido glucohidrolasa) de levaduras (Sigma, tipo I) y el correspondiente sustrato, incubándose 25 h a 37°C. Actividades: α -glucosidasa: 14 U/mg (también mostró actividad en presencia de 0,1% Triton X-100), β -glucosidasa: 0,1 U/mg, α -galactosidasa: 0 U/mg, β -galactosidasa: 0,13 U/mg y α -manosidasa: 0 U/mg.

b) β -glucosidasa (EC 3.2.1.21, β -D-glucósido glucohidrolasa) de almendras (Sigma). Se agregaron 100 μ g de enzima a 0,1 ml de 0,1 M

Tris-acetato (pH 5,2) y el correspondiente sustrato, incubándose 25 h a 37°C. Actividades: α -glucosidasa: 0,54 U/mg, β -glucosidasa: 1,9 U/mg, α -galactosidasa: 0,27 U/mg, β -galactosidasa: 3,2 U/mg y α -manosidasa: 0 U/mg.

c) dextranasa (EC 3.2.1.11, α -1,6-glucan 6-glucanohidrolasa) de Penicillium (Sigma). 100 μ g de enzima se incubaron en presencia de 0,1 ml de 0,1 M Tris-maleato (pH 6) y 20.000 cpm de PSA, a 37°C por 72 h. La reacción fue detenida por pasaje de sus componentes por columna de Sephadex G-50, que se utilizó, a su vez, para analizar los productos.

d) α -amilasa (EC 3.2.1.1, α -1,4-glucan 4-glucanohidrolasa) de Bacillus subtilis (100 μ g) se incubó en 100 μ l de 0,1 M Tris-maleato (pH 6,9) y 20.000 cpm de PSA por 25 h a 20°C. La reacción fue detenida y analizada como en el caso de la dextranasa.

e) celulasa (EC 3.2.1.4, β -1,4-glucan glucanohidrolasa) de Aspergillus niger (Sigma, tipo I) se incubó con 0,1 ml de 0,1 M Tris-acetato (pH 4,5) por 72 h a 37°C. Actividades: α -glucosidasa: 0 U/mg, β -glucosidasa: 0,25 U/mg, α -galactosidasa: 0,54 U/mg, β -galactosidasa: 0 U/mg y α -manosidasa: 0 U/mg.

f) pronasa (EC 3.4.4.-) de Streptomyces griseus (Sigma, tipo IV). El PSA (20.000 cpm) fue tratado con pronasa en las siguientes condiciones: 0,05 M buffer fosfato de sodio (pH 7,6), 0,2 mg pronasa a 37°C durante 72 h, en una atmósfera de tolueno.

III. METODOS ANALITICOS

1. Determinaciones cuantitativas

a) Concentración de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina bovina como patrón.

b) Concentración de fosfato

El fosfato inorgánico fue determinado por el método de Taussky y Shorr (1953).

c) Concentración de azúcares reductores

Los azúcares reductores se cuantificaron como lo hace Nelson (1944).

d) Concentración de esteroides

Los esteroides se determinaron por el método de Cl_3Fe tal como lo describe Zak (1957).

En los análisis cualitativos se utilizó la técnica de Liebermann-Burchard tal como fue descrito por Cook (1961). La muestra a ser analizada fue evaporada con N_2 y el residuo resultante disuelto en 0,5 ml de ácido acético glacial. El reactivo formador de color consistió en una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado (19:1, v/v) de la cual se agregó 1 ml. La solución se mezcló y después de 40 minutos la reacción positiva está acompañada por la aparición de un color verde o azulado.

2. Tratamientos degradativos

a) Hidrólisis ácida suave

Se combinaron cuatro volúmenes de agua y uno de metanol con un volumen de butanol conteniendo la muestra a hidrolizar. El agua contiene suficiente HCl para llevar la solución a 0,01 N en el ácido y se calentó a 100°C por 10 minutos. La reacción se detuvo por agregado de una cantidad estequiométrica de 1 N NH₄OH y enfriada en un recipiente con hielo. Luego se agregó butanol hasta partición en dos fases. La fase orgánica fue lavada 2 veces con 0,2 volúmenes de agua. Se contaron alícuotas de las fases acuosas combinadas como así también de la butanólica resultante.

En otras ocasiones las muestras se llevaron a seco bajo N₂ y se les agregó 0,01 N HCl, agitando y llevando a 100°C por 10 minutos. El HCl se eliminó evaporando a sequedad 3 veces, añadiendo 50 µl de agua por vez.

b) Tratamiento alcalino de aceptores lipídicos

Se siguió el método de Dawson (1954) tal como lo describen Lahav y col. (1969). La muestra se trató con 0,1 M NaOH en cloroformo-metanol (1:4, v/v), 15 minutos a 37°C. La muestra se neutralizó con HCl y por agregado de agua se separó la fase cloroformica de la acuosa. La fase orgánica se lavó 3 veces con una mezcla agua-metanol (2:1, v/v). La capacidad aceptora se midió utilizando la fase cloroformica.

c) Reducción catalítica

Se hizo en la forma descripta por Wright y col. (1967) con ligeras modificaciones. El Pt se preparó a partir de una solución acuosa de hexacloroplatinato de amonio y exceso de NaBH₄. El precipitado de platino metálico se lavó con agua y butanol saturado en agua. La muestra, disuelta en butanol, se añadió sobre el platino, se agitó para resuspenderlo y se burbujeó H₂ por espacio de 4 horas

con intensidad suficiente para mantener el Pt en suspensión. Se centrifugó, quitó el butanol y el Pt se lavó sucesivamente con butanol y con agua. Las fracciones butanólicas se combinaron y lavaron con agua. Todas las fases acuosas se reunieron y se contaron alícuotas de las fracciones.

d) Tratamiento con fenol

Este tratamiento se efectuó tal como describen García y col. (1974). Las muestras se llevaron a seco bajo N_2 y se les agregó 0,16 ml de 50% fenol. Se las mantuvo a 68-70°C durante 3 horas, luego de lo cual se enfrió y centrifugó para separar la partición bifásica. La fase fenólica se lavó tres veces con 0,06 ml de agua. Los lavados acuosos se combinaron con la fase acuosa y se lavaron tres veces en éter etílico para eliminar el fenol. La fase fenólica se llevó a seco agregando éter etílico varias veces, evaporando con una corriente de N_2 . Se contaron alícuotas de ambas fases.

e) Reducción con borohidruro

Las muestras a reducir fueron combinadas con exceso de $NaBH_4$ sólido. La solución se mantuvo por una noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante agregado cuidadoso de resina Dowex 50 (H^+) para eliminar cationes. La solución se llevó a seco a presión reducida y el borato fue eliminado por evaporaciones sucesivas con metanol.

f) Oxidación con periodato

Las oxidaciones con periodato de esteril glucósidos se llevaron a cabo con leves modificaciones de como fue descripto por Forsee y col. (1974). Muestras con 200.000 cpm de $[^{14}C]EG$ y $[^{14}C]AEG$ se solubilizaron con 0,6% Triton X-100 y 0,05 M $NaIO_4$ en un volumen total de 2 ml. Después de 76 horas a 4°C las mezclas fueron reducidas con exceso de $NaBH_4$. Se tomaron alícuotas para investigar si el trata-

miento produjo deacilación de AEG sometiéndolas a CCD en sílica gel G. Luego fueron hidrolizadas con 2 N HCl a 100°C por 3 horas en tubo sellado y extraídas con butanol. El HCl fue evaporado con N₂ y el Na⁺ eliminado por pasaje por una columna pequeña de resina Dowex 50 (H⁺). El borato fue eliminado por adición y evaporación repetida de metanol. Después de un nuevo pasaje por resina Dowex 50 (H⁺) y Amberlite (HO⁻), las muestras se cromatografiaron en papel Whatman 3MM con solvente E.

Los polisacáridos fueron degradados en forma controlada, como lo indican Goldstein y col. (1965). Las muestras fueron solubilizadas en 2 ml de 0,05 M NaIO₄ y mantenidas 14 días a 4°C, luego de lo cual fueron reducidas con exceso de NaBH₄ e hidrolizadas con 2 N HCl a 100°C por 3 horas en tubo sellado. El HCl, Na⁺ y borato se eliminaron de la misma manera que en el caso de los AEG, como así también el análisis de productos.

g) β-eliminación

A fin de determinar la naturaleza de la unión carbohidrato-péptido en el PSA, muestras de este producto fueron sometidas a hidrólisis alcalina suave (0,1 M NaOH a 4°C por 8 días). Finalmente, las muestras se cromatografiaron en una columna de Sephadex G-50. Si la unión carbohidrato-péptido fuera rota, es de esperarse que el oligosacárido radiactivo se incluya en la columna.

h) Acetólisis

Se colectaron 44,5 g (peso fresco) de P. zopfii, los cuales fueron extraídos dos veces con 200 ml de acetona. Los 27,5 g resultantes se extrajeron con 200 ml de 50% fenol, 200 ml de agua y nuevamente 200 ml de acetona (2 veces). El precipitado resultante se sometió a 3 extracciones con 2% NaOH a 100°C por 5 minutos, luego de lo cual se lavó con agua (5 veces) y acetona. La fracción así obtenida (7,5 g) fue sometida a acetólisis en la forma descripta

por Wolfrom y Thompson (1963). La muestra se disolvió en una mezcla de 170 ml de ácido acético glacial, 170 ml de anhídrido acético y 18 ml de ácido sulfúrico concentrado, en un recipiente refrigerado con hielo. La solución se mantuvo 100 horas a 37°C y fue llevada a un litro mediante agregado de agua y hielo. A una temperatura de 4°C fue neutralizada con NaHCO_3 , luego de lo cual se mantuvo 1 a 2 horas a temperatura ambiente. El precipitado formado se filtró y se extrajo con 30 ml de cloroformo. El extracto clorofórmico fue secado con CaCl_2 y evaporado. Los oligosacáridos así obtenidos se deacilaron con metóxido de sodio (Flowers y col., 1969) preparado en el momento, y separados por cromatografía en papel con solvente G.

3. Cromatografías y electroforesis

a) Cromatografía de intercambio iónico

Se hicieron columnas de DEAE-celulosa (Serva, tipo SS, forma acetato) de tamaños variables que se especifican en cada caso y con distintos solventes de elución.

- 1- Columnas (1 x 20 cm) equilibradas con 99% metanol y eluidas a temperatura ambiente con el mismo solvente y luego con 0,4 M acetato de amonio en 99% metanol para la separación de glucolípidos neutros y polares.
- 2- Columnas (1,2 x 60 cm) equilibradas con 99% y eluidas a 4°C con un gradiente lineal de acetato de amonio (0 a 0,4 M) en el mismo solvente para el análisis de glucolípidos polares.
- 3- Columnas (1,2 x 60 cm) equilibradas con cloroformo-metanol (2:1, v/v) y eluidas a 4°C con un gradiente lineal de acetato de amo-

nio (0 a 0,4 M) en el mismo solvente para el aislamiento y caracterización de lípidos aceptores endógenos.

- 4- Columnas (1,2 x 35 cm) equilibradas con cloroformo y eluídas a 4°C en forma escalonada con cantidades crecientes de metanol en cloroformo (Hitchcock y Nichols, 1971) para aislar esteril glucósidos y fosfatidil etanolamina.
- 5- Columnas (1,2 x 35 cm) equilibradas con cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v) y eluídas a 4°C con un gradiente lineal de acetato de amonio (0 a 0,15 M) en el mismo solvente para el análisis de lípido oligosacáridos.
- 6- Columnas (1 x 40 cm) de DEAE-celulosa (forma Cl⁻) equilibradas con una solución de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM β-mercaptoetanol, 1 mM Na₂-EDTA, 0,4 M KCl y 0,05% Triton X-100 eluídas a 4°C con el mismo solvente para la purificación de la UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa.
- 7- Se realizaron cromatografías en papel de DEAE-celulosa (Whatman DE-20) para separar glucolípidos neutros y polares usando butanol como solvente de corrida.

b) Filtración en gel

- 1- Se preparó una columna de Sephadex LH-20 (1 x 20 cm) y fue equilibrada con 0,1 M acetato de amonio en 99% metanol tal como fue descrito por Dankert y col. (1966). La elución se llevó a cabo con el mismo buffer y se colectaron fracciones de 0,3 ml.
- 2- Para el análisis del PSA se prepararon columnas de Sephadex G-25 (0,8 x 35 cm) y Sephadex G-50 (1,2 x 60 cm) equilibradas y eluídas con 0,1 M NaCl en agua.
- 3- Para la purificación de la UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa se preparó una columna de Sephadex G-100 (1 x 60 cm) equilibrada y eluída con 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM β-mercaptoetanol, 1 mM Na₂-EDTA, 0,4 M KCl y 0,05% Triton X-100.

c) Cromatografía en papel

Las cromatografías en papel se hicieron con los siguientes solventes de corrida: Solvente A: butanol-piridina-agua (6:4:3, v/v); solvente B: butanol-piridina-agua (6:2:3, v/v); solvente C: butanol-piridina-agua (4:3:4, v/v); solvente D: butanol-piridina-agua (10:3:3, v/v); solvente E: butanol-piridina-0,1 N HCl (5:3:2, v/v); solvente F: isopropanol-ácido acético-agua (29:4:9, v/v); solvente G: propanol-acetato de etilo-agua (7:1:2, v/v); solvente I: 3 M NH₃ en 80% de etanol (v/v); solvente J: etanol-ácido acético-1 M acetato de amonio (75:26:4, v/v); solvente H: butanol-agua (5:1, v/v).

En el caso de los solventes H e I la cromatografía fue ascendente. Las cromatografías con solvente E se realizaron en papel Whatman 3MM, en todos los demás casos se utilizó papel Whatman N° 1.

d) Cromatografía en capa delgada

1- Cromatografías en sílica gel G: Se realizaron CCD en sílica gel G de 0,25 mm de espesor, excepto cuando se indica especialmente, como en el caso de cromatografías preparativas en que el espesor fue de 2 mm. Se desarrollaron con los siguientes solventes: Solvente K: cloroformo-metanol-agua (85:25:4, v/v); solvente L: cloroformo-metanol-agua (95:5:0,2, v/v); solvente M: cloroformo-metanol-ácido acético-agua (170:30:20:7, v/v); solvente N: cloroformo-metanol-agua (65:25:4, v/v); solvente Ñ: cloroformo-metanol-agua (60:25:4, v/v); solvente O: cloroformo-isopropanol-etanol- 1 N ácido acético (5:6:6:5, v/v).

2- Cromatografías en fase invertida en Kieselguhr G: Se llevaron a cabo CCD en fase invertida, tanto uni como bidimensionales, en placas de Kieselguhr G de 0,25 mm de espesor. Las placas fueron previamente inmersas en una solución al 5% de vaselina en éter de petróleo (v/v), como lo describen Dunphy y col. (1967) y corridas con acetona.

e) Electroforesis en papel

Se llevaron a cabo electroforesis en papel siguiendo la técnica de Markham y Smith (1952) aplicando 1000 V (20 V/cm) en un transcurso de 3 horas con los siguientes buffers de corrida: buffer P: 1,2 M acetato de piridina (pH 6,5); buffer Q: 0,1 M molibdato de sodio llevado a pH 5,0 con H₂SO₄ concentrado; buffer R: 0,03 M borato de sodio (pH 9,7).

Los azúcares reductores se localizaron con el reactivo de nitrato de plata como lo indican Trevelyan y col. (1950). Los lípidos se revelaron por tratamiento con vapores de yodo.

f) Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las electroforesis en gel de poliacrilamida se realizaron con el objeto de determinar el peso molecular del PSA. Se llevaron a cabo incubaciones en gran escala en las condiciones tipo con membranas de alga (P₁₀₀) y 0,1 M UDP-Glc no radiactiva. La reacción fue detenida y extraída con butanol, juntándose las fases acuosas, que previa concentración por liofilización, se sembraron en el gel. Otro tanto se realizó con PSA radiactivo purificado. La siembra se realizó de la siguiente manera: la muestra fue disuelta en 0,1 ml de una solución de 20% glicerol y 5 µl de 0,05% azul de bromofenol. Esta mezcla se aplicó en la parte superior de un gel de 7,5% en acrilamida de 8,7 cm de largo. La electroforesis se realizó a 8 mA/tubo hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del tubo. Inmediatamente después el gel fue retirado y conservado a -20°C. El gel fue cortado en trozos de 1 mm de largo y colocado en viales con 0,5 ml de H₂O₂ 30% (100 volúmenes). Los viales fueron incubados a temperatura ambiente por 3 días. Luego se agregó la mezcla de centelleo (10 ml) y contó. Los geles con muestras no radiactivas se tiñeron con Amido-Schwartz.

4. Mediciones de radiactividad

Las determinaciones de radiactividad fueron hechas en un contador de centelleo líquido Beckman LS-233. Las muestras fueron contadas en distintas mezclas de centelleo.

- a) Para cromatografías en papel o CCD y muestras en solventes orgánicos se utilizaron 3 ml de una solución de 4 g de PPO (2,5-difenil oxazol) en un litro de tolueno.
- b) Para muestras acuosas se utilizaron 3 a 6 ml de una solución de 2,2 PPO y 0,166 g de POPOP (1,4-bis[2(4-metil-5-fenil-oxazolil)]benceno) en 550 ml de tolueno y 250 ml de Triton X-100.
- c) En otras ocasiones se utilizó para ambos tipos de muestras 3 ml de solución de Bray constituida por 2,5 g de PPO y 50 g de naf-taleno en 500 ml de tolueno.

RESULTADOS

I. GLUCOSILACION DE LIPIDOS

Incubaciones hechas con UDP-(^{14}C)Glc y fracciones enzimáticas particuladas de alga (P₁₀₀) mostraron una transferencia de radiactividad (entre 5 y 6%) a productos solubles en butanol. En mucho menor proporción, también se observó transferencia a un compuesto soluble en agua, que cuando es cromatografiado en papel con solvente A, permanece en el origen como lo hacen los polímeros en estas condiciones (tabla VI).

TABLA VI. Transferencia de radiactividad de UDP-(^{14}C)Glc.

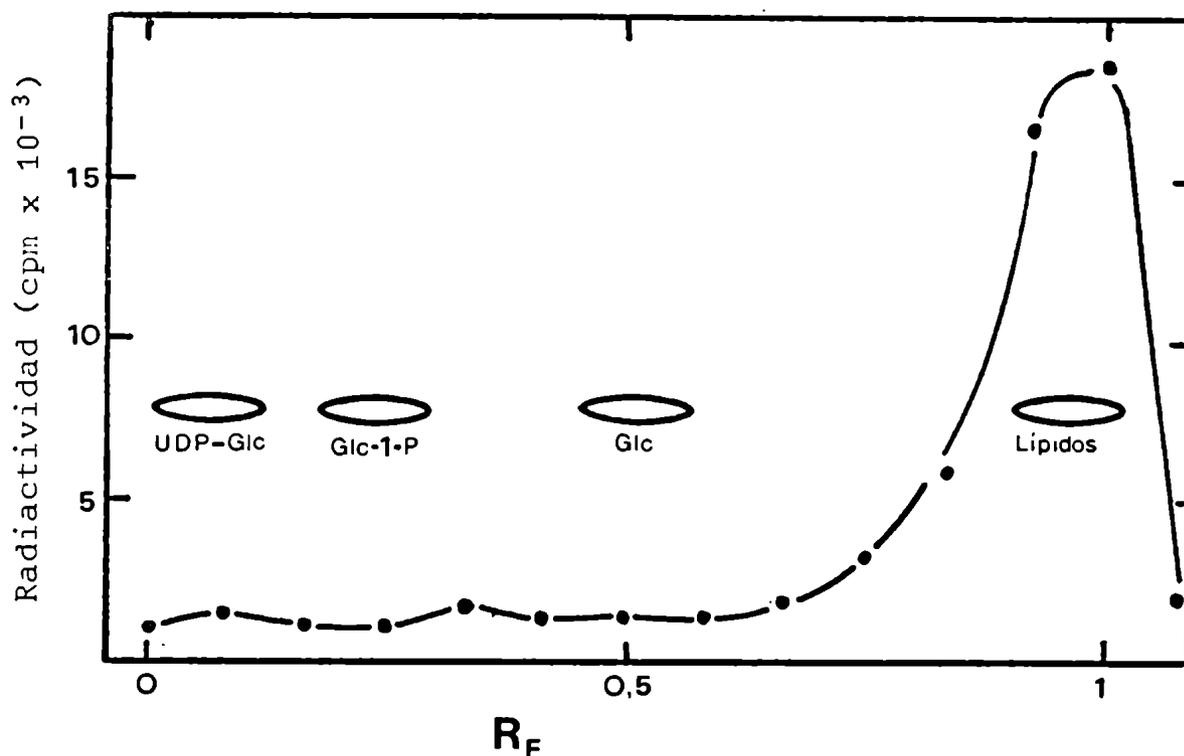
| Fracción | Cpm incorporadas | Porcentaje de radiactividad inicial agregada como UDP-(^{14}C)Glc |
|--------------------|---------------------|--|
| Soluble en butanol | 16.590 | 6,63 |
| Lípidos polares | 1.862 | 0,75 |
| lípidos neutros | 14.187 | 4,47 |
| Polímeros | 2.038 | 0,81 |

Se realizaron incubaciones como se describe en Materiales y Métodos. La reacción se paró por agregado de *n*-butanol y se extrajo con el mismo solvente. La fase orgánica se analizó por cromatografía en papel de intercambio iónico (figura 21B) y la fase acuosa por cromatografía en papel con solvente J. La radiactividad asociada al origen del cromatograma se consideró como polímeros.

Cromatografías en papel del extracto butanólico con solvente F permiten afirmar que el mismo no estaba contaminado con trazas de

UDP-Glc, glucosa-P o glucosa, puesto que toda la radiactividad migró con el frente del solvente, tal como lo hacen los lípidos en este sistema (fig. 21).

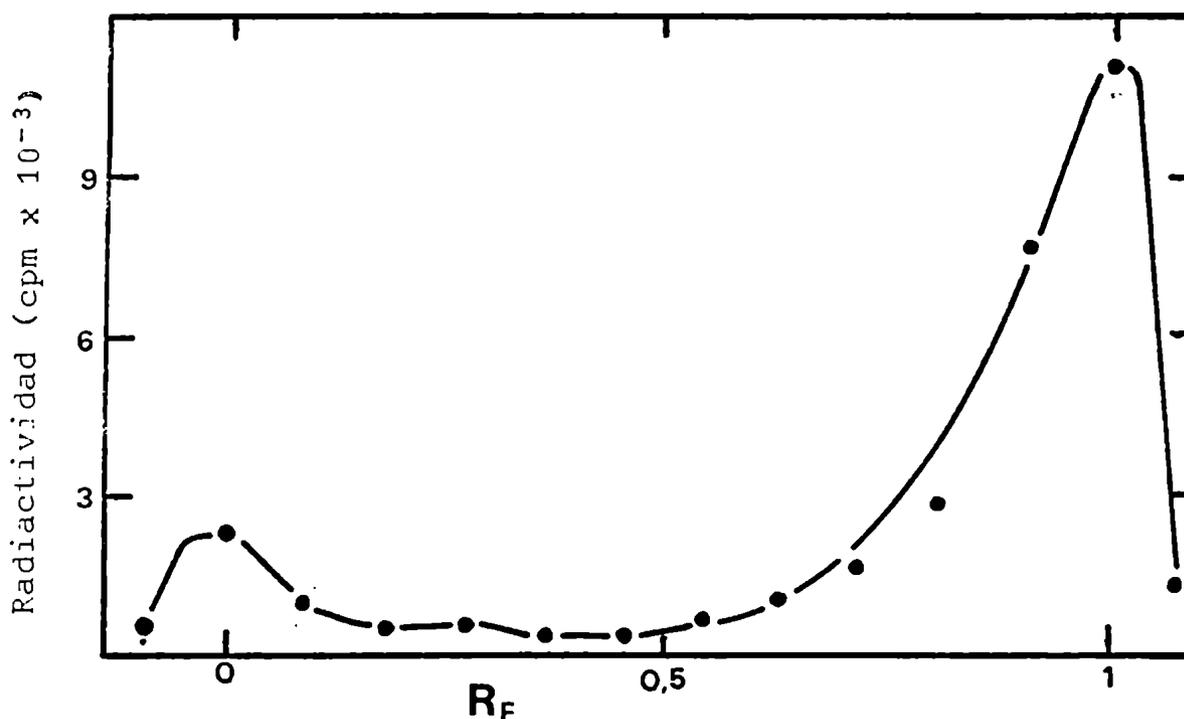
FIGURA 21. Pureza de los glucolípidos radiactivos.



Cromatografía en papel con solvente F del extracto butanólico. Este sistema permite detectar la presencia de posibles contaminantes no lipídicos en el extracto.

Cromatografías en papel de intercambio iónico del mismo extracto, demostraron que estaba compuesto al menos por dos especies moleculares, diferenciables por su carga neta. La fracción predominante (80% de la radiactividad soluble en butanol), migró con el frente del solvente (fig. 22), tal como lo hacen los lípidos neutros en estas condiciones, mientras que la fracción restante (20%) permaneció en el origen, como es de esperarse para lípidos con carga negativa (fig. 22).

FIGURA 22. Glucolípidos neutros y polares.



Cromatografía en papel de intercambio iónico del extracto butanólico (corrido con butanol como solvente).

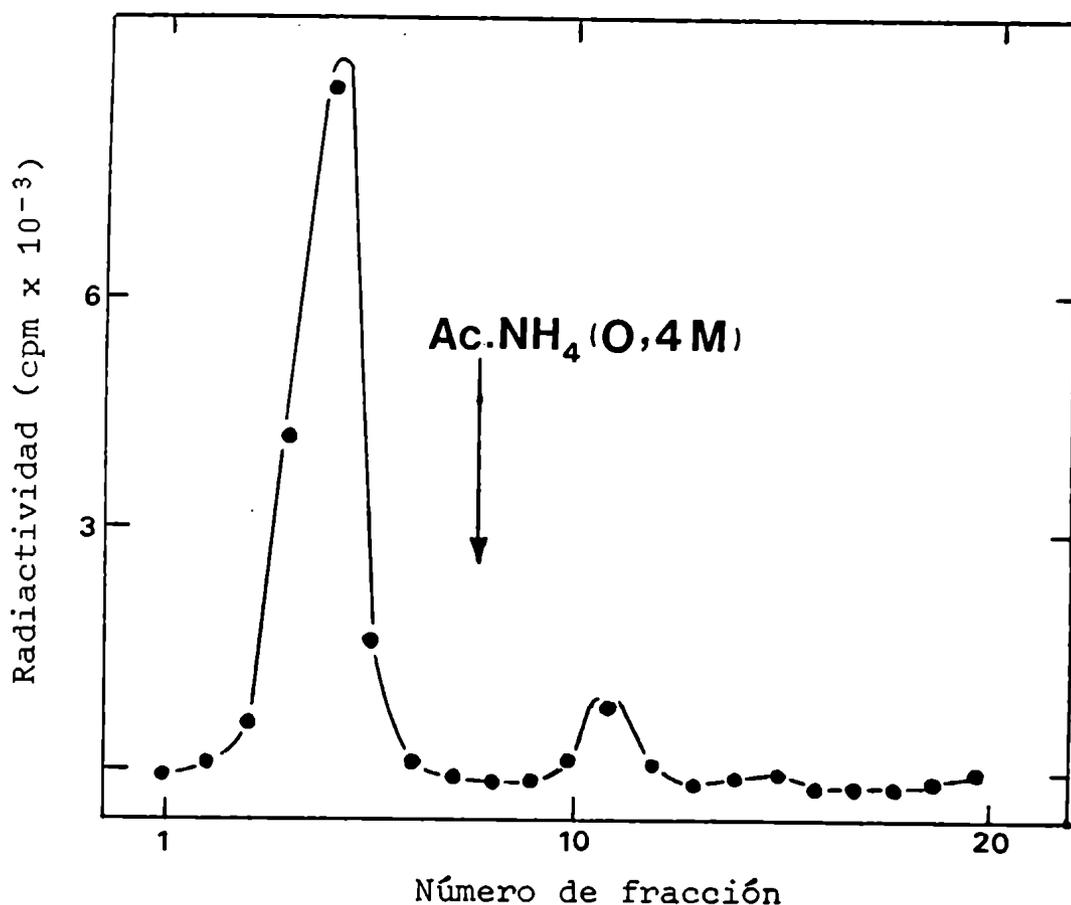
Los glucolípidos neutros fueron separados de los polares por cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con metanol 99% y eluida con el mismo solvente. Los glucolípidos neutros fueron eluidos con el volumen muerto mientras que los polares requirieron el agregado de acetato de amonio (0,4 M) en el solvente de elución para ser extraídos de la columna (fig. 23).

1. Caracterización de los glucolípidos neutros

a) Propiedades de los glucolípidos neutros

Los glucolípidos neutros fueron aislados por cromatografía en columna de DEAE-celulosa como se indica en la figura 23.

FIGURA 23. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del extracto butanólico.



Las fases orgánicas de varias incubaciones fueron sembradas en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con metanol 99%. Se colectaron fracciones de 3 ml. Después de la fracción 8 se eluyó con 0,4 M acetato de amonio en el mismo solvente. Se contaron alícuotas de 0,5 ml por fracción.

La tabla VII muestra que los glucolípidos neutros son resistentes a hidrólisis ácida suave. Sometidos a condiciones más severas (1 N H₂SO₄, 20 horas, bajo reflujo) el 90% de la radiactividad se hace soluble en agua. Cuando se cromatografió en papel la fase acuosa con solventes A, F y J se constató que el único producto liberado por hidrólisis fue glucosa (fig. 24).

FIGURA 24. Cromatografía en papel del producto de hidrólisis ácida de glucolípidos neutros.

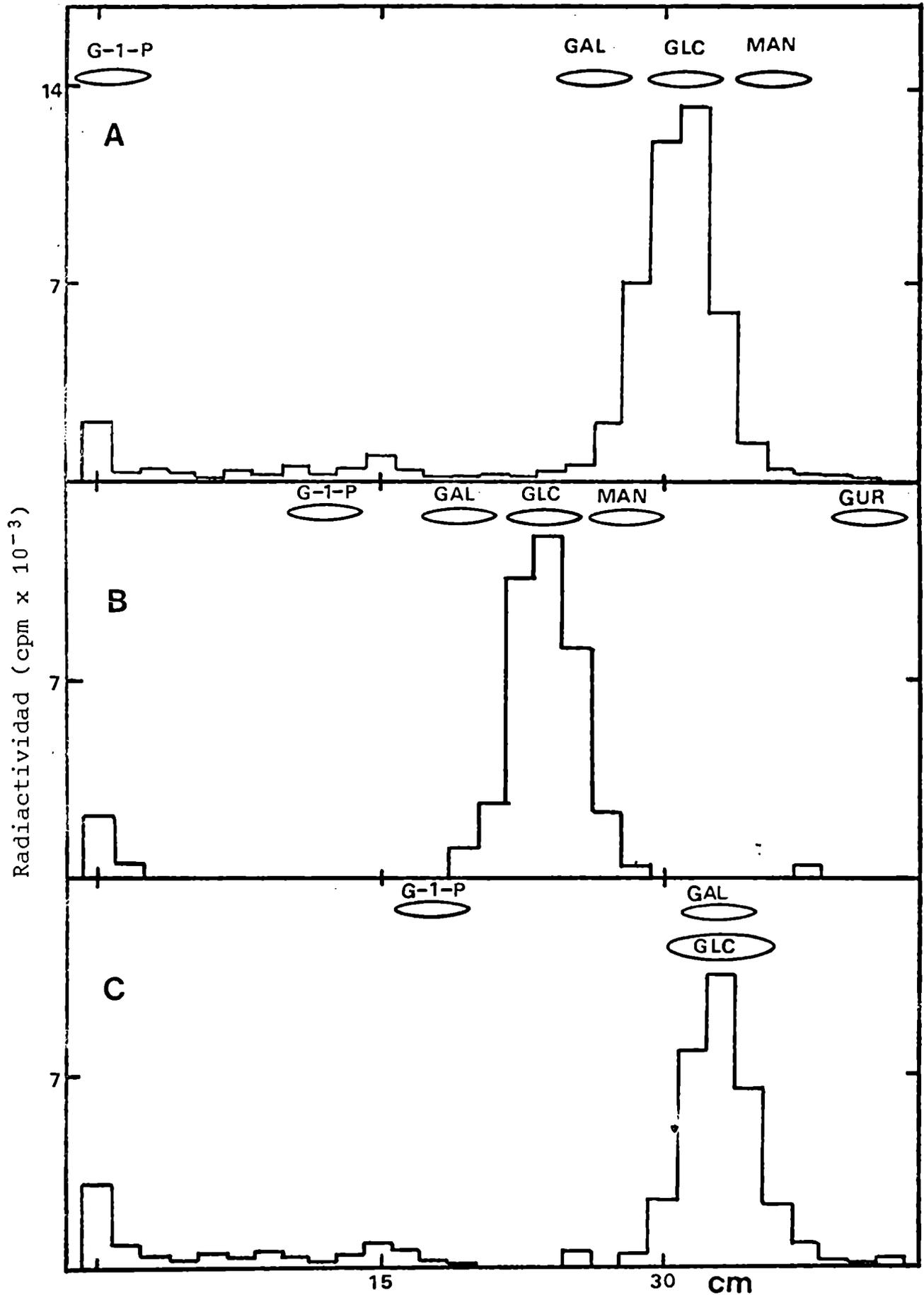


FIGURA 24. Cromatografía en papel del producto de hidrólisis ácida de glucolípidos neutros.

Los glucolípidos neutros parcialmente purificados por columna de DEAE-celulosa fueron sometidos a hidrólisis ácida fuerte (1 N H_2SO_4 , 20 horas, bajo reflujo). Después de este tratamiento se formó un sistema bifásico por agregado de agua y butanol. Las sales de la fase acuosa se eliminaron con resinas de intercambio iónico. Se liofilizó y sembró en papel para ser cromatografiados con los solventes A (A), F (B) y J (C).

Sometida a condiciones alcalinas (1 hora en 0,5% KOH en 90% metanol, bajo reflujo) la radiactividad permaneció soluble en butanol demostrando estabilidad de los glucolípidos a estas condiciones.

TABLA VII. Tratamientos ácido y alcalino de glucolípidos neutros.

| Tratamiento | Fase orgánica cpm | Fase acuosa cpm | Porcentaje de hidrólisis |
|--------------|----------------------|--------------------|-----------------------------|
| Acido suave | 98.430 | 2.103 | 2 |
| Acido fuerte | 5.215 | 92.899 | 94 |
| Alcalino | 97.538 | 3.002 | 3 |

Los glucolípidos neutros fueron aislados como se indica en la figura 22 y sometidos a hidrólisis ácida suave (0,01 N HCl, 100°C, 10 min.), fuerte (1 N H_2SO_4 , 20 horas bajo reflujo) y alcalina suave (0,5% de KOH en 90% de metanol, 1 hora bajo reflujo). Al finalizar los tratamientos se agregó agua y butanol en exceso hasta que se formaron dos fases las cuales se separaron y contaron.

Los lípidos neutros fueron recromatografiados en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo y eluída progresivamente con mezclas de solventes conteniendo cantidades crecientes de metanol en cloroformo (Hitchcock y Nichols, 1971) (fig. 25).

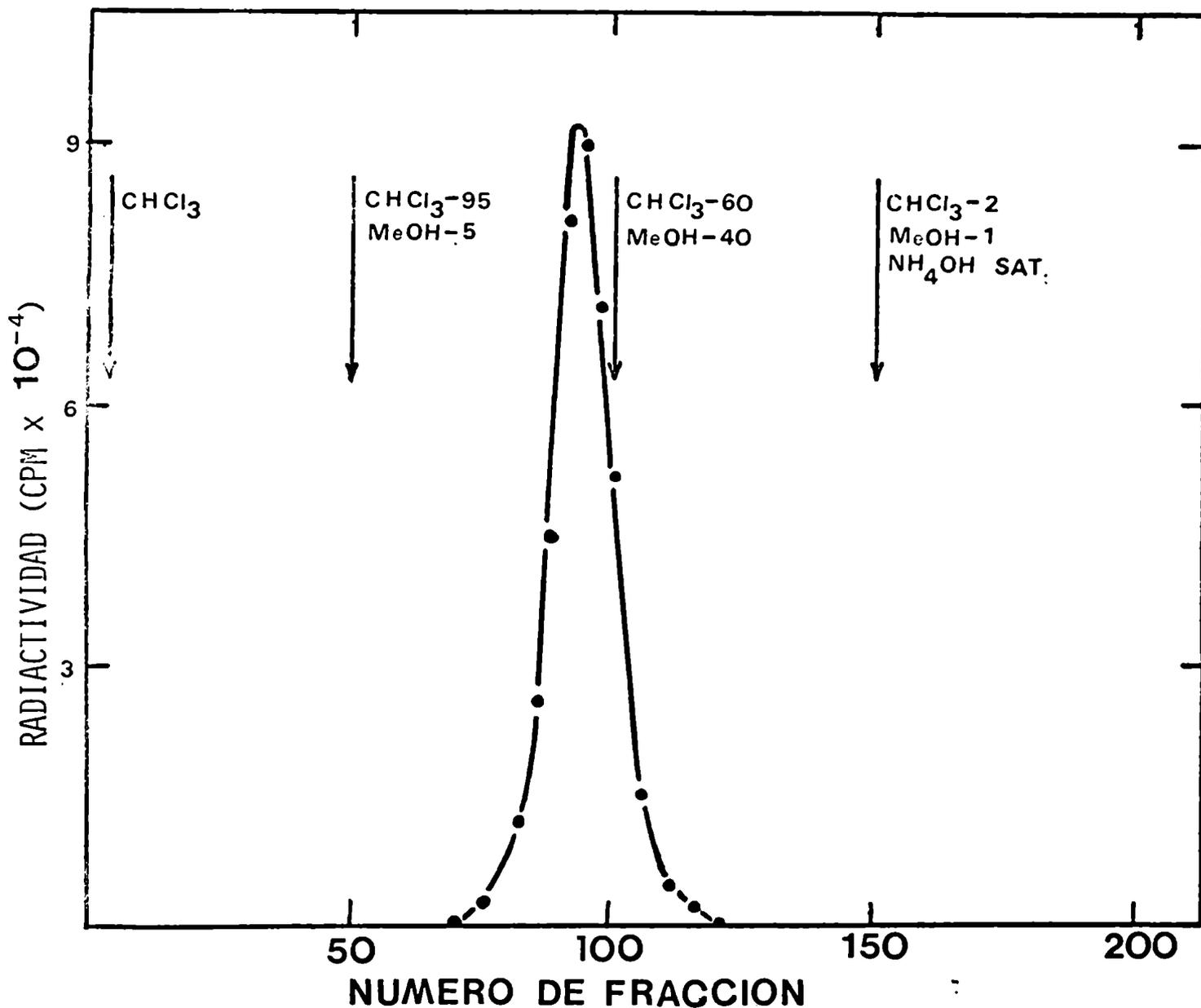


FIGURA 25. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de glucolípidos neutros.

Cromatografía de glucolípidos neutros parcialmente purificados en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo y eluída como se indica. Se recogieron fracciones de 7,5 ml, contándose alícuotas de 0,5 ml.

Como puede apreciarse la radiactividad eluyó con la mezcla cloroformo-metanol (95:5, v/v) formando un pico único. Existen diversos lípidos con el mismo patrón de elución, pero los únicos glucolípidos que así lo hacen son los esteril glucósidos (EG) y los acil esteril glucósidos (AEG).

Una alícuota de este pico se sometió a CCD con solvente K. Como puede observarse en la figura 26B, aparecen dos picos de radiactividad en este sistema. Ambos picos, al ser eluidos de la sílica gel y sometidos a la reacción de Liebermann-Burchard, dan un color verde-azulado (reacción positiva) lo que evidencia la presencia de esteroides. Cuando el producto de migración más rápida (pico II) fue saponificado, cambió su patrón de migración (fig. 26A), siendo idéntico al de migración lenta (pico I).

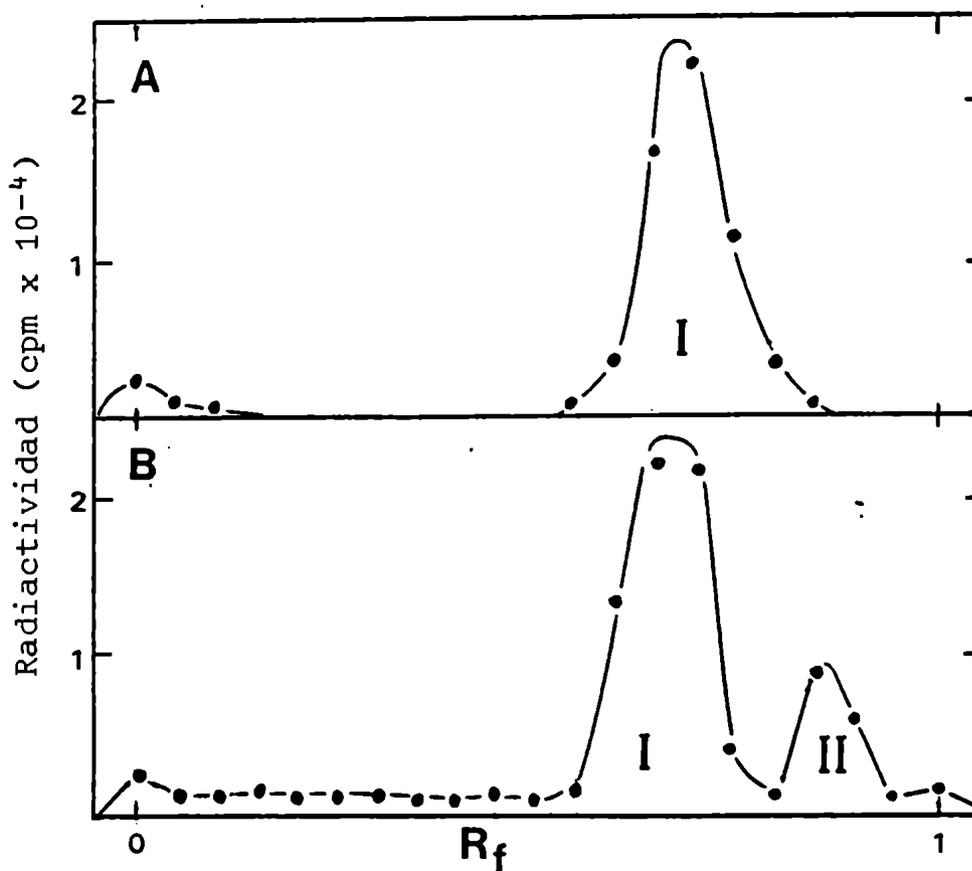


FIGURA 26. CCD de glucolípidos neutros.

Los glucolípidos neutros fueron sometidos a CCD en placas de sílica gel G con el solvente K. A) Tratados con 0,1 N KOH, 15 min. a 37°C en cloroformo-metanol (1:4, v/v); B) Sin tratamiento.

Este último compuesto no mostró cambio alguno luego del tratamiento. Esto indica que durante el proceso de saponificación se produjo la hidrólisis de un grupo acilo que esterificaba al compuesto de migración rápida.

En base a los datos presentados, el producto de migración lenta (pico I) fue caracterizado como un esteril glucósido (EG) y el más rápido (pico II) como un acil esteril glucósido (AEG).

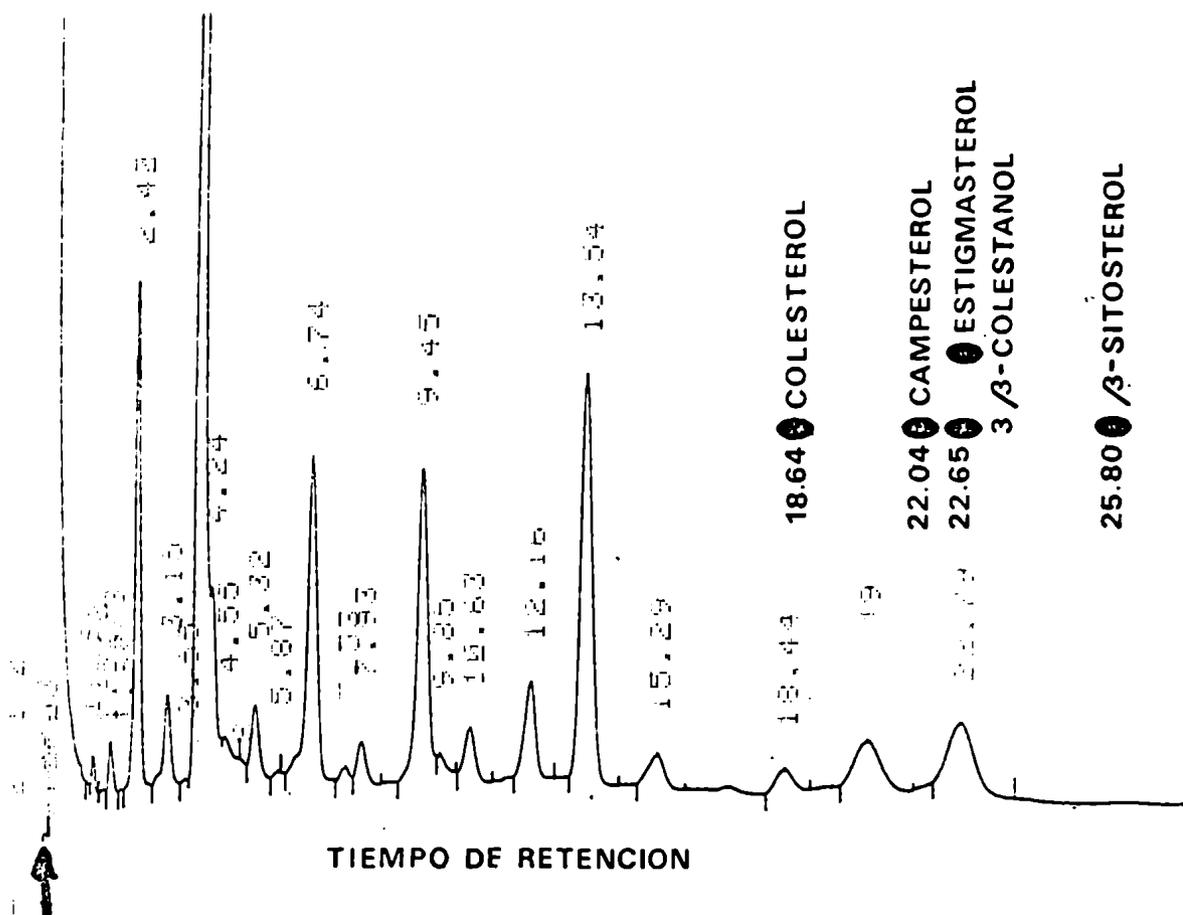
b) Caracterización del grupo esterilo

Los EG aislados y purificados por cromatografía en columna de DEAE-celulosa y CCD como se indica en Materiales y Métodos, se sometieron a hidrólisis alcalina fuerte (0,2 M NaOH en butanol 99%, a 100°C por 90 min.) para liberar los esteroides y someterlos a cromatografía de gases. El cromatograma muestra la aparición de por lo menos tres picos que podrían ser esteroides (fig. 27). El primero de ellos tiene un tiempo de retención (18.44) cercano al del colesterol (18.64); el segundo (20.49) no corresponde a ninguno de los patrones utilizados; finalmente, el tercer pico (22.79) está en una posición cercana a lo que ocupan el estigmasterol y el 3 β -colestanol (tiempo de retención 22.65). Lloyd (1966) comunicó la presencia de ergosterol libre en Prototheca zopfii, caracterizándolo por su espectro de absorción al infrarrojo y al ultravioleta. Es posible que el segundo pico no identificado corresponda a este esteroide.

c) Posición del grupo acilo

A fin de determinar el sitio de acilación de la glucosa, muestras de AEG y EG (200.000 cpm de cada uno) fueron sometidas a degradación de Smith. Para descartar la posibilidad de una deacilación por efecto del tratamiento, se tomaron alícuotas antes y des-

FIGURA 27. Cromatografía de gases del grupo esterilo de EG.



Los EG purificados por DEAE-celulosa y CCD (ver Materiales y Métodos) fueron hidrolizados (0,2 N NaOH en butanol 99%, 100°C, 90 min.) para liberar los esteroides que fueron inyectados con un volumen de 0,5 μ l (en CH_2Cl_2) en una columna de SE-30 3% en vidrio W-AW-DMCS (malla 80-100) de 1,2 m de longitud por 2 mm de diámetro interno, con N_2 como gas portador y un flujo de 27 ml/min. Temperatura de la cámara de inyección: 260°C, y del detector de llama: 310°C. Temperatura de columna: 210°C por 2 min. y luego un aumento de 5°C/min. hasta una temperatura final de 260°C.

pués de la oxidación para ser sometidas a CCD con solvente L. En la tabla VIII pueden observarse los resultados de la misma. En todos los casos la radiactividad migró como una banda única. Se descarta además la posibilidad de una deacilación, pues en ese caso, el tratamiento habría provocado la formación de productos de movilidad similar a los EG.

TABLA VIII. Degradación de Smith de AEG.

| Muestra | Cpm en la muestra original | Cpm en | | | R _f | |
|---------|----------------------------------|----------|-----------|----------|--------------------------|----------------------------|
| | | glicerol | eritritol | sorbitol | antes de la oxidación | después de la oxidación |
| EG | 200.000 | 97.000 | 135 | 89 | 0,1 | 0,2 |
| AEG | 200.000 | 95.000 | 107 | 93 | 0,2 | 0,5 |

Los AEG y EG aislados por columna de DEAE-celulosa y CCD se sometieron a oxidación con periodato. Las muestras fueron luego hidrolizadas (2 N HCl, 3 horas, 100°C en tubo sellado) y reducidas con NaBH₄. Después de lavar las muestras de sales, se cromatografió en papel con solvente E y las zonas del cromatograma correspondientes a los patrones de glicerol, eritritol y sorbitol fueron cortadas y contadas. Se hicieron controles antes y después del tratamiento corriendo alícuotas de las mezclas en CCD en sílica gel G con solvente L. Los R_f de las bandas radiactivas así obtenidas se muestran en la tabla.

La tabla VIII indica que el único producto formado a raíz del tratamiento fue glicerol, lo que significa que la unión puede estar localizada en la posición 2 ó 6 de la glucosa. Dado que la radiactividad recuperada en glicerol tiende a acercarse al 50% (y no al 100%) de la inicial, la ubicación de la unión acilo-glucosa en la posición 6 parece ser la más indicada.

d) Configuración anomérica

Con el objeto de determinar la configuración de la unión este-rol-glucosa se hicieron dos experimentos. Se incubaron (^{14}C)EG purificados con α - y β -glucosidasas. Los resultados se resumen en la tabla IX y muestran que sólo el tratamiento con β -glucosidasa hidrolizó al compuesto, sin tener, aparentemente, efecto alguno el tratamiento con α -glucosidasa.

TABLA IX. Tratamiento con α - y β -glucosidasa de (^{14}C)EG.

| Enzima | Fase butanólica cpm | Fase acuosa cpm | Porcentaje de hidrólisis |
|-----------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|
| α -glucosidasa | 47.900 | 2.812 | 5 |
| β -glucosidasa | 18.168 | 40.700 | 69 |
| blanco sin enzima | 4.437 | 493 | 10 |

Los EG purificados por columna de DEAE-celulosa y CCD se sometieron a hidrólisis enzimática con α - y β -glucosidasa como se indica en Materiales y Métodos. La reacción se detuvo por agregado de butanol, los componentes de la partición resultante fueron luego contados.

Para descartar la posibilidad de que alguna de las enzimas no fuera activa por las características del medio de incubación (que contiene detergente), se realizaron ensayos paralelos en idénticas condiciones con p-nitrofenil- α -D-glucósido y p-nitrofenil- β -D-glucósido. Los resultados indican que ambas enzimas hidrolizaron sus respectivos sustratos en estas condiciones (90% para la α -glucosidasa y 70% para la β -glucosidasa).

Otro experimento confirmando estos resultados se realizó sometiendo los EG a tratamiento alcalino fuerte (0,1 M NaOH en butanol

99%, a 65-68°C por 90 minutos). De esta manera los EG se hidrolizaron liberando un compuesto soluble en agua (92% de la radiactividad) con la movilidad del 1,6-anhidroglucosano en cromatografía en papel con solvente A (fig. 28A).

La identidad del glucosano fue confirmada por hidrólisis ácida (1 N HCl, 100°C por 3 horas en tubo sellado), la cual produjo únicamente glucosa radiactiva a juzgar por su movilidad en cromatografía en papel con el mismo solvente (fig. 28B). Este resultado confirma que la glucosa está unida en una configuración β al esterol, puesto que los α -derivados no forman anhidroglucosanos en las condiciones empleadas (Montgomery y col., 1943).

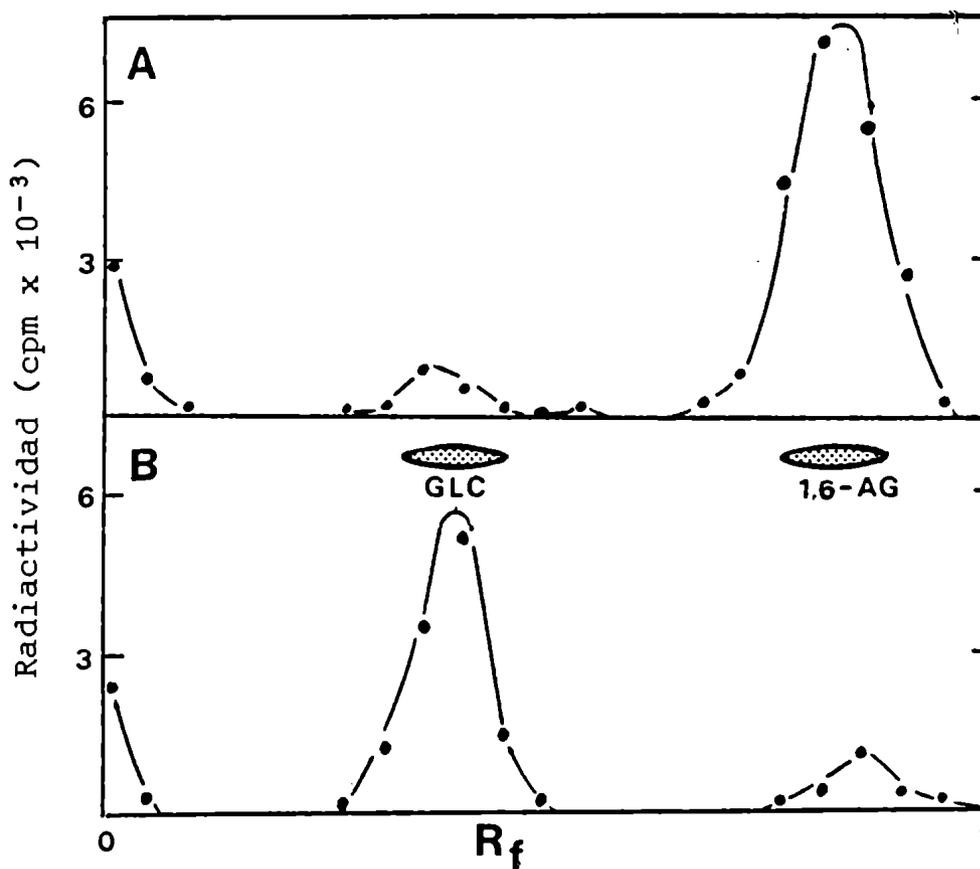


FIGURA 28. Formación del 1,6-anhidroglucosano.

EG Sometidos a hidrólisis alcalina (0,1 M NaOH en butanol 99% por 90 min. a 68-70°C) liberaron radiactividad soluble en agua. A) Cromatografía en papel con solvente A de la fase acuosa así obtenida; B) Idem de la fase acuosa sometida a posterior hidrólisis ácida (1 N HCl, 100°C, 3 horas).

2. Purificación y propiedades de la UDP-Glc:esterol glucosil-transferasa

a) Purificación de la enzima

La enzima glucosilante (EC 2.4.1.-) pudo ser solubilizada con Triton X-100, en una concentración del 0,6%, y parcialmente purificada por pasaje en columna de DEAE-celulosa. En esta etapa la enzima se hizo totalmente dependiente de la presencia de aceptores exógenos (esteroles) para su actividad. Después de una cromatografía en Sephadex G-100, la enzima mostró estar libre de actividad acilante, dado que ni el agregado de EG con extractos lipídicos, ni la incubación en condiciones tipo con extractos lipídicos conteniendo fosfatidil etanolamina mostraron incorporación detectable por CCD a los AEG.

TABLA X. Purificación de la UDP-Glc:esterol glucosil transferasa.

| Fracción | Vol. ml | Proteínas mg | Actividad total pmol/min. | Actividad específica pmol/min.mg | Purifica- ción |
|--|------------|-----------------|---------------------------------|--|-------------------|
| Membranas crudas | 5 | 560 | 8.400 | 15 | 1,0 |
| Triton X-100 | 5 | 68 | 1.860 | 27 | 1,8 |
| DEAE-celulosa | 5 | 7,2 | 402 | 55,8 | 3,7 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (20-60%) | 1 | 0,4 | 144 | 360 | 23,0 |
| Sephadex G-100 | 1 | 0,2 | 42 | 510 | 34,0 |

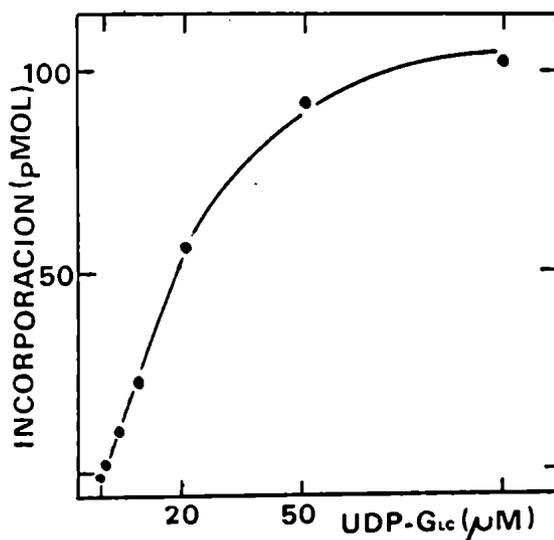
El homogenato resultante de la ruptura celular fue centrifugado a 100.000g x 150 min. para obtener las membranas crudas con las que se llevó a cabo la purificación. Los detalles de la misma se resumen en Materiales y Métodos.

La tabla X muestra que la purificación lleva a una enzima completamente inactiva en ausencia de esteroides con una purificación de 34 veces la actividad específica y un rendimiento del 0,5%.

b) Concentración de UDP-Glc

Al correlacionar la concentración de UDP-Glc y la glucosilación de esteroides se halló que existe una relación de proporcionalidad hasta una concentración aproximada de 2×10^{-5} M (fig. 29).

FIGURA 29. Efecto de la concentración de UDP-Glc.



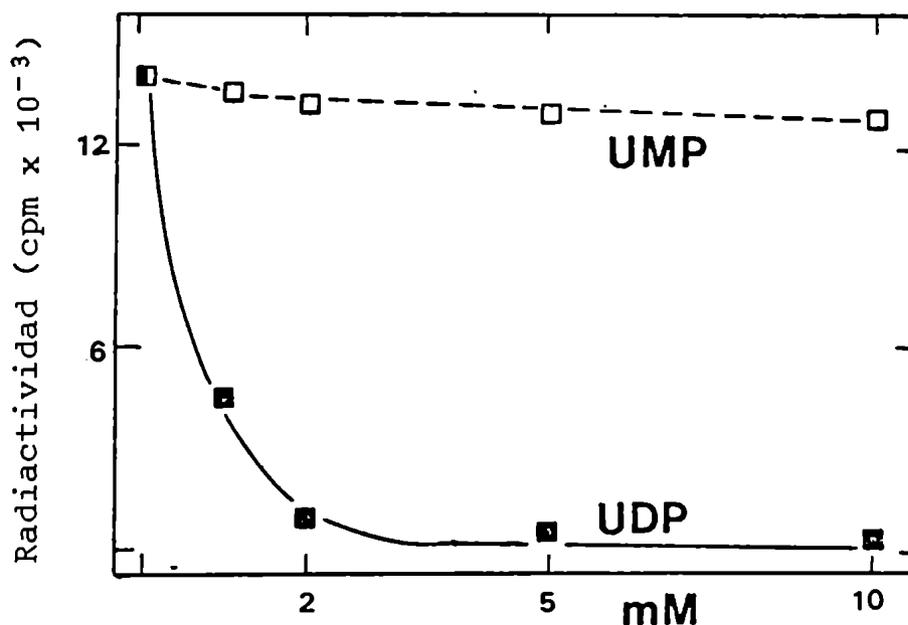
Las incubaciones se realizaron en las condiciones tipo excepto para la concentración de sustrato: 1 nmol de UDP-(14 C)Glc y cantidades variables de UDP-Glc no radiactiva hasta las concentraciones indicadas. Proteína: 115 μg/tubo.

c) Nucleótidos

Se analizó el efecto de UDP y UMP en la incorporación de glucosa a EG. La figura 30 muestra que una concentración de UDP de 2 mM es suficiente para producir una inhibición del 97%; no ocurre así con

UMP que pareciera tener poco efecto en la actividad enzimática. La inhibición por UDP es la esperada para un producto de la reacción.

FIGURA 30. Inhibición por UDP.



Las incubaciones se realizaron en las condiciones habituales excepto para la concentración de UDP (■—■) y UMP (□---□). Proteínas 223 µg/tubo.

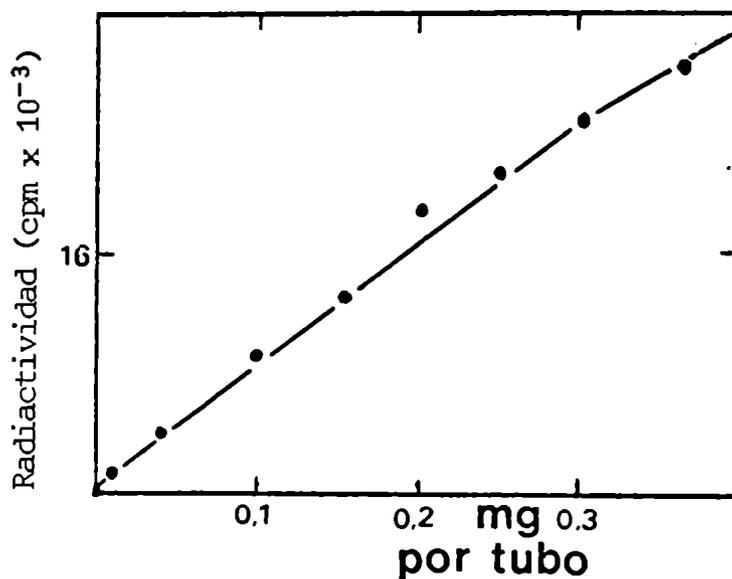
d) Concentración de proteínas

La glucosilación de esteroides se mostró linealmente dependiente de la concentración proteica en el rango en que fue estudiada (fig. 31).

e) Efecto del pH

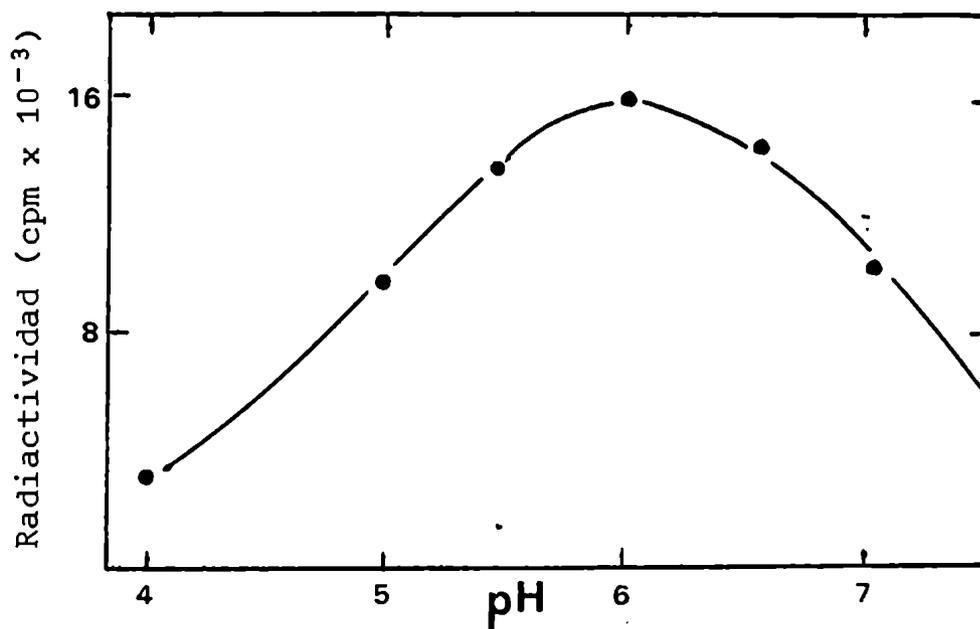
El pH óptimo de la glucosil transferasa resultó ser 6,0 (fig. 31). Este resultado es coincidente con el pH hallado en otros sistemas de plantas superiores (Phaseolus aureus, Bowles y col., 1977).

FIGURA 31. Concentración de proteínas.



Las incubaciones se realizaron en las condiciones tipo excepto para la concentración de proteínas.

FIGURA 32. Efecto del pH.



Las incubaciones se llevaron a cabo en la forma habitual excepto para el pH y el buffer usado (Tris-maleato). Proteínas: 130 μg /tubo.

f) Metales

Al estudiar el requerimiento de metales (tabla XI) no se pudo notar dependencia de los mismos, por el contrario, el agregado de

TABLA XI. Efecto de metales.

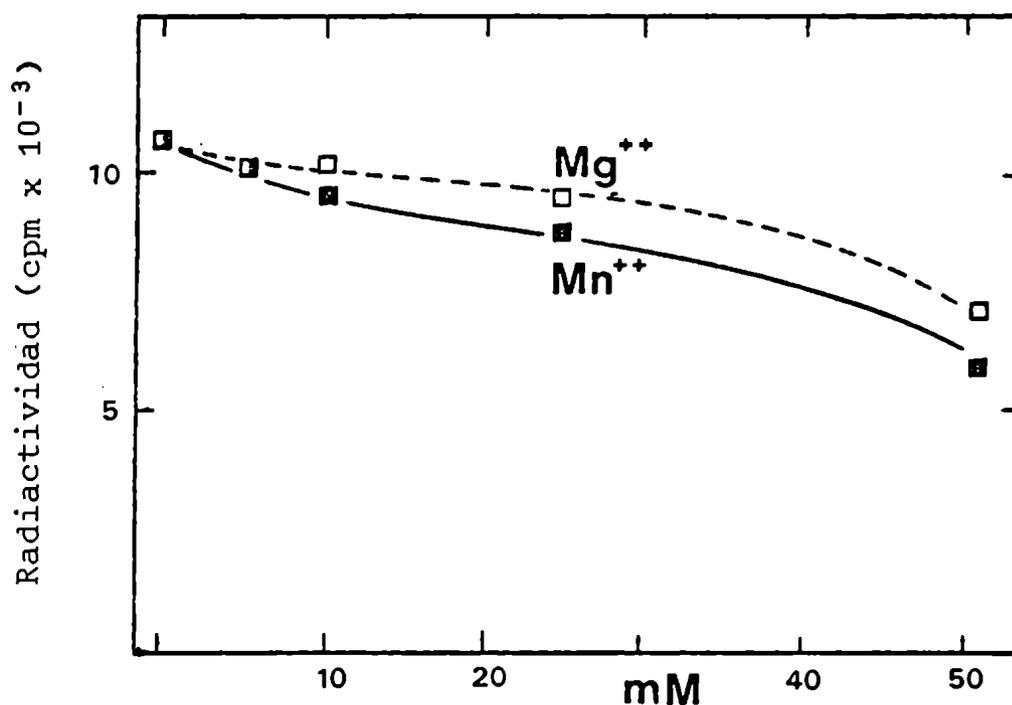
| Adiciones | Incorporación a lípidos cpm |
|---|--------------------------------|
| Ninguna | 12.300 |
| EDTA (1 mM) | 13.951 |
| MgCl ₂ (10 mM) | 10.815 |
| MnCl ₂ (10 mM) | 10.132 |
| CaCl ₂ (10 mM) + EDTA (1 mM) | 11.026 |
| NaCl (10 mM) + EDTA (1 mM) | 12.037 |
| KCl (10 mM) + EDTA (1 mM) | 12.469 |

Las incubaciones fueron las habituales excepto por la presencia de diversas cationes. Proteínas: 130 µg/tubo.

concentraciones relativamente altas de Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ (fig. 33) producen una inhibición parcial de la transferencia de glucosa a lípidos.

g) Temperatura

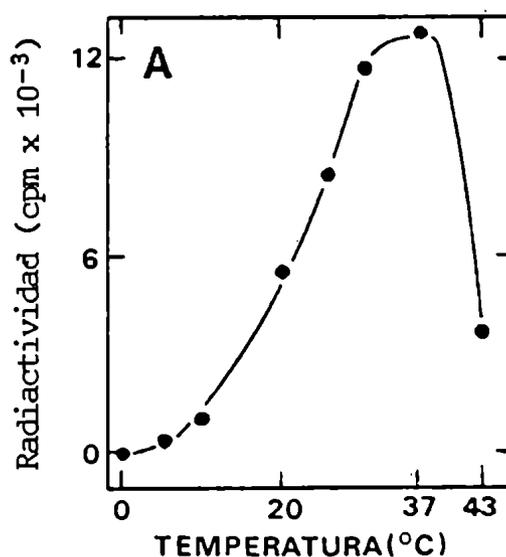
Se realizaron incubaciones a diferentes temperaturas a fin de estudiar su efecto en la actividad enzimática, La actividad máxima se notó a los 37°C (fig. 34).

FIGURA 33. Concentración de Mg^{++} y Mn^{++} .

Las incubaciones se realizaron en la forma descrita en Materiales y Métodos excepto para la concentración de cationes. Proteínas: 310 μg /tubo.

FIGURA 34. Efecto de la temperatura.

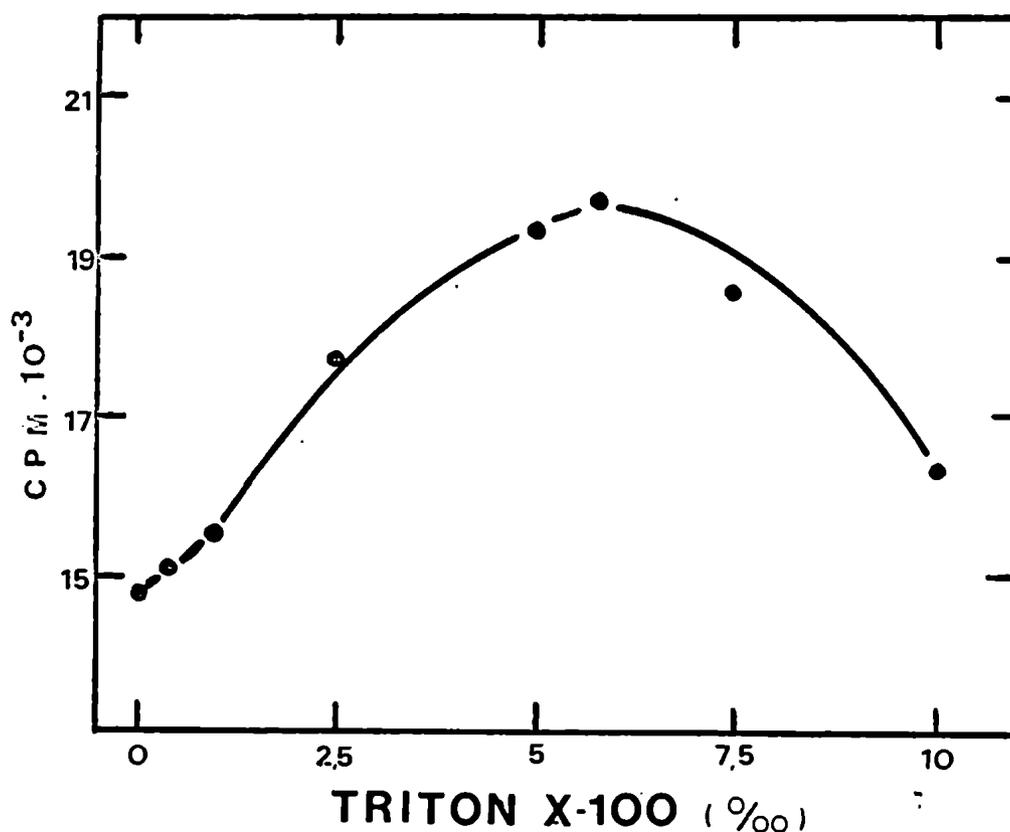
Las incubaciones se realizaron por 60 minutos a distintas temperaturas. Proteínas: 130 μg /tubo.



h) Detergente

El agregado de Triton X-100 estimuló la incorporación de glucosa aun en ausencia de esteroides exógenos. La estimulación fue mayor a una concentración de detergente de 0,6% final (fig. 35).

FIGURA 35. Efecto de Triton X-100.



Las incubaciones contuvieron concentraciones crecientes de Triton X-100 además de los componentes de la mezcla tipo.

i) Especificidad de sustrato

Distintos nucleótido azúcares fueron incubados con la fracción particulada P₁₀₀. La tabla XII muestra que solo se forman glucolípidos cuando se incubaba con UDP-Glc; los otros glicosil nucleótidos

no pudieron servir como sustratos para la glucosil transferasa, con excepción de UDP-Gal. Este último resultado puede ser explicado por la presencia de una epimerasa en el sistema, que transforma la galactosa en glucosa. Esta presunción se confirmó por el hecho de que al someter el glicolípido formado a hidrólisis ácida fuerte, el 75% de la radiactividad liberada tuvo una movilidad similar a la glucosa en cromatografía en papel con solvente A.

TABLA XII. Incorporación de azúcares de diferentes nucleótidos lípidos.

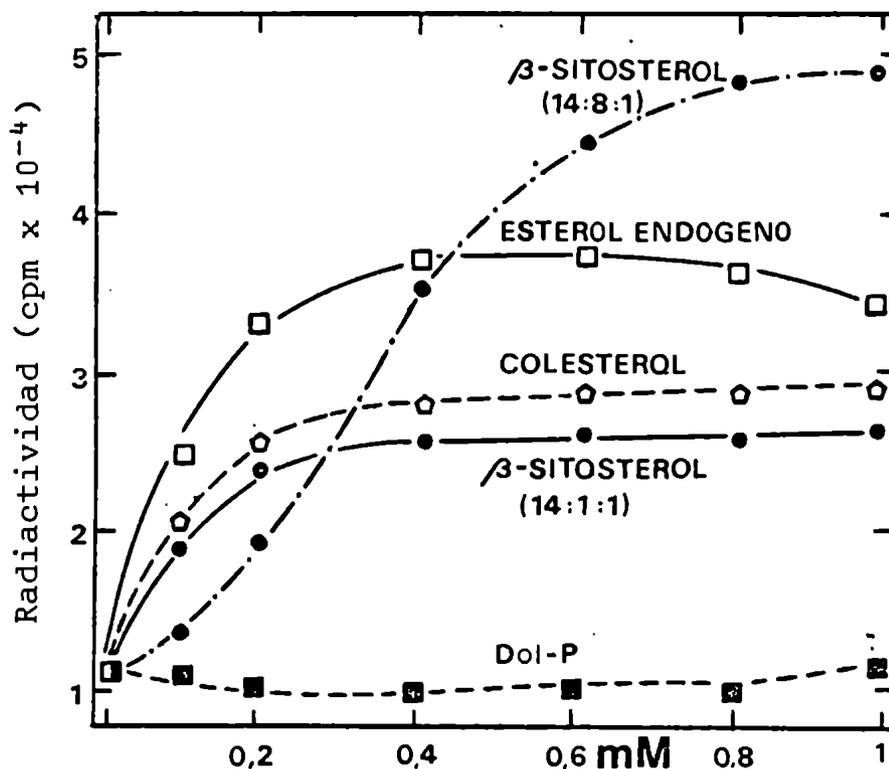
| Nucleótido azúcares | Incorporación a glicolípidos pmoles | Porcentaje de incorporación |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| UDP-[¹⁴ C]Glc | 23,34 | 8,00 |
| ADP-[¹⁴ C]Glc | 0,37 | 0,08 |
| GDP-[¹⁴ C]Glc | 0,90 | 0,15 |
| UDP-[¹⁴ C]Ara | 1,58 | 0,40 |
| UDP-[¹⁴ C]Gal | 7,88 | 3,00 |
| UDP-[¹⁴ C]NAcGlc | 0,50 | 0,12 |
| UDP-[¹⁴ C]Xil | 0,19 | 0,05 |
| GDP-[¹⁴ C]Man | 0,38 | 0,10 |

Las incubaciones se realizaron en las condiciones tipo excepto para los nucleótido azúcares que fueron: UDP-[¹⁴C]Glc (300 pmoles); ADP-[¹⁴C]Glc (500 pmoles); GDP-[¹⁴C]Glc (600 pmoles); UDP-[¹⁴C]Ara (400 pmoles); UDP-[¹⁴C]Gal (250 pmoles); UDP-[¹⁴C]NAcGlc (400 pmoles); UDP-[¹⁴C]Xil (400 pmoles) y GDP-[¹⁴C]Man (350 pmoles). La fase butanólica de extracción fue analizada por cromatografía de intercambio iónico, como se indica en Materiales y Métodos, o alternatively por conteo de la fase butanólica después de hidrólisis ácida suave.

j) Esteroles exógenos

Para estudiar la especificidad de la enzima con respecto al esterol, se incubó con esteroles de distinto origen y concentración. La figura 36 muestra que todos los esteroles ensayados provocaron estimulación de la formación de EG denotando una falta de especificidad de la enzima hacia los mismos, lo cual contrasta con la alta especificidad manifestada hacia los nucleótido azúcares. Sin embargo,

FIGURA 36. Efecto de esteroles exógenos.



Las incubaciones se realizaron en la forma indicada en Materiales y Métodos excepto para el tipo y la concentración de esteroles exógenos y lecitina cruda de soja. La concentración de esteroles se determinó por el método del FeCl_3 utilizando colesterol como standard. Los esteroles endógenos fueron purificados por precipitación con digitonina. ●—● β -sitosterol:lecitina:Triton X-100 (14:1:1, p/p); ○—○ β -sitosterol:lecitina:Triton X-100 (14:8:1, p/p); ◇—◇ colesterol:lecitina:Triton X-100 (14:1:1, p/p); □—□ esteroles endógenos:lecitina:Triton X-100 (14:1:1, p/p); ■—■ dolicol fosfato (0,6% Triton X-100).

si se compara sobre bases equimoleculares el extracto de esteroides endógenos se mostró más eficaz que colesterol o β -sitosterol, lo cual indica una afinidad diferencial respecto al lípido aceptor. El agregado de L- α -lecitina cruda aumenta notablemente la eficiencia del sistema, lo cual puede deberse a la presencia de algún factor que active la segunda fase de la reacción, es decir la formación de AEG. El agregado de otro tipo de lípidos no relacionados, como los poliprenil fosfatos, no mostró ningún efecto (fig. 36) demostrando que no existe relación alguna entre la formación de poliprenilfosfato azúcares y la de esteril glucósidos.

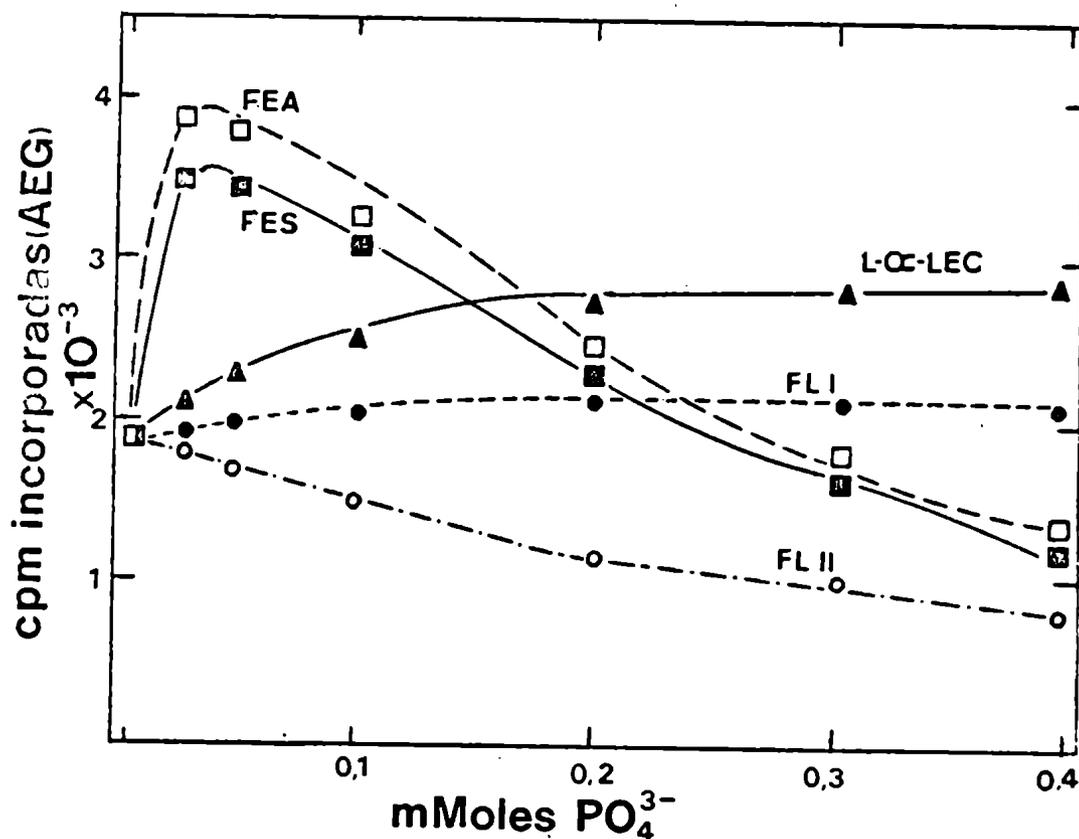
3. Efecto de la fosfatidil etanolamina

Al observar el efecto de la L- α -lecitina en la incorporación de (^{14}C)glucosa a lípidos, se intentó identificar la especie molecular responsable de tal comportamiento. Con este fin se procedió a aislar los componentes de este extracto lipídico mediante cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Resultados preliminares (Axelos y Péaud-Lenoël, 1972) indican que la fosfatidil etanolamina (FE) podría ser la activadora. Se purificó FE de soja y alga por cromatografía preparativa en capa delgada (método de Nichols y James, 1974) después de la preliminar columna de DEAE-celulosa. La figura 37 muestra el efecto producido por las distintas fracciones obtenidas del extracto lipídico así como el de la lecitina sin purificar.

Se aisló de la misma manera FE de P. zopfii y pudo observarse que su efecto no difería significativamente de la aislada de lecitina de soja. Resulta evidente que la FE es responsable específicamente del efecto activador de la L- α -lecitina notado en la figura 36.

Con el objeto de estudiar si la activación de la FE era específica en la formación de AEG, se hicieron dos tipos de ensayos, empleando diferentes sustratos. En el primer caso se trató de condiciones tipo como las empleadas hasta el momento con UDP-(^{14}C)Glc como

FIGURA 37. Efecto de lípidos en la incorporación a AEG.



Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 30 minutos en un volumen final de 50 μ l conteniendo: 20.000 cpm de (¹⁴C)EG, 0,1 mM UDP-Glc no radiactiva, 0,6% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 6,0) y los siguientes lípidos en las concentraciones que se indican: □---□, fosfatidil etanolamina del alga *P. zopfii* (FEA); ■—■, fosfatidil etanolamina de soja (FES); ▲—▲, L- α -lecitina cruda de soja (L- α -LEC); ●---●, fracción lipídica I (FL I) (ver Materiales y Métodos); o---o, fracción lipídica II (FL II). La concentración lipídica se estimó a través de su contenido de fósforo total. La reacción fue detenida y extraída con butanol. La fase orgánica fue sometida a CCD con solvente N. Las zonas del cromatograma correspondientes a la ubicación de AEG fueron raspadas de la placa y contadas.

sustrato. En el segundo caso se utilizó (^{14}C)EG purificado. En ambos experimentos (tabla XIII) se notó un aumento en la formación de AEG, sugiriendo que la FE activa específicamente la formación de los mismos. Además, la transferencia de radiactividad de EG a AEG en el segundo experimento insinúa que el primer compuesto es un sustrato para la formación del segundo.

TABLA XIII. Efecto de la FE.

| Sustrato | FE | EG cpm | AEG cpm |
|----------------------------|----|-----------|------------|
| UDP-(^{14}C)Glc | - | 18.680 | 9.006 |
| UDP-(^{14}C)Glc | + | 17.931 | 19.415 |
| (^{14}C)EG | - | 29.862 | 13.234 |
| (^{14}C)EG | + | 21.437 | 24.563 |

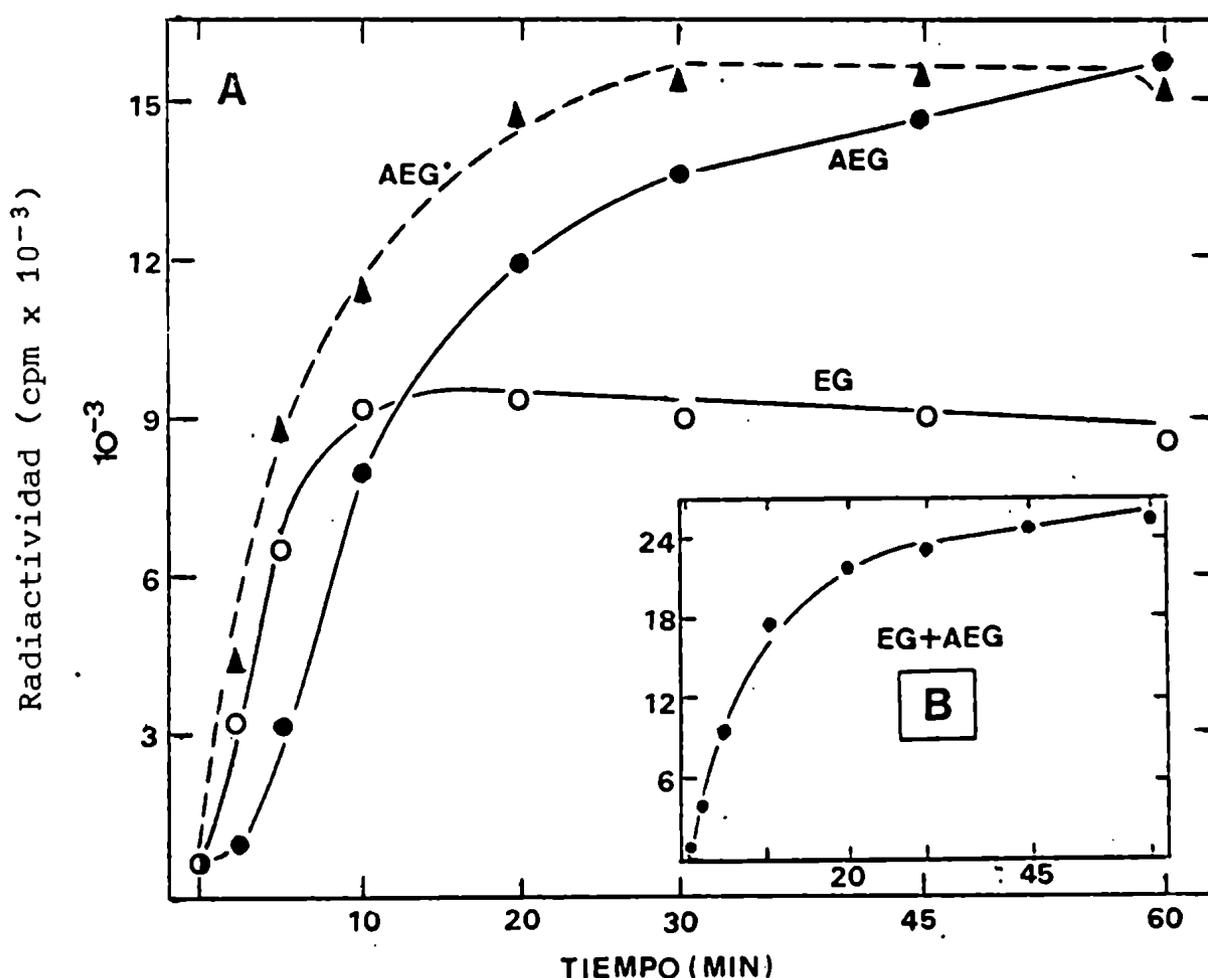
Las incubaciones se realizaron por 30 minutos a 30°C en un volumen final de 50 μl conteniendo: 50 mM HEPES (pH 6,0), 0,6% Triton X-100, 150.000 cpm de UDP-(^{14}C)Glc (268 Ci/mol) o 100.000 cpm de (^{14}C)EG (con 0,1 M UDP-Glc no radiactiva) y 25 μmoles de FE en los casos que se indican. La reacción fue detenida y extraída con butanol. El extracto fue luego sometido a hidrólisis ácida suave, para eliminar glucolípidos polares, y la fase orgánica resultante fue sometida a CCD con solvente N. Las zonas del cromatograma correspondientes a EG y AEG fueron raspadas de la placa y contadas.

4. Formación de EG y AEG en el tiempo

A fin de confirmar el mecanismo de reacción que supone que los AEG se forman a partir de los EG se llevaron a cabo experimentos a distintos tiempos. La figura 38 muestra que la aparición de EG y

AEG es coherente con esta teoría; finalmente la modificación del patrón de formación de AEG cuando se utiliza EG como sustrato confirma la relación sustrato/producto de los mismos.

FIGURA 38. Formación de glucolípidos en función del tiempo.



Las incubaciones se realizaron en los tiempos que se indican a 20°C en un volumen total de 50 μ l, conteniendo 50 mM HEPES (pH 6,0), 0,5 mM β -sitosterol:L- α -lecitina:Triton X-100 (14:8:1, p/p) y 400 pmoles de UDP-(¹⁴C)Glc. La extracción y análisis de productos se realizaron como se indica en la tabla XIII. A: ●—●, AEG; ○—○, EG. B: AEG + EG (radiactividad total incorporada a lípidos neutros). ▲---▲ (AEG*): acilesteril glucósidos formados cuando se utilizan 100.000 cpm de (¹⁴C)EG y 0,1 mM UDP-Glc no radiactiva como sustratos.

5. Localización subcelular

A fin de investigar el sitio específico de síntesis de EG y AEG se hicieron incubaciones con UDP(¹⁴C)Glc y β-sitosterol con diferentes fracciones subcelulares de P. zopfii. La tabla XIV muestra la actividad específica de las enzimas marcadoras en las diferentes fracciones y de la UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa. Los resultados indican que el sitio de biosíntesis en algas es el aparato de Golgi, lo cual está de acuerdo con lo encontrado en plantas superiores (Forsee y col., 1974; Lercher y Wojciechowski, 1976; Bowles y col., 1977).

TABLA XIV. Actividades específicas de enzimas marcadoras y UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa en diferentes fracciones subcelulares.

| Fracción | Ubiquinona nmol | 5'-nucleotidasa | | Glc-6-Pasa | | Tiamina pirofosfatasa | | UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa pmol/min·mg |
|-----------------------|--------------------|-----------------|------|-------------|------|--------------------------|-------|---|
| | | nmol/min·mg | AER | nmol/min·mg | AER | nmol/min·mg | AER | |
| Mitochondrias | 407 | 10,7 | 0,12 | 10,7 | 0,03 | 8,6 | 0,11 | 1,98 |
| Retículo endoplásmico | 16 | 20,6 | 0,24 | 929,0 | 3,12 | 68,6 | 0,91 | 9,36 |
| Membrana plasmática | 98 | 80,2 | 2,80 | 25,8 | 0,08 | 28,6 | 0,38 | 14,40 |
| Aparato de Golgi | 30 | ND | ND | 11,8 | 0,03 | 202,1 | 10,80 | 36,36 |

• Las fracciones fueron separadas por centrifugación diferencial y en gradientes discontinuos de sacarosa. Los ensayos enzimáticos fueron hechos con alícuotas de 0,1 ml de las diferentes fracciones, excepto el de la UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa. Las incubaciones se realizaron por 30 minutos a 30°C en un volumen de 50 µl, conteniendo 50 mM HEPES (pH 6,0), 0,5 mM β-sitosterol-lecitina-Triton X-100 (14:8:1, p/p), 400 pmoles de UDP-(¹⁴C)Glc y 30 µl de suspensión subcelular. El contenido en ubiquinona fue detectado por su absorbancia en el ultravioleta a 275 nm. ND: no detectado. AER: actividad específica relativa:actividad específica en la fracción/actividad específica en el homogenato.

II. GLUCOLIPIDOS POLARES: CARACTERIZACION Y BIOSINTESIS

1. Caracterización del lípido aceptor

Extractos butanólicos procedentes de incubaciones con UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ y membranas de P. zopfii (P_{100}) fueron cromatografiadas en columna de DEAE-celulosa equilibrada con metanol al 99% y eluída con 0,4 M acetato de amonio (fig. 23). Una fracción de glucolípidos (20%) pudo ser eluída de esta forma indicando que posee propiedades ácidas. Un tratamiento ácido suave (0,01 N HCl, 100°C, 10 min.) de los mismos provocó una rápida hidrólisis, solubilizándose el 76% de la radiactividad en la fase acuosa. Estas dos propiedades, carga negativa y labilidad a la acidez suave, sugieren que el lípido aceptor puede ser un poliprenil fosfato. A fin de investigar más en detalle esta posibilidad, se hicieron incubaciones con poliprenil fosfatos exógenos. La tabla XV muestra que tanto Dol-P como Fic-P estimulan la incorporación de radiactividad a glucolípidos polares. El agregado de otro tipo de lípidos, como esteroides, no afectó la incorporación.

TABLA XV. Efecto de lípidos exógenos en la formación de glucolípidos polares.

| Lípido | Glucolípidos polares (cpm) |
|---------------------|----------------------------|
| Ninguno. | 998 |
| Dol-P | 8.000 |
| Fic-P | 3.700 |
| β -sitosterol | 900 |
| Colesterol | 870 |

Las incubaciones fueron llevadas a cabo en las condiciones tipo con excepción del agregado de 0,6% Triton X-100 y 2 nmoles de los distintos lípidos. Proteínas: 220 $\mu\text{g}/\text{tubo}$.

Este experimento apoya nuestra suposición de estar en presencia de poliprenil fosfatos, dado que la enzima muestra especificidad hacia este tipo de sustratos para su glucosilación.

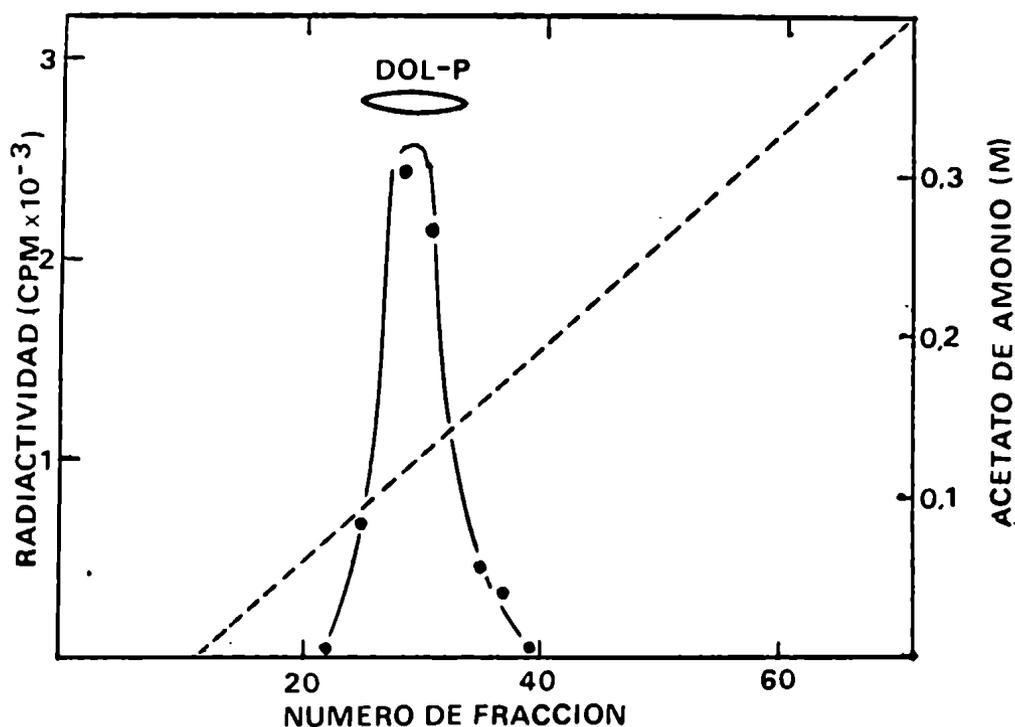
a) Aislamiento y propiedades del lípido aceptor endógeno

Las evidencias hasta aquí presentadas indican que estamos en presencia de un lípido ácido aceptor de glucosa que podría ser un poliprenil fosfato. Para tener datos más directos respecto de la naturaleza del lípido endógeno, se procedió a aislarlo para estudiar sus propiedades. Extractos clorofórmicos de *P. zopfii* fueron cromatografiados en columna de DEAE-celulosa y eluidos con un gradiente lineal de acetato de amonio. Las fracciones resultantes fueron ensayadas a fin de detectar su capacidad aceptora de glucosa en presencia de enzima P_{100} y UDP-Glc.

La figura 39 muestra la aparición de un solo pico, que eluyó a una concentración de acetato de amonio de 0,120 M. Un resultado similar se obtuvo cuando Dol-P fue cromatografiado de la misma manera.

Alícuotas del pico fueron sometidas a tratamiento ácido suave (pH 2, 100°C, 10 min.) al igual que muestras de Dol-P y Fic-P, y luego ensayadas a fin de medir su capacidad aceptora. Los resultados se muestran en la tabla XVI e indican que tanto el Dol-P como el lípido endógeno permanecieron inalterados después del tratamiento, pues conservaron su propiedad de ser glucosilados, no siendo así el caso del Fic-P que perdió esta capacidad. Este resultado sugiere que el lípido endógeno tiene el extremo α saturado igual que el dolicol. El tratamiento alcalino suave (condiciones de saponificación) produjo una pérdida de capacidad aceptora del 12, 11 y 23% en el lípido endógeno aislado, Dol-P y Fic-P respectivamente, con lo cual se descarta la posibilidad de que el lípido endógeno fuese un éster de ácidos grasos.

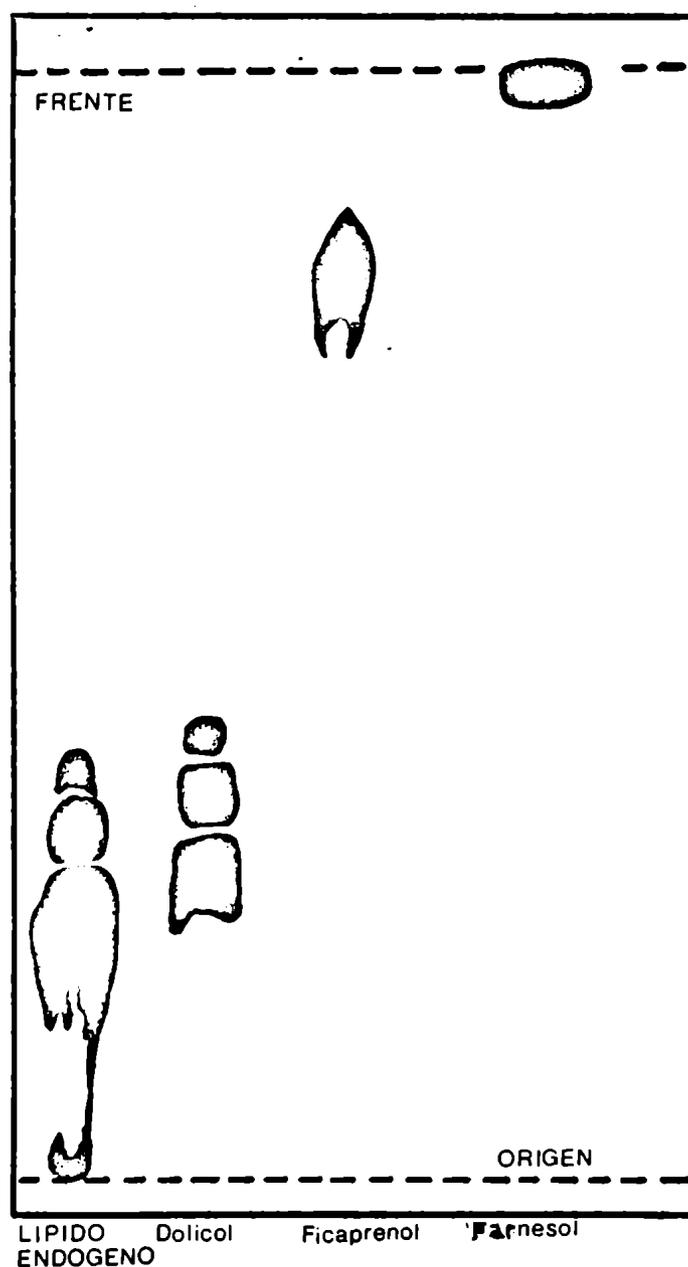
FIGURA 39. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del lípido aceptor endógeno.



Cada fracción fue ensayada para detectar actividad en presencia de enzima P₁₀₀. Estas preparaciones tienen capacidad aceptora endógena, y la figura representa únicamente la activación producida por el material agregado.

Condiciones alcalinas más drásticas (60% KOH acuoso en etanol absoluto a 70°C por 30 min. bajo N₂) produjeron la solubilización del lípido endógeno en éter de petróleo, presumiblemente por hidrólisis del fosfato. Cuando esta fase orgánica fue cromatografiada en fase invertida, lo que permite apreciar su largo de cadena, migró en forma similar al Dol (C₁₀₀) de hígado (fig. 40) y muy lejos tanto del Fic (C₅₅) como del farnesol (C₁₅), lo cual indica un largo de cadena similar al Dol.

FIGURA 40. Cromatograma del lípido endógeno libre.



El lípido endógeno fue hidrolizado con KOH y cromatografiado en fase invertida en capa delgada, con placas de Kieselguhr G corridas con acetona. El cromatograma fue revelado con vapores de iodo.

TABLA XVI. Tratamientos ácido y alcalino del lípido aceptor endógeno aislado y poliprenil fosfatos.

| Lípido aceptor | Capacidad aceptor de glucosa | | | |
|----------------|------------------------------|---------------|------------------|--|
| | No tratados cpm | Tratamiento | | |
| | | ácido cpm (%) | alcalino cpm (%) | |
| AL-P | 3.415 | 3.041 (12) | 2.994 (12) | |
| Dol-P | 5.322 | 4.037 (10) | 4.793 (11) | |
| Fic-P | 4.007 | 510 (87) | 3.107 (23) | |

Las muestras fueron tratadas con 0,01 N HCl, 10 min. a 100°C y 0,1 N KOH a 37°C por 1 hora. Los lípidos fueron extraídos con butanol y luego ensayados para medir su capacidad aceptor de glucosa con enzima P₁₀₀. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de hidrólisis. AL-P: lípido endógeno de alga.

b). Propiedades del aceptor glucosilado

A fin de obtener más datos que confirmen la α -saturación del poliprenol se llevaron a cabo hidrólisis con fenol y reducción catalítica del aceptor glucosilado. Muestras de AL-P-(¹⁴C)Glc, Dol-P-(¹⁴C)Glc y Fic-P-(¹⁴C)Glc fueron tratadas con fenol al 50% a 68-70°C por espacio de 3 horas. En estas condiciones el Fic-P-(¹⁴C)-Glc preparado con enzima de alga fue hidrolizado, y la radiactividad se hizo soluble en agua. Electroforesis de esta fracción acuosa demostró que el producto es, principalmente, glucosa fosfato (fig. 41). En contraste, tanto Dol-P-(¹⁴C)Glc como el lípido endógeno glucosilado, no fueron hidrolizados por este método y la radiactividad permaneció soluble en la fase orgánica (tabla XVII).

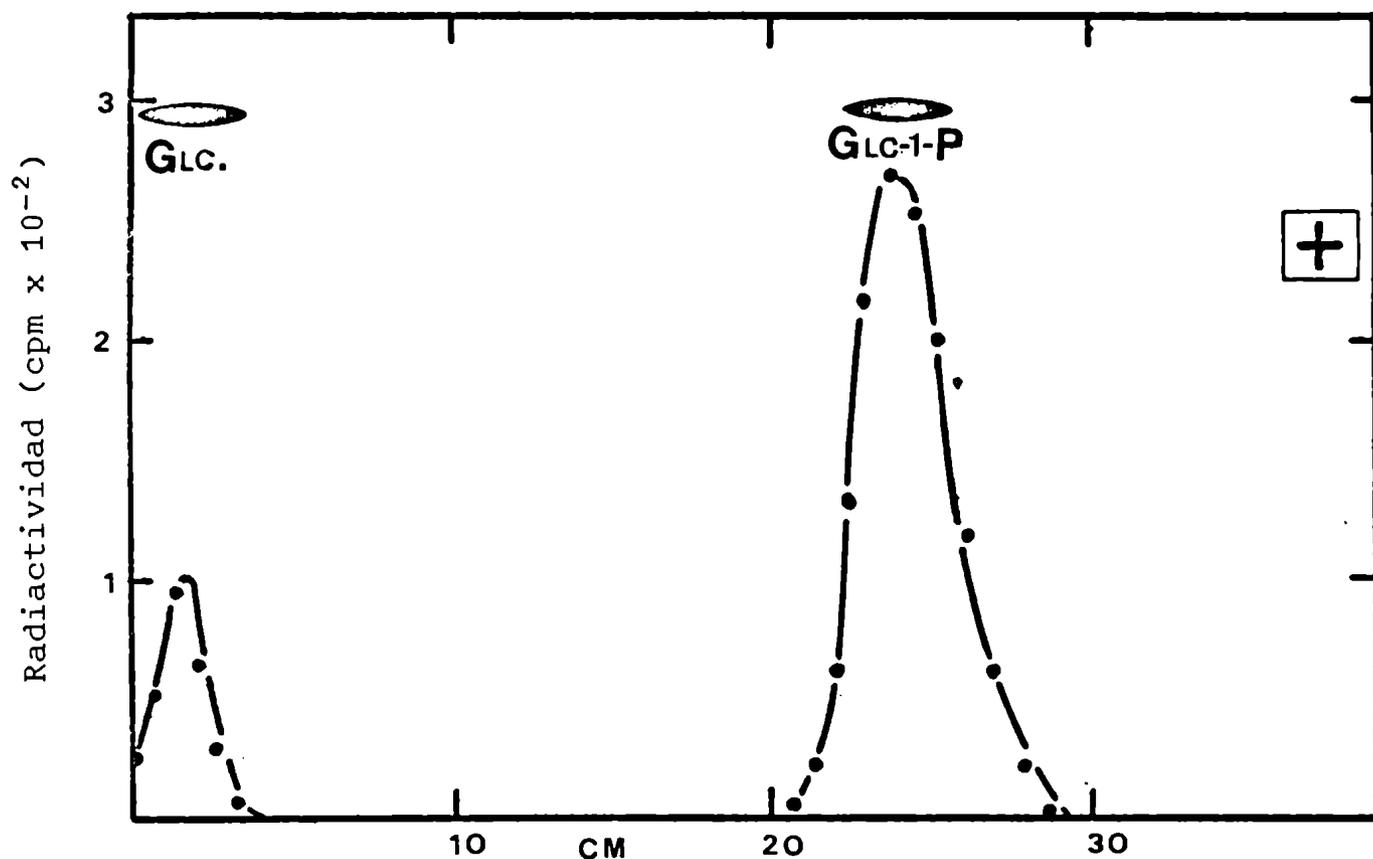
TABLA XVII. Tratamiento fenólico y reducción catalítica de lípidos glucosilados.

| Tratamiento | Glucolípidos | Fase orgánica cpm | Fase acuosa cpm | Hidrólisis |
|----------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------|------------|
| Fenol | AL-P-(¹⁴ C)Glc | 2.375 | 146 | 6,8 |
| | Dol-P-(¹⁴ C)Glc | 1.336 | 65 | 5,6 |
| | Fic-P-(¹⁴ C)Glc | 213 | 1.956 | 90,2 |
| Reducción catalítica | AL-P-(¹⁴ C)Glc | 8.362 | 779 | 9,5 |
| | Dol-P-(¹⁴ C)Glc | 3.616 | 775 | 17,7 |
| | Fic-P-(¹⁴ C)Glc | 691 | 5.436 | 89,7 |

Las muestras fueron tratadas con fenol al 50% a 68-70°C por 3 horas y las fases acuosa y fenólica separadas como se describe en Materiales y Métodos. La reducción catalítica se llevó a cabo con H₂ y catalizador de platino en butanol saturado en agua por 4 horas. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido después de extraer las fases de la partición fenol-agua.

Resultados similares se obtuvieron por reducción catalítica. La tabla XVII muestra que ni el Dol-P-(¹⁴C)Glc ni el aceptor endógeno glucosilado fueron hidrolizados en estas condiciones, en cambio cerca del 90% de la marca del Fic-P-(¹⁴C)Glc se hizo soluble en agua.

Para confirmar el largo de cadena, se comparó el aceptor glucosilado con muestras de Dol-P-Glc y Fic-P-Glc por CCD en dos sistemas diferentes.

FIGURA 41. Electroforesis de Fic-P-(^{14}C)Glc hidrolizado con fenol.

La fase acuosa resultante del tratamiento fenólico de Fic-P-(^{14}C)Glc fue sometida a electroforesis en papel con buffer Q.

Las figuras 42 y 43 muestran claramente que el lípido glucosilado tiene, consistentemente, un R_f similar al Dol-P-Glc en ambos sistemas, y no el de esperarse si tuviera un largo de cadena parecido al del ficaprenol.

FIGURA 42. CCD del aceptor glucosilado con solvente Ñ.

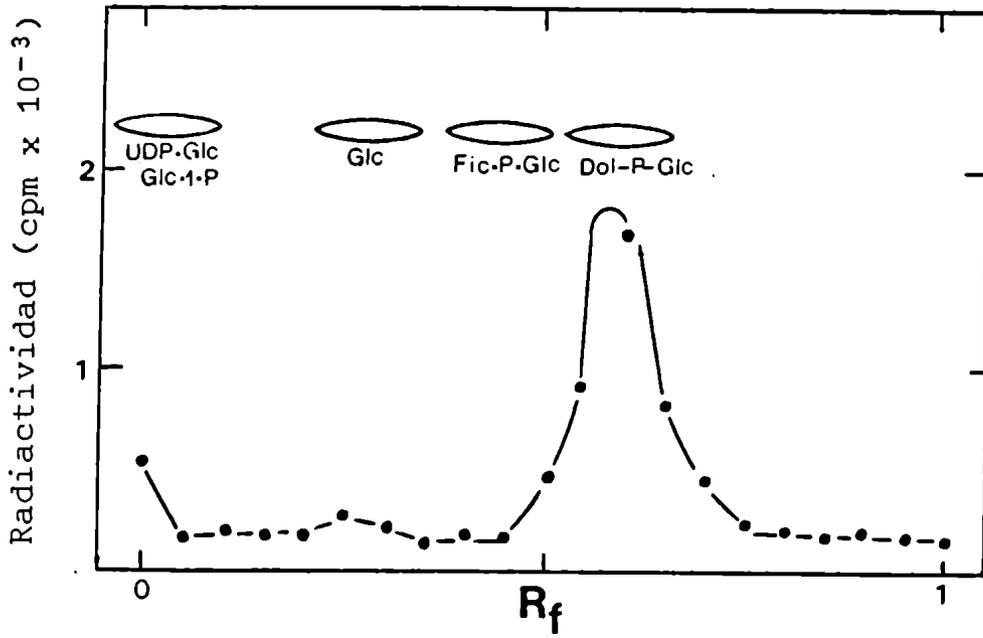
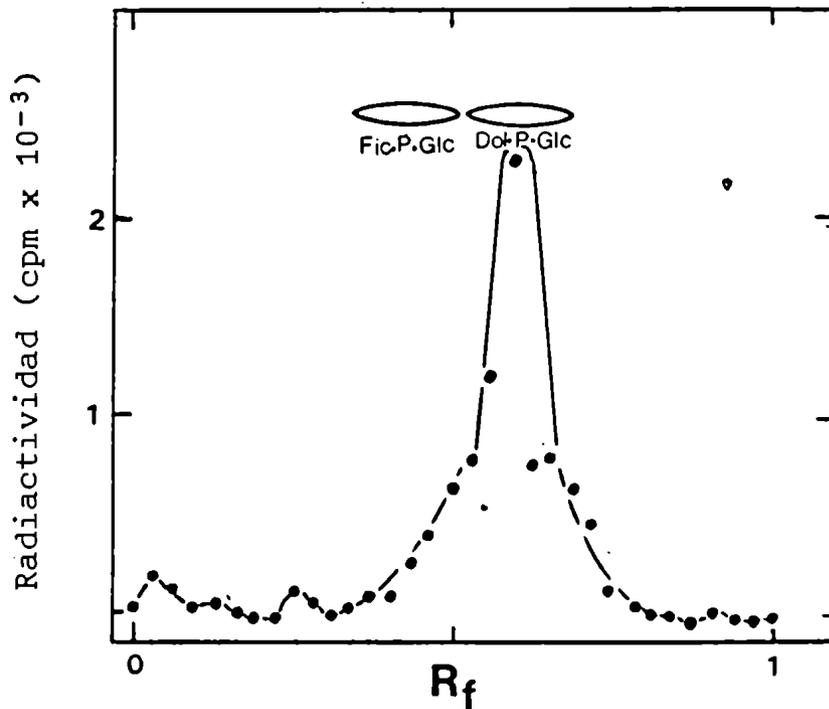


FIGURA 43. CCD del aceptor glucosilado con solvente O.



2. Biosíntesis del lípido aceptor

Los resultados hasta aquí presentados indican que el lípido aceptor de alga es un poliprenil fosfato similar al Dol-P de hígado tanto en largo de cadena como en saturación del extremo α .

Evidencias directas de la naturaleza isoprénica del lípido fueron obtenidas por biosíntesis a partir de un precursor específico: el ácido mevalónico.

a) Análisis de fracciones

Preparaciones enzimáticas (S_{25}) fueron incubadas en presencia de RS-[2- ^{14}C]MVA. La tabla XVIII muestra la incorporación de radiactividad en las diferentes fracciones.

TABLA XVIII. Incorporación de radiactividad a partir de (^{14}C)MVA en las distintas fracciones.

| Fracción | Radiactividad incorporada | |
|---|---------------------------|-----------------------------|
| | cpm | Porcentaje de incorporación |
| Alcoholes libres e hidrocarburos | 112.300 | 2,4 |
| Poliprenil fosfatos | 100.000 | 2,0 |
| Acido lábiles | 15.200 | 0,3 |
| Acido estables | 79.000 | 1,6 |
| Eluído de LH-20 que cocromatografía con Dol-P | 35.000 | 0,7 |

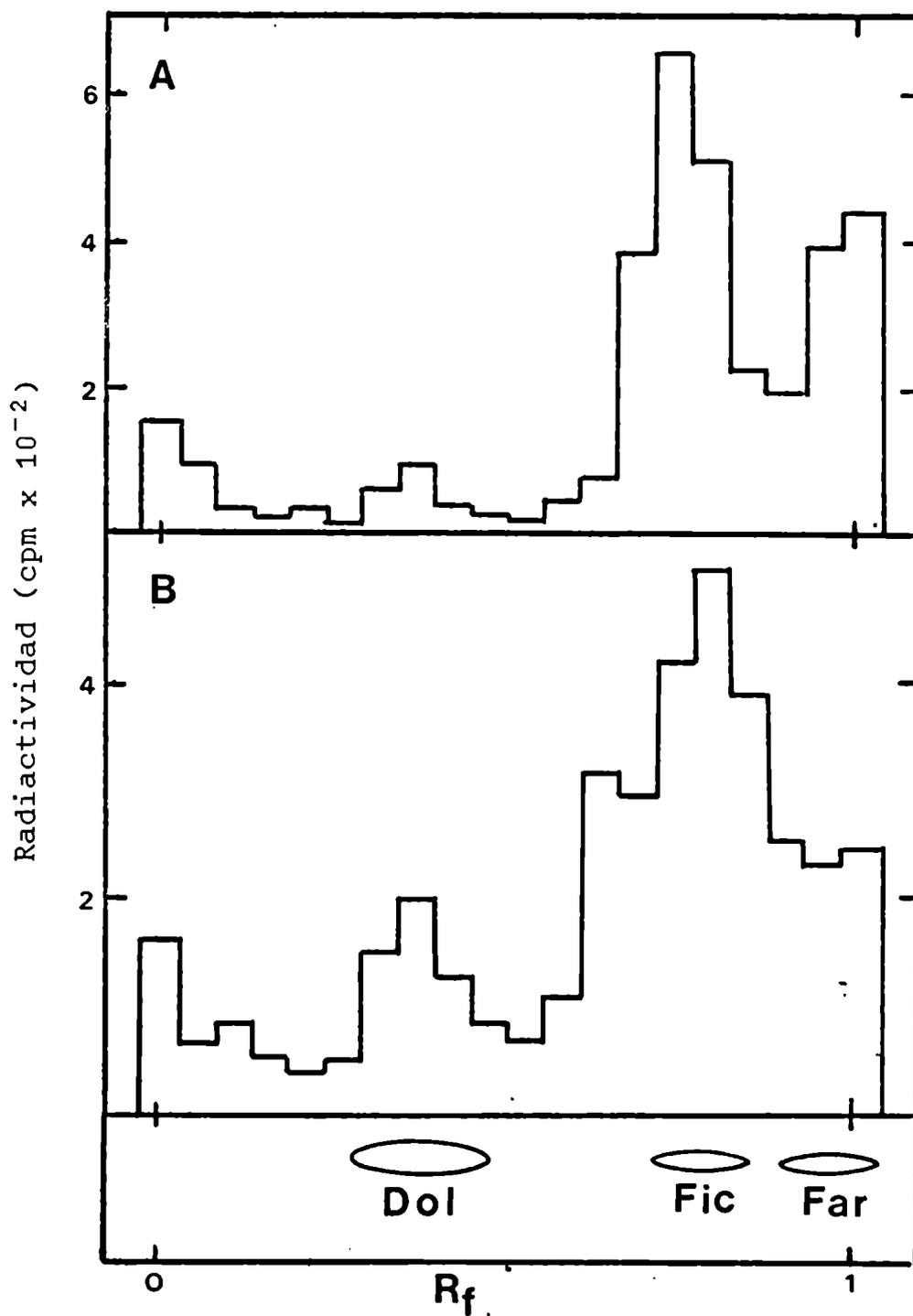
Se llevaron a cabo incubaciones con (^{14}C)MVA en 10 tubos en condiciones tipo y se extrajo en la forma descripta en Materiales y Métodos. Los porcentajes de incorporación se calcularon en base al isómero metabólicamente activo.

La fracción extraída con hexano estaba compuesta por alcoholes libres, probablemente hidrolizados por acción de fosfatasa endógenas, y en ella podrían estar representados algunos intermediarios, como así también otros productos isoprenicos (por ej. terpenos). El análisis de esta fracción por CCD en fase invertida (fig. 44A) demuestran que estaba compuesta por alcoholes de diversos largos de cadena, principalmente cortos. El 2% de la radiactividad (del isómero activo) fue recuperada en la fracción cloroformo-metanol (2:1, v/v) indicando la formación de poliprenil fosfatos. Los poliprenil fosfatos alílicos fueron hidrolizados por tratamiento ácido y separados de los ácidos resistentes por extracción con hexano. El 15% de los poliprenil fosfatos se liberaron de este modo. El análisis de esta fracción (fig. 44B) demostró que la radiactividad se distribuyó entre prenoles de cadena corta, fundamentalmente media como el Fic (C₅₅) y larga como el Dol (C₁₀₀).

Para analizar los poliprenoles resistentes a hidrólisis ácida se realizaron incubaciones con fosfatasa alcalina a fin de obtener los alcoholes libres y someterlos a CCD. El 45% de la radiactividad pudo ser hidrolizada de esta forma. Los resultados de este tratamiento (fig. 46A) solo pueden ser interpretados en forma cualitativa. Se sabe (Kurokawa y col., 1971) que los poliprenil fosfatos de cadena larga son difícilmente hidrolizados por fosfatasa alcalina, siendo los de cadena corta un mejor sustrato. Por eso, dado que existe un promedio del 2% de contaminación de isopentenil fosfato en la fracción cloroformo-metanol (2:1, v/v), su relación aumenta al ser analizados después del tratamiento enzimático. Sin embargo, la mayor parte de la radiactividad tuvo un comportamiento cromatográfico similar al Dol (fig. 46A).

A fin de buscar un sistema más reproducible, una alícuota de los poliprenil fosfatos resistentes a hidrólisis ácida fueron cromatografiados en una columna de Sephadex LH-20 junto a muestras no radiactivas de Dol-P y Fic-P. El perfil de elución se muestra en

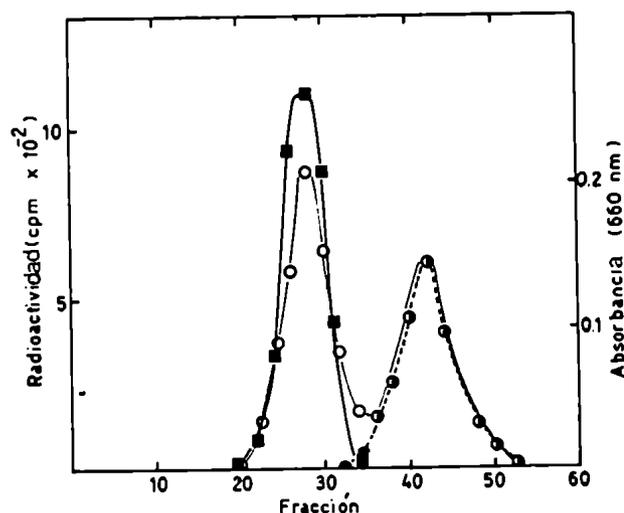
FIGURA 44. CCD en fase invertida de fracciones de extracción.



A: lípidos extraídos con hexano. B: prenoles ácido lábiles extraídos con cloroformo-metanol (2:1, v/v). Far: farnesol.

la figura 45. El pico de radiactividad cocromatografió con los fosfatos ácido estables procedentes de Dol-P (PM \sim 1400) y lejos de los fosfatos ácido lábiles correspondientes al Fic-P (PM \sim 700). Las fracciones 20 a 32 fueron recogidas, lavadas de sales por el método de Folch y concentradas bajo nitrógeno.

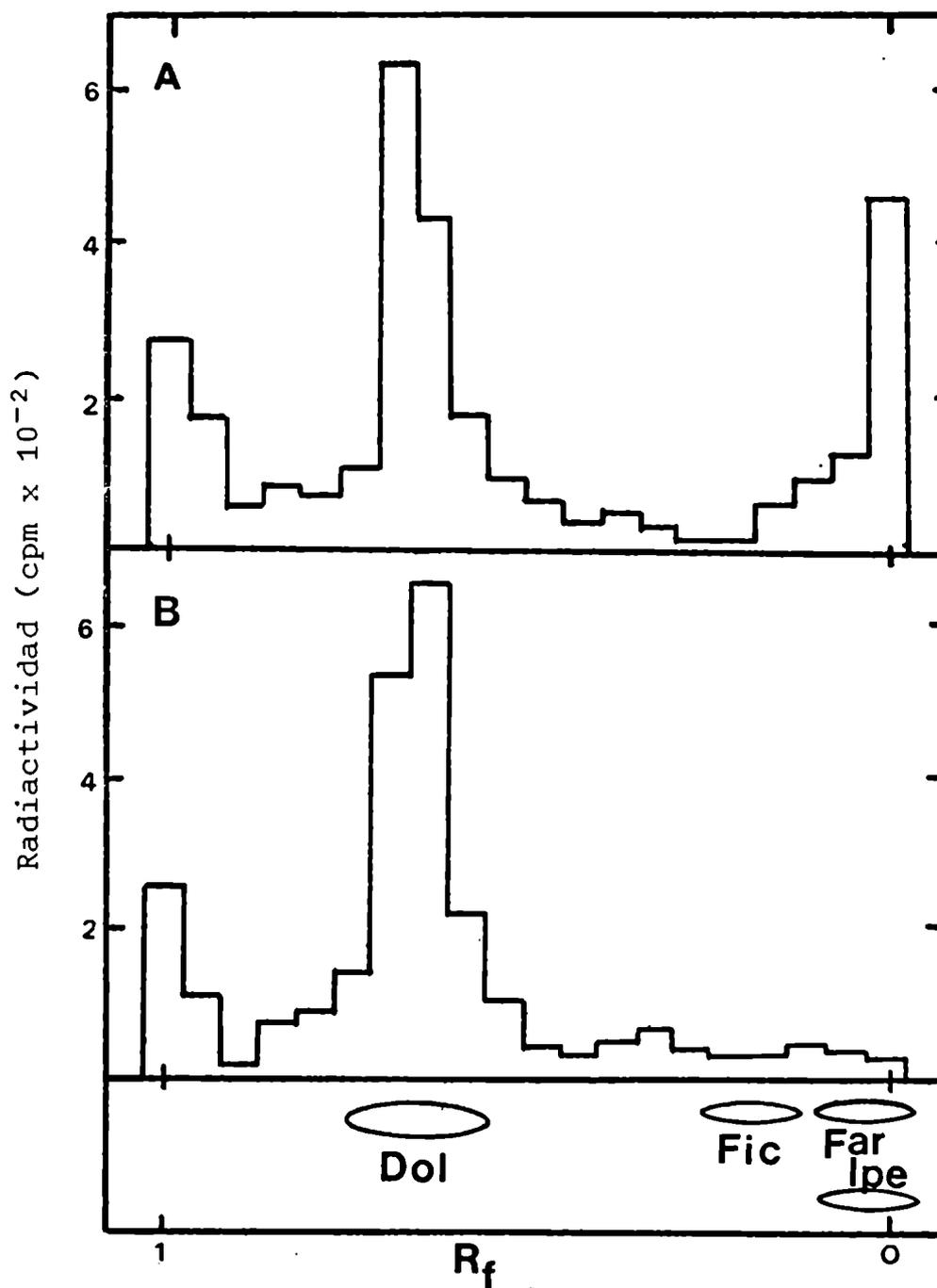
FIGURA 45. Cromatografía en columna de Sephadex LH-20.



Poliprenil fosfatos radiactivos biosintéticos resistentes a hidrólisis ácida fueron cromatografiados con Dol-P y Fic-P no radiactivos. El Dol-P fue detectado por el fósforo total (o---o), el Fic-P por el fósforo lábil (●—●) y el poliprenil fosfato biosintético por su radiactividad (■—■).

Una alícuota del eluido de la columna de Sephadex LH-20 fue tratada con fosfatasa alcalina y los alcoholes liberados por la misma, extraídos con hexano. Cuando este extracto fue sometido a CCD, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la figura 46B. Esta indica que el pico obtenido estaba libre de contaminación de alcoholes cortos y tenía una movilidad similar al Dol. Sometido a cromatografía en papel con solvente H, su movilidad también fue similar al Dol (fig. 50A).

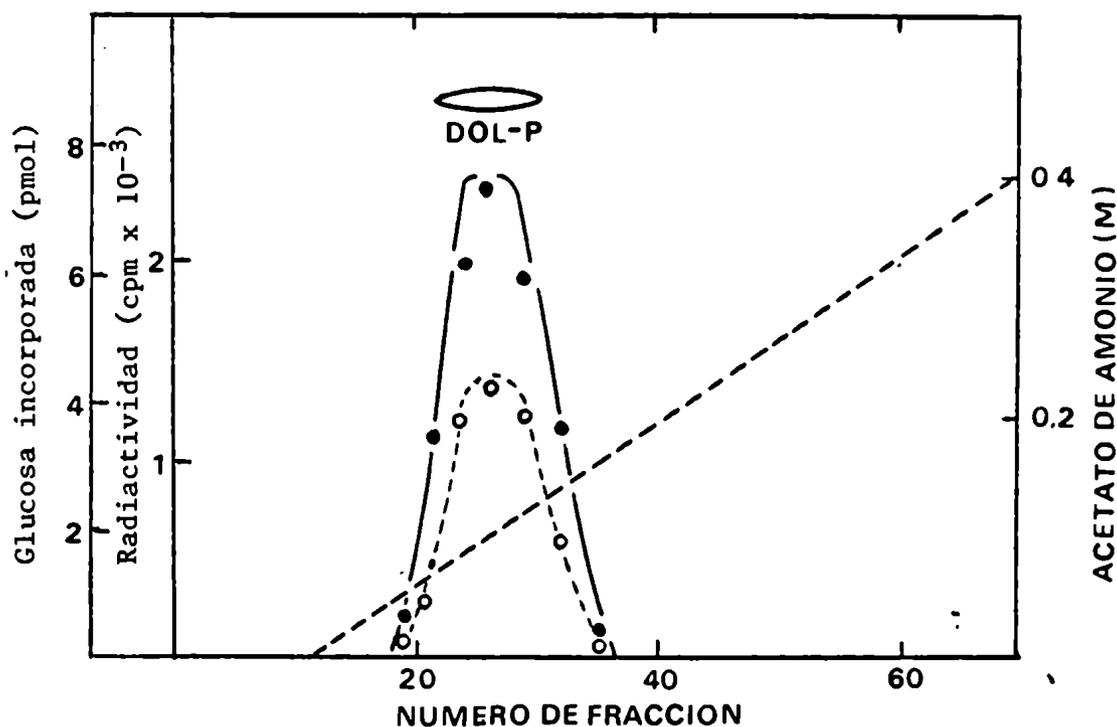
FIGURA 46. CCD en fase invertida de poliprenil fosfatos ácido resistentes.



Poliprenil fosfatos resistentes a tratamiento ácido suave fueron incubados con fosfatasa alcalina antes (A) y después (B) de ser cromatografiados en columna de Sephadex LH-20. Far: farnesol; Ipe: isopentenol.

Otra alícuota del pico de Sephadex LH-20 se cromatografió conjuntamente con aceptor lipídico endógeno purificado en una columna de DEAE-celulosa eluída con un gradiente lineal de acetato de amonio en metanol al 99%. Un pico único de radiactividad eluyó a una concentración de 0,12 M de acetato de amonio así como la actividad aceptora de glucosa, lo cual confirma la similitud entre el aceptor endógeno y el lípido biosintético (fig. 47).

FIGURA 47. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del lípido biosintético.



El lípido biosintético radiactivo fue combinado con aceptor endógeno purificado y cromatografiado en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo-metanol (2:1, v/v) y eluída con un gradiente lineal de acetato de amonio en el mismo solvente. Cada fracción fue ensayada para detectar actividad aceptora de glucosa con enzima P₁₀₀ de alga (○—○) como en la figura 38. Además, alícuotas de las fracciones fueron contadas para establecer la presencia de lípido biosintético radiactivo (●—●).

b) Largo de cadena

A fin de investigar el largo de cadena del lípido biosintético, parte del extracto orgánico obtenido por hidrólisis enzimática del eluido de Sephadex LH-20 fue cromatografiado, conjuntamente con Dol de hígado, en CCD en fase invertida pero en forma bidimensional. Después de la corrida, el cromatograma se reveló con vapores de yodo, mostrando la posición de las especies moleculares componentes del Dol (fig. 48). Las manchas así reveladas y otras zonas del cromato-

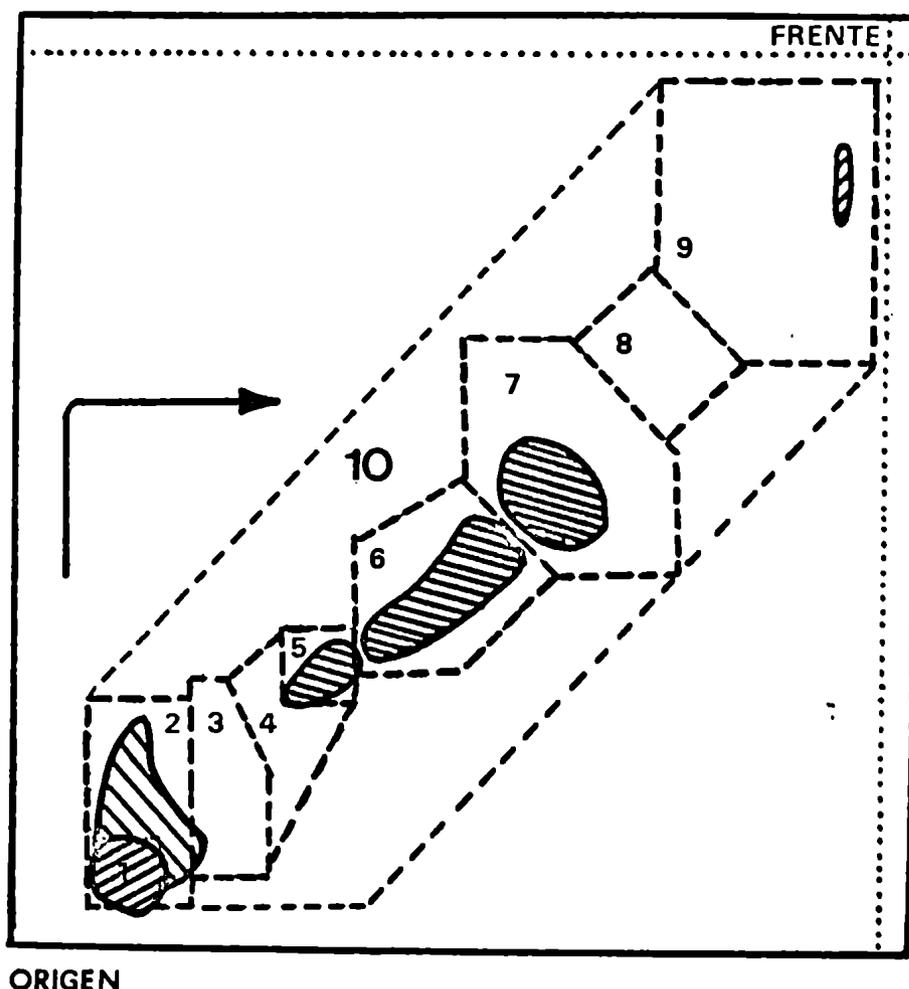
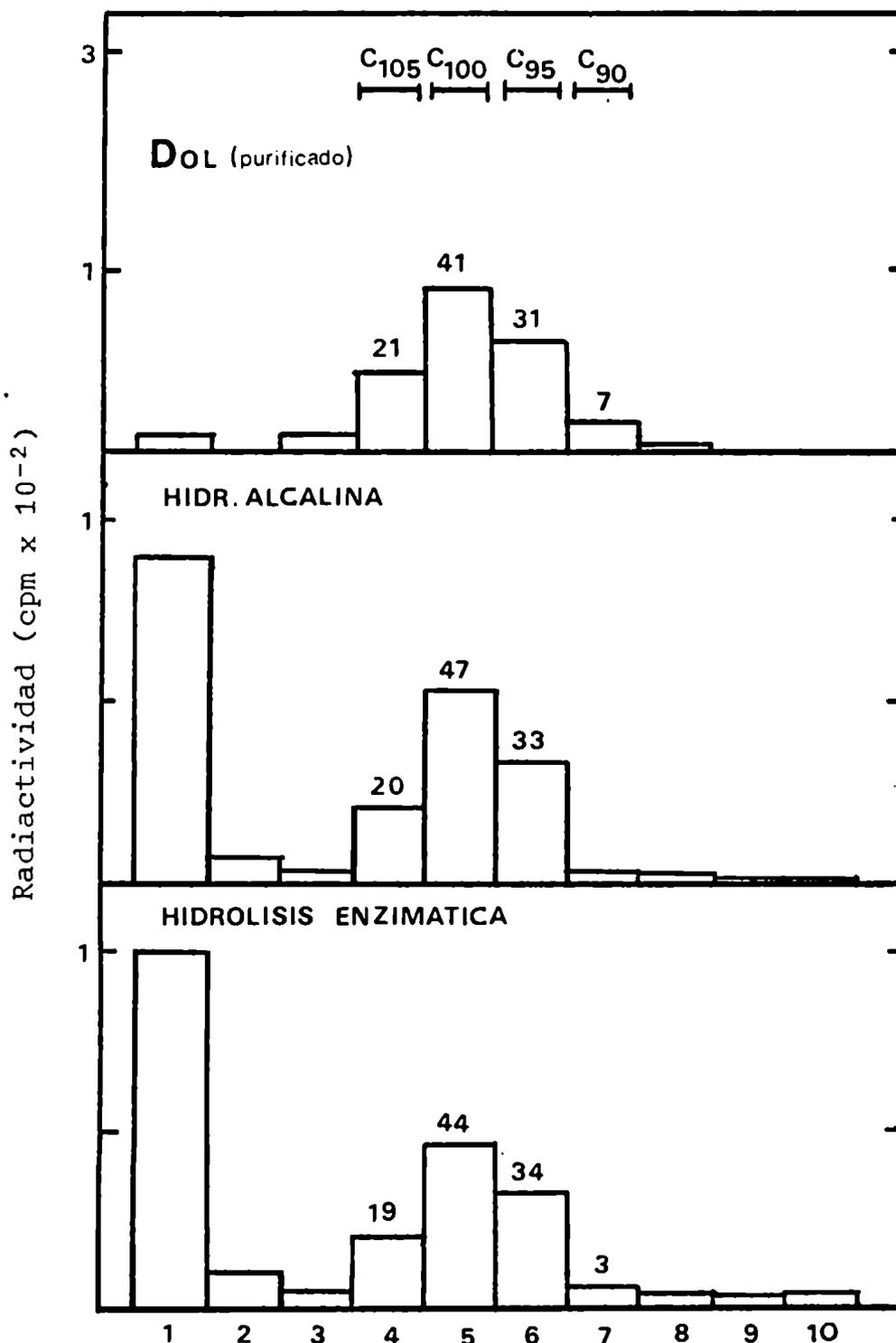


FIGURA 48. Cromatograma de Dol en fase invertida bidimensional.

Dol de hígado y lípido radiactivo biosintético hidrolizado enzimáticamente, fueron sembrados conjuntamente en CCD en fase invertida bidimensional. La placa fue revelada con vapores de yodo y las manchas visualizadas fueron raspadas para su posterior conteo. En el cromatograma se indican también las zonas que fueron raspadas con idénticos fines.

FIGURA 49. Representación de la radiactividad asociada a las zonas raspadas de los cromatogramas obtenidos como en la figura anterior.

A: Eluido del frente del cromatograma de la figura 50A; B: Fase orgánica después de tratamiento alcalino del eluido de Sephadex LH-20; C: Fase orgánica después de hidrólisis enzimática del eluido de Sephadex LH-20. Los números que se indican sobre las columnas corresponden al porcentaje relativo de radiactividad en cada caso.



grama fueron raspadas de la placa para ser contadas. Los resultados (fig. 49C) indican que la radiactividad estuvo asociada a las siguientes especies moleculares: C₉₀ (0-7%), C₉₅ (31-34%), C₁₀₀ (41-47%) y C₁₀₅ (19-21%). Parte de la radiactividad permaneció en el origen; luego de elución y cromatografía en papel con solvente H, se concluyó que este comportamiento se debió a Dol-P contaminante. Eluidos de Dol purificados por cromatografía en papel, no mostraron este comportamiento por lo que puede verse en la figura 49A.

Otra alícuota de la columna fue tratada por 30 minutos a 70°C bajo atmósfera de nitrógeno en una solución acuosa de KOH al 60% en etanol absoluto (1:5, v/v). Los alcoholes libres resultantes fueron extraídos por agregado de agua y éter de petróleo. Cromatografía en fase invertida de la fase orgánica (fig. 49B) mostró que los resultados eran coincidentes con los porcentajes de las especies moleculares obtenidas del mismo modo por hidrólisis enzimática.

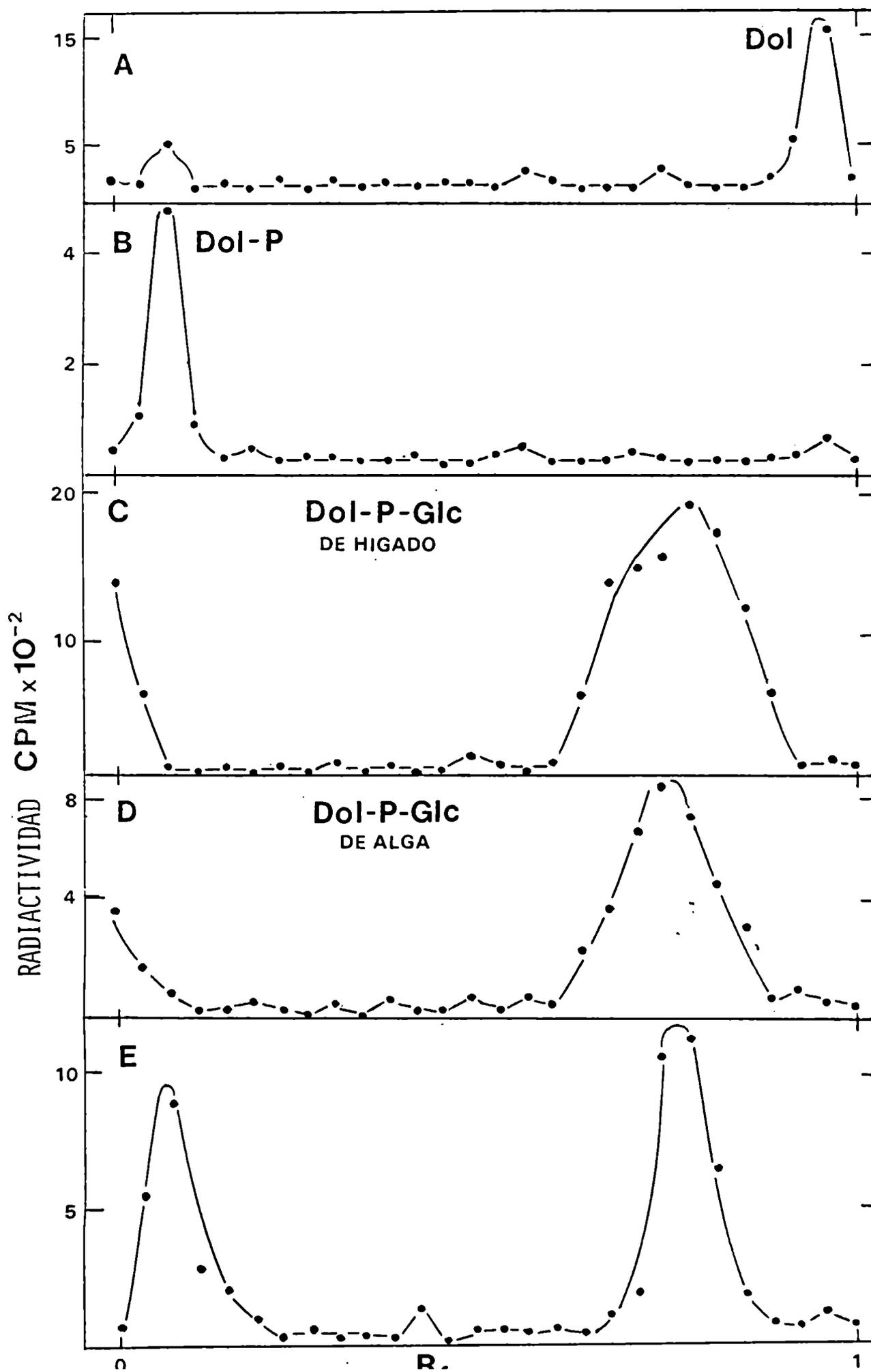
c) Actividad aceptora

Alícuotas del eluido de Sephadex LH-20 fueron incubadas con UDP-Glc no radiactiva y enzima P₁₀₀ siendo extraídos los lípidos con butanol, como se describe en Materiales y Métodos. El extracto butanólico se cromatografió en papel con solvente H. Un pico radiactivo con una movilidad idéntica al Dol-P-(¹⁴C)Glc de hígado y Dol-P-(¹⁴C)Glc de alga (fig. 50E) se detecta en el extracto de la incubación y que no se presentaba en el lípido no incubado (fig. 50B).

FIGURA 50. Cromatografía en papel con solvente H.

A: (¹⁴C)Dol proveniente de hidrólisis enzimática del eluido de Sephadex LH-20; B: (¹⁴C)Dol-P eluido de Sephadex LH-20; C: Dol-P-(¹⁴C)Glc de hígado; D: Dol-P-(¹⁴C)Glc de alga (aceptor endógeno glucosilado); E: extracto butanólico de la incubación con enzima P₁₀₀ con el eluido de Sephadex LH-20.

FIGURA 50. Cromatografía en papel con solvente H.



3. Biosíntesis de Dol-P por fracciones subcelulares

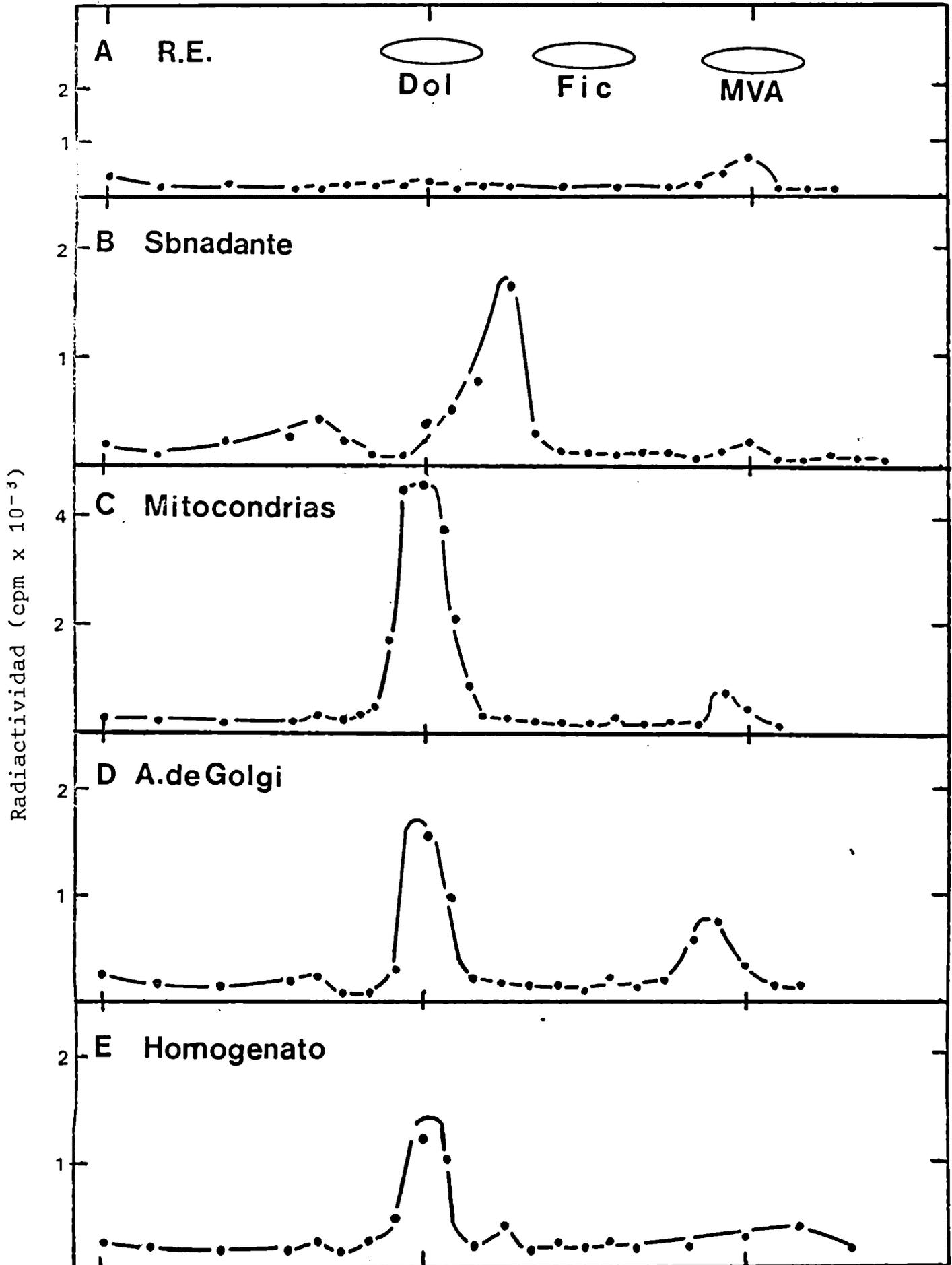
A fin de investigar el sitio específico de biosíntesis de Dol-P se hicieron incubaciones con RS-(¹⁴C)MVA y diferentes fracciones subcelulares de algas. La tabla XIX muestra la actividad específica de las enzimas marcadoras en las diferentes fracciones. Únicamente dos fracciones, mitocondrias y Golgi (fig. 51) fueron capaces de sintetizar Dol-P. Este hecho hizo innecesario analizar la pureza de las otras fracciones. De los resultados de actividad de la tiamina pirofosfatasa resulta claro que solo un 4% de proteínas procedentes de Golgi contaminaban la fracción mitocondrial. Por otro lado, el contenido de ubiquinona indica una contaminación del 7% de mitocondrias en la fracción rica en aparato de Golgi.

TABLA XIX. Actividades específicas de las enzimas marcadoras en diferentes fracciones subcelulares y síntesis de Dol-P.

| Fracción | Ubiquinona mmol | 5'-nucleotidasa | | Glc-5-Pasa | | Tiamina pirofosfatasa | | Dol-P pmol/mg· 50 min. |
|-----------------------|--------------------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------------|-------|------------------------------|
| | | nmol/min· mg | AER | nmol/min· mg | AER | nmol/min· mg | AER | |
| Mitocondrias | 407 | 10,7 | 0,12 | 10,7 | 0,03 | 8,6 | 0,11 | 267 |
| Retículo endoplásmico | 16 | 20,6 | 0,24 | 929,0 | 3,12 | 68,6 | 0,91 | ND |
| Membrana plasmática | 98 | 80,2 | 2,80 | 25,8 | 0,08 | 28,6 | 0,38 | ND |
| Aparato de Golgi | 30 | ND | ND | 11,8 | 0,03 | 202,1 | 10,80 | 200 |

Las fracciones fueron separadas por centrifugación diferencial y en gradientes discontinuos de sacarosa. Los ensayos enzimáticos fueron hechos con alícuotas de 0,1 ml de las diferentes fracciones. El ensayo de biosíntesis de Dol-P en cambio se hizo con alícuotas de 30 µl. El contenido en ubiquinona fue detectado por su absorbancia en el UV a 275 nm. ND: no detectado. AER: actividad específica relativa: actividad específica en la fracción/actividad específica en el homogenato.

FIGURA 51. Cromatogramas de Sephadex LH-20 de los distintos extractos de incubaciones con fracciones subcelulares.



4. Propiedades de la UDP-Glc:poliprenil fosfato glucosiltransferasa

Se estudiaron los requerimientos y propiedades características de la glucosiltransferasa particulada de P. zopfii.

a) Especificidad de sustrato

Distintos nucleótido azúcares fueron incubados con la fracción particulada P₁₀₀. La tabla XX muestra que solo se forman derivados lipídicos de glucosa cuando se incuba con UDP-Glc; los otros glucosil nucleótidos (ADP-Glc y GDP-Glc) no sirvieron como sustrato, demostrando una especificidad de la enzima hacia el nucleótido azúcar.

TABLA XX. Incorporación de glucosa de diferentes nucleótidos a lípido

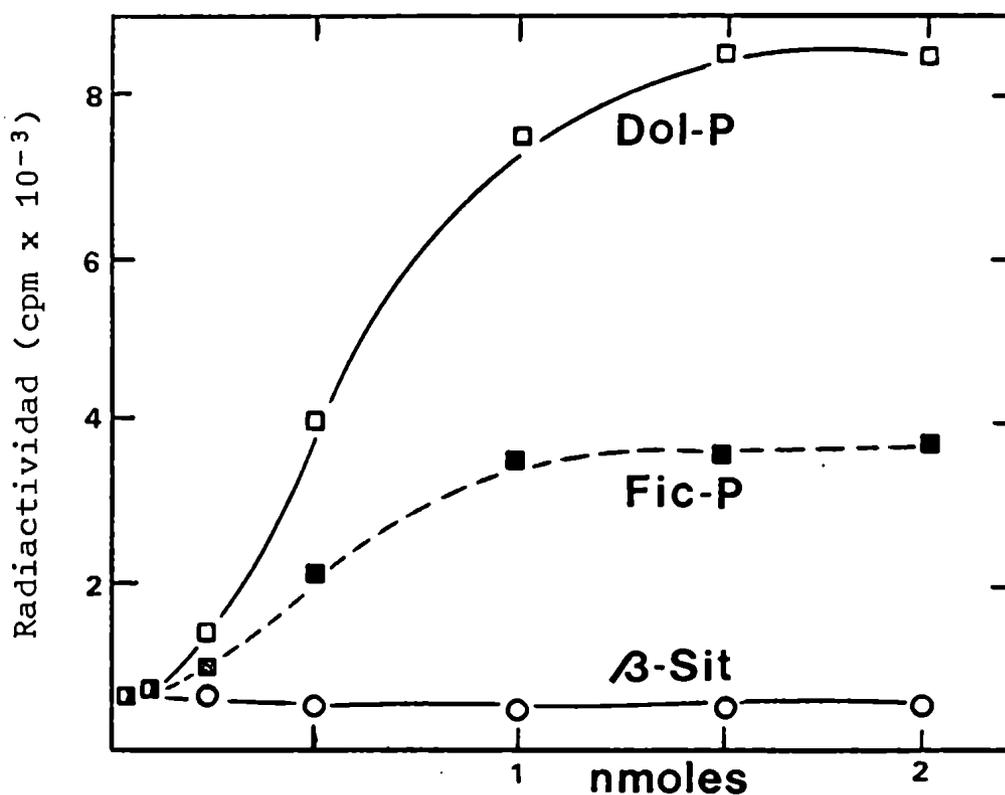
| Nucleótido azúcar | Incorporación a glucolípidos pmoles | Porcentaje de incorporación |
|-------------------|---|--------------------------------|
| UDP-Glc | 4,1 | 1,7 |
| ADP-Glc | 0,5 | 0,1 |
| GDP-Glc | 0,9 | 0,15 |

Las incubaciones se realizaron en condiciones tipo excepto para los nucleótido azúcares que fueron: UDP-(¹⁴C)Glc (300 pmoles), ADP-(¹⁴C)-Glc (500 pmoles), GDP-(¹⁴C)Glc (600 pmoles). La fase butanólica fue analizada por cromatografía de intercambio iónico o fase acuosa después de hidrólisis ácida suave.

Al analizar el efecto del agregado del otro sustrato (poliprenil fosfatos) se notó una especificidad de la enzima hacia los mismos, y no hacia lípidos no relacionados como los esteroides; y dentro de los prenil fosfatos una afinidad mayor por los α -saturados de cadena larga

como el Dol-P (fig. 52) cuando se compara en bases equimoleculares. Esto confirma la naturaleza dolícólica del lípido aceptor endógeno.

FIGURA 52. Efecto de prenil fosfatos exógenos en la formación de glucolípidos.

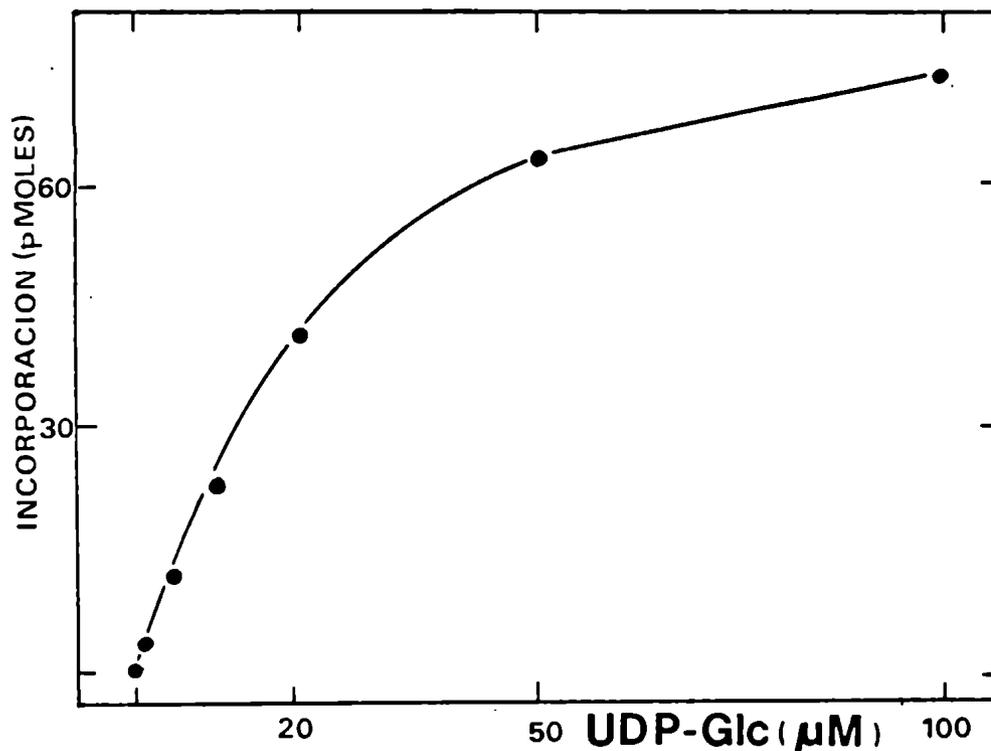


Las incubaciones se realizaron en las condiciones tipo exépto por el agregado de 0,6% Triton X-100 y Dol-P (□—□), Fic-P (■---■) o β-sitosterol (o—o). Proteínas: 220 μg/tubo.

b) Concentración de sustrato

Se agregaron concentraciones crecientes de UDP-Glc al medio de incubación, observándose que la incorporación aumentó proporcionalmente a las mismas hasta una concentración de 2×10^{-5} M (fig. 53).

FIGURA 53. Efecto de la concentración de UDP-Glc.



Las incubaciones se realizaron como se indica en Materiales y Métodos excepto por la concentración de UDP-Glc. Un nmol de UDP-(^{14}C)-Glc fue combinado con las concentraciones indicadas de UDP-Glc no radiactiva. Proteínas: 115 μg .

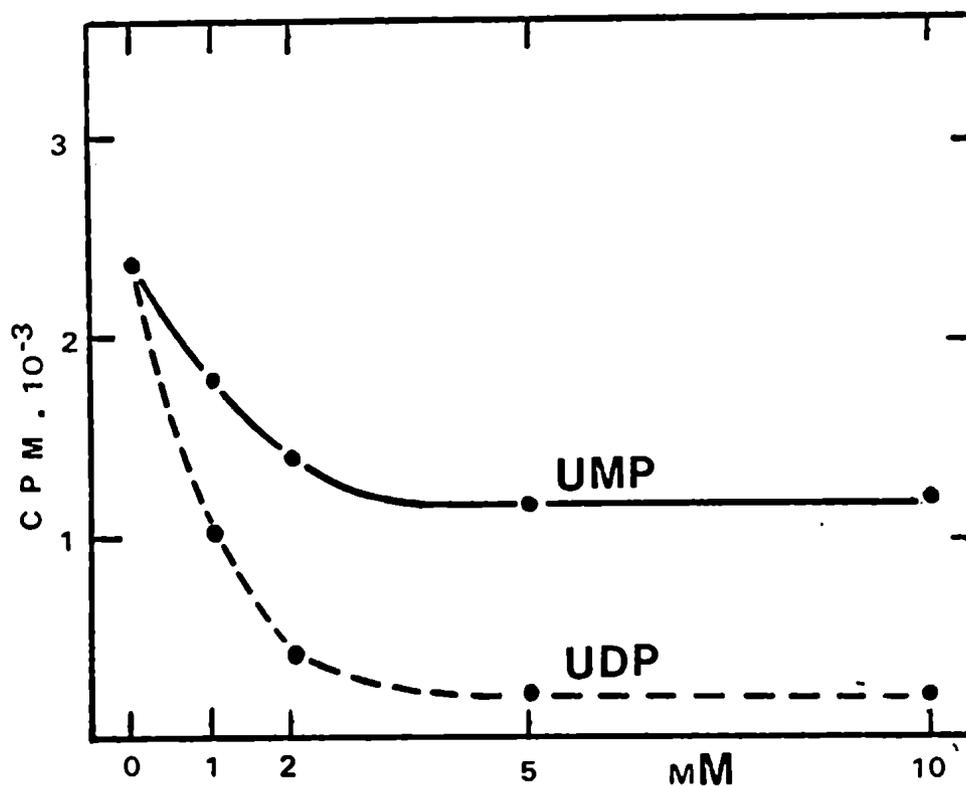
En el caso de los poliprenil fosfatos, la incorporación de glucosa fue proporcional a la concentración de Dol-P en el rango 5×10^{-5} a 2×10^{-4} M en las condiciones empleadas (fig. 51).

c) Efecto del agregado de productos

Se investigó el efecto de la adición de UMP y UDP en la formación de glucolípidos. A diferencia de lo que ocurre con los EG (fig. 30), ambos nucleótidos inhiben la transferencia de glucosa (aunque en distinta medida) lo que indica heterogeneidad en los glucolípidos forma-

dos por este sistema. Los resultados que se muestran en la figura 54, sugieren la formación de dos clases de derivados: glucosil fosforil poliprenoles y glucosil pirofosforil poliprenoles. La alta inhibición (95%) que se observa en el caso del agregado de UDP, probablemente es debida a la formación de UMP por acción de fosfodiesterasas endógenas presentes en la fracción enzimática.

FIGURA 54. Inhibición de la transferencia de glucosa por nucleótidos.

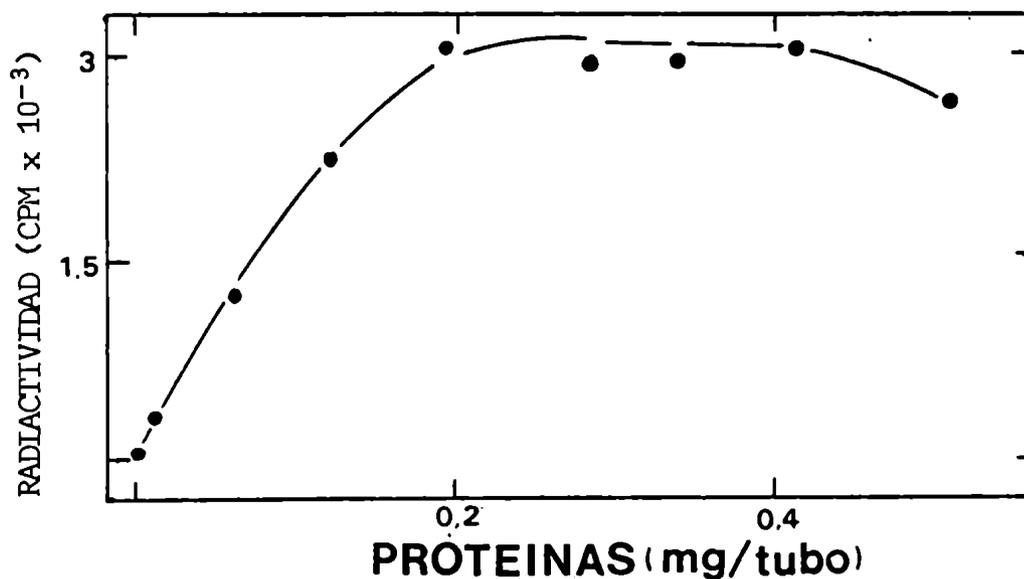


Las incubaciones se llevaron a cabo en la forma habitual excepto por el agregado de distintas concentraciones de UDP y UMP. Proteínas: 223 μg /tubo.

d) Concentración de proteínas

El incremento en la formación de glucolípidos se mostró linealmente dependiente de la cantidad de proteínas en el medio de incubación hasta que las mismas alcanzaron 200 $\mu\text{g}/\text{tubo}$. A mayores cantidades no se notó aumentos apreciables. La figura 55 muestra que la incorporación forma una meseta a concentraciones mayores de 200 $\mu\text{g}/\text{tubo}$.

FIGURA 55. Concentración de proteínas.



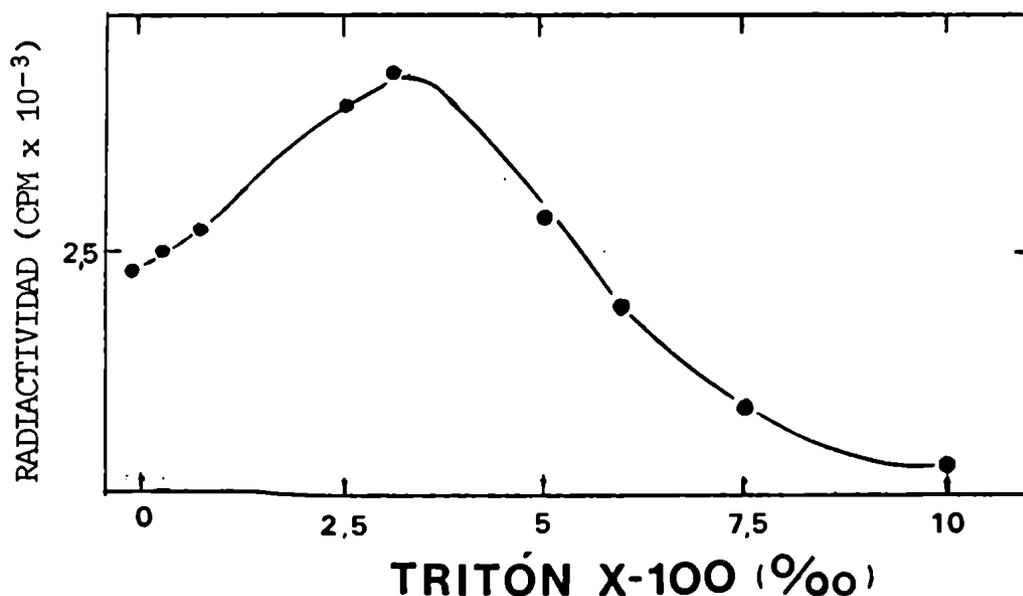
Las incubaciones se realizaron en las condiciones tipo excepto por la concentración de proteínas.

e) Detergente

En los casos de enzimas de membrana es común que el agregado de ciertos detergentes produzcan un aumento de la actividad enzimática. En este caso se investigó el efecto de un detergente no iónico, el Triton X-100. Los resultados que se indican en la figura 56 muestran

que una concentración de detergente del 0,3% aumenta en forma significativa la incorporación de glucosa a lípidos.

FIGURA 56. Efecto del Triton X-100 en la actividad enzimática.



Las incubaciones se realizaron con concentraciones crecientes de Triton X-100 y los productos se analizaron por cromatografía de intercambio iónico.

f) Metales

El requerimiento de metales fue estudiado mediante agregado de algunos cationes al medio de incubación. La tabla XXI muestra que la formación de glucolípidos es fuertemente estimulada por agregado de Mg^{++} y algo menos por Mn^{++} . Cierta radiactividad se detectó en el experimento control, probablemente debida a la actividad producida por la presencia de iones endógenos. Los resultados obtenidos en presencia de quelantes como el EDTA confirman esta presunción.

TABLA XXI. Efecto de metales en la transferencia glucosídica a lípidos.

| Adiciones | Radiactividad incorporada en glucolípidos (cpm) |
|---|--|
| Ninguna | 320 |
| EDTA (1 mM) | 30 |
| MgCl ₂ (10 mM) | 2377 |
| MnCl ₂ (10 mM) | 989 |
| CaCl ₂ (10 mM) + EDTA (1 mM) | 266 |
| NaCl (10 mM) + EDTA (1 mM) | 58 |
| KCl (10 mM) + EDTA (1 mM) | 61 |

Las incubaciones se realizaron en las condiciones tipo excepto por el agregado de iones metálicos. Proteínas: 130 µg/tubo.

En el caso de los iones que más estimularon la actividad glucosilante se estudió la concentración óptima de los mismos que produce este efecto. La figura 57 muestra que la misma fue alrededor de 10 mM tanto para el Mg⁺⁺ como para el Mn⁺⁺.

g) Efecto del pH

Se estudió el pH óptimo para la actividad enzimática en buffer Tris-Maleato y el mismo fue aproximadamente de 7,5 (fig. 58).

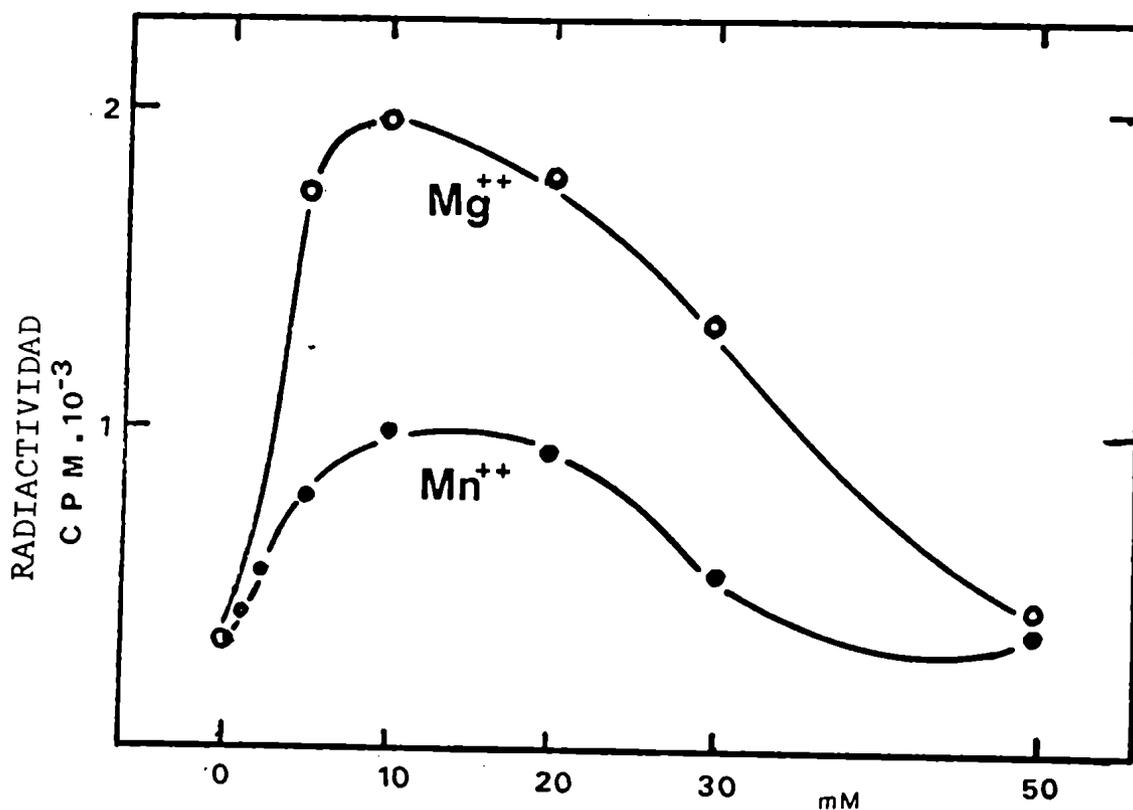


FIGURA 57. Efecto de Mg^{++} y Mn^{++} en la transglucosilación.

Las incubaciones se realizaron en la forma habitual excepto por la concentración de cationes. Proteínas: 310 μ g/tubo.

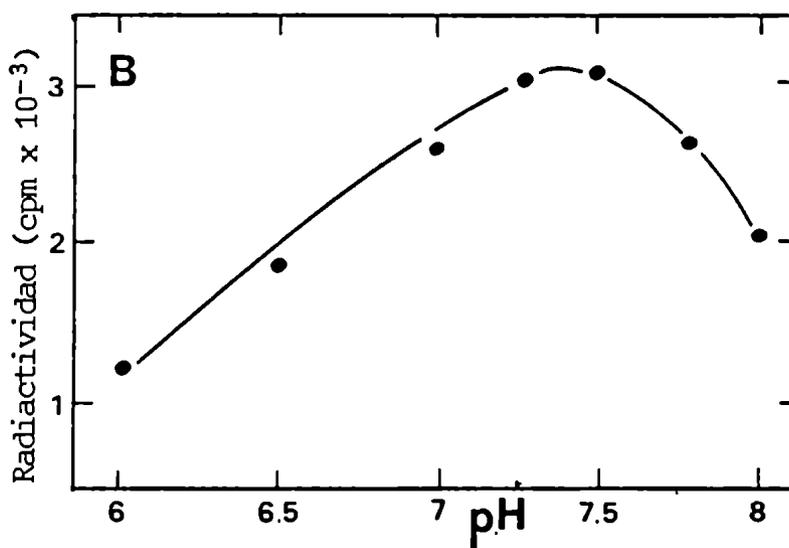


FIGURA 58. Efecto del pH.

Las incubaciones se realizaron en presencia de 50 mM Tris-maleato a diferentes pH y una concentración de proteínas de 130 μ g/tubo.

5. Distribución subcelular

Con el objeto de determinar el sitio específico de formación de poliprenil-P-azúcares, se incubó UDP-(^{14}C)Glc y Dol-P con diferentes fracciones subcelulares de P. zopfii. La tabla XXII muestra la actividad específica de las enzimas marcadoras en las diferentes fracciones y de la UDP-Glc:poliprenil fosfato glucosiltransferasa(s). Los resultados obtenidos indican que el retículo endoplásmico es el sitio principal de síntesis de poliprenil fosfato azúcares, lo cual está de acuerdo a lo encontrado en otros sistemas (Dalner y col., 1972).

TABLA XXII. Actividades específicas de enzimas marcadoras y UDP-Glc:poliprenil fosfato glucosil transferasa(s) (EC 2.4.1.-) en diferentes fracciones subcelulares.

| Fracción | Ubiquinona nmol | 5'-nucleotidasa | | Glc-6-Pasa | | Tiamina pirofosfatasa | | UDP-Glc:poliprenil fos- fato glucosiltransferasa | |
|-----------------------|--------------------|-----------------|------|-------------|------|--------------------------|-------|---|--------|
| | | nmol/min·mg | AER | nmol/min·mg | AER | nmol/min·mg | AER | pmol/min·mg | AER |
| Mitocondrias | 407 | 10,7 | 0,12 | 10,7 | 0,03 | 8,6 | 0,11 | 1,203 | 1,534 |
| Retículo endoplásmico | 16 | 20,6 | 0,24 | 929,0 | 3,12 | 68,6 | 0,91 | 8,468 | 10,801 |
| Membrana plasmática | 98 | 80,2 | 2,80 | 25,8 | 0,08 | 28,6 | 0,38 | 3,310 | 4,223 |
| Aparato de Golgi | 30 | ND | ND | 11,8 | 0,03 | 202,1 | 10,80 | 3,962 | 5,054 |

Las fracciones fueron separadas por centrifugación diferencial y en gradientes discontinuos de sacarosa. Los ensayos enzimáticos se realizaron con alícuotas de 0,1 ml de las diferentes fracciones, excepto el de la UDP-Glc:poliprenil fosfato glucosiltransferasa (30 µl y demás compuestos de la mezcla de incubación tipo + 2 nmoles de Dol-P y 0,1% Triton X-100). El contenido en ubiquinona fue detectado por su absorbancia en el UV a 275 nm. ND: no detectado; AER: actividad específica relativa: actividad específica en la fracción/actividad específica en el homogenato.

III. DERIVADOS GLUCOSILADOS DE POLIPRENIL FOSFATOS

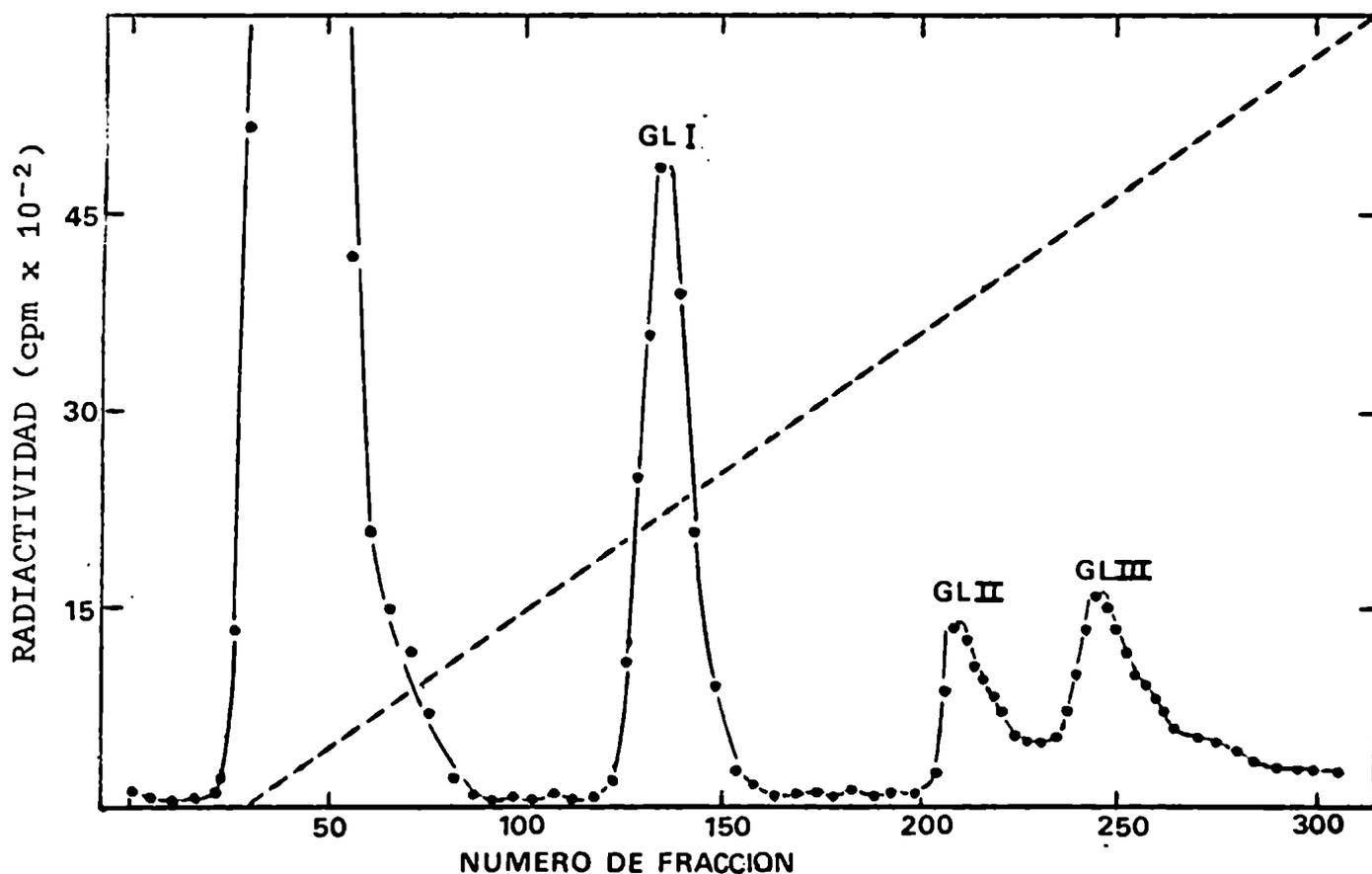
Los glucolípidos radiactivos obtenidos por incubaciones en gran escala de preparaciones de membranas y UDP-(^{14}C)Glc, fueron parcialmente purificados por cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con metanol al 99% y eluída con un gradiente lineal de acetato de amonio en el mismo solvente. La mayor parte de la radiactividad (80%) no se unió a la DEAE-celulosa y eluyó con el volumen muerto de la columna como se espera que ocurra con los glucolípidos neutros (fig. 59). En cambio, los glucolípidos polares eluyeron a distintas concentraciones de acetato de amonio, aproximadamente 0,125 M (glucolípido I), 0,250 M (glucolípido II) y 0,300 M (glucolípido III).

La posición del glucolípido I es la que se espera en el caso de un poliprenil fosfato hexosa (Wright, 1971; Wedgwood y col., 1974; Pont Lezica y col., 1976). En las condiciones usadas un derivado pirofosfórico eluye en un rango de concentraciones de 0,2 a 0,3 M, tal como lo hacen los glucolípidos II y III (Wedgwood y col., 1974; García y col., 1974; Romero y Pont Lezica, 1977). Las fracciones correspondientes a los glucolípidos I, II y III fueron colectadas, lavadas por el método de Folch para remover el acetato de amonio y luego analizadas.

1. Glucolípido I

El glucolípido I fue sometido a hidrólisis ácida suave (0,01 N HCl, 100°C, 10 min.). En estas condiciones el 90% de la radiactividad se hizo soluble en agua. Cromatografías en papel del producto hidrosoluble indicaron que tenía igual movilidad que la glucosa cuando es corrido con solventes A (fig. 63A), F y J.

FIGURA 59. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de (^{14}C) glucolípidos.

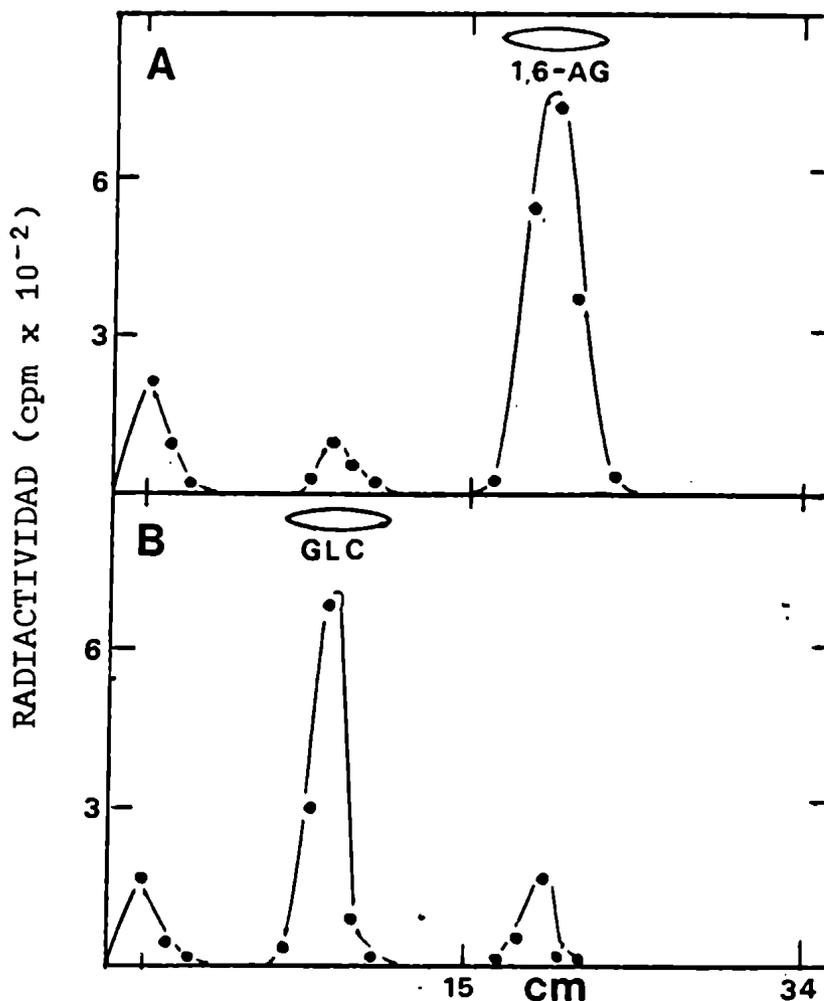


Extractos butanólicos procedentes de incubaciones en gran escala, fueron sembrados en una columna equilibrada con 99% metanol. Se colectaron fracciones de 3 ml y se contaron alícuotas de 0,5 ml de cada fracción. La elución se realizó con 200 ml de 99% metanol seguidos por un gradiente lineal de 0-0,4 M de acetato de amonio en el mismo solvente, en un volumen total de 700 ml. GL I: glucolípido I; GL II: glucolípido II; GL III: glucolípido III.

Cuando el glucolípido I fue cromatografiado con un solvente alcalino (solvente I) se obtuvo un único pico de radiactividad en el frente del solvente (fig. 60A), como es de esperarse que ocurra con un lípido azúcar monofosfato, dado que un derivado de tipo pi-

rofosfórico hubiese formado un éster fosfórico cíclico de menor movilidad (R_f : 0,66). Sometido a condiciones alcalinas más fuertes (0,1 M NaOH en 99% butanol, 65-68°C, 190 min.), el glucolípido I se hidrolizó produciéndose un compuesto soluble en agua (90% de la radiactividad) con la movilidad del 1,6-anhidroglucosano en cromatografía en papel con solvente A (fig. 60A). Hidrólisis ácida del compuesto produjo glucosa, confirmando la identidad del glucosano (fig. 60B).

FIGURA 60. Formación de 1,6-anhidroglucosano.



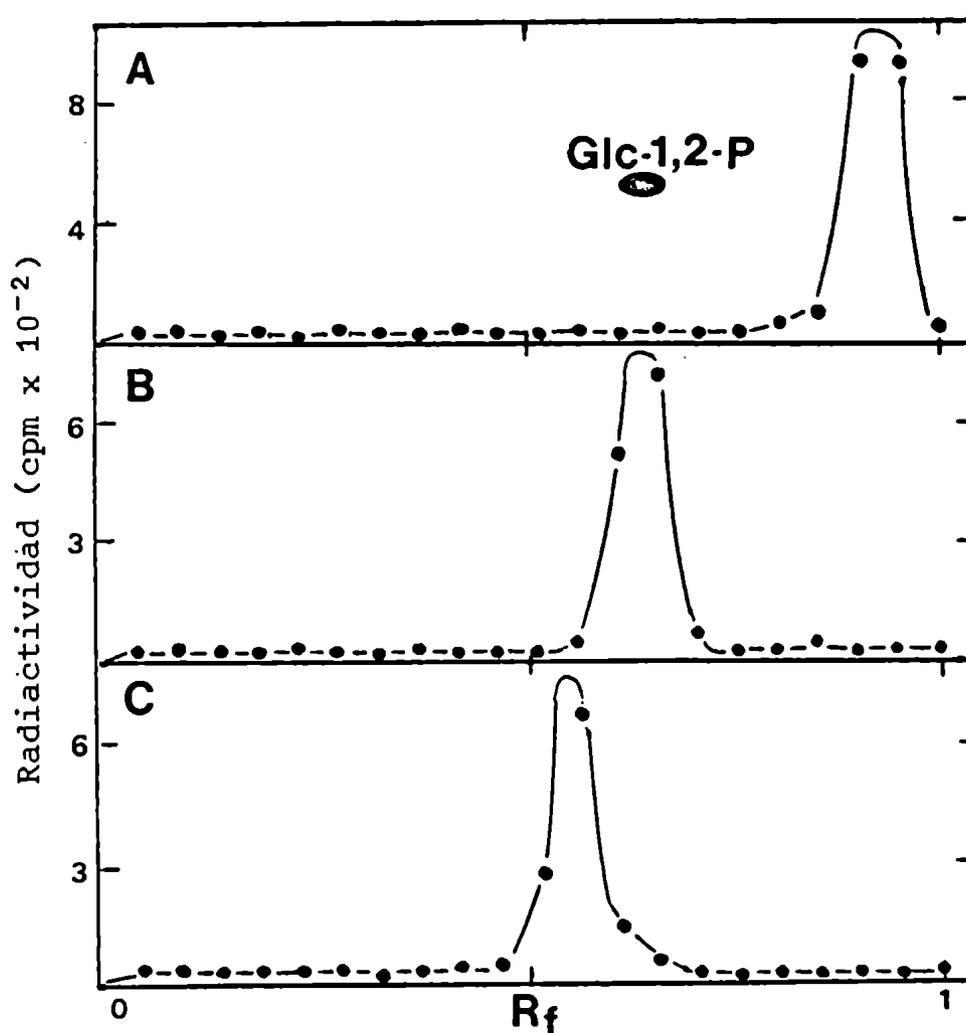
El glucolípido I fue purificado por cromatografía en DEAE-celulosa e hidrolizado en condiciones alcalinas (0,1 M NaOH en 99% butanol, 90 min. a 65-68°C) y cromatografiado con solvente A (A). Este compuesto fue hidrolizado en condiciones ácidas (1 N HCl, 100°C, 3 hs) y cromatografiado con el mismo solvente (B). 1,6-AG: 1,6-anhidroglucosano.

Este resultado indica que el glucolípido posee la glucosa unida en una configuración β al lípido, dado que los derivados de conformación α no forman el anhidroglucosano en esas condiciones (Montgomery y col., 1943).

2. Glucolípido II

En la figura 61B se muestra la cromatografía en papel con el solvente alcalino I del glucolípido II. Se observa la presencia de un compuesto radiactivo con la misma movilidad que la glucosa-1,2-fosfato cíclica (R_f : 0,66). Esto nos indica que la glucosa está unida al poliprenol a través de un pirofosfato. La hidrólisis ácida del glucolípido II (pH 2, 100°C, 10 min.) liberó el azúcar radiactivo que fue identificado como glucosa por su comportamiento cromatográfico con los solventes A (fig. 63B), F y J.

La naturaleza poliprenólica del lípido fue confirmada por incubación de (^3H)Dol-P biosintético, UDP-Glc no radiactiva y enzima P_{100} a 0°C. En estas condiciones, como se indicará más adelante, el producto principal es el glucolípido II. Una cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con 99% metanol y eluida con un gradiente discontinuo de acetato de amonio en el mismo solvente, demostró que parte de la radiactividad eluyó después del agregado de acetato de amonio 0,4 M, indicando que el Dol-P fue glucosilado con agregado de un nuevo fosfato (fig. 61). La elución de cierta radiactividad con el volumen muerto (indicando la presencia de compuestos neutros) puede ser explicada por hidrólisis del Dol-P por acción de fosfatasas endógenas. La elución a una concentración 0,1-0,2 M de acetato de amonio puede ser debida a lípido que no reaccionó o formación de Dol-P-Glc, pues ambos son eluidos en ese rango. En cambio, la radiactividad que eluye asociada a una concentración de 0,4 M solo puede ser explicada por la presencia de un grupo pirofosfato. Esto confirma que el glucolípido II es un derivado dolicolico, tal como lo es el glucolípido I.

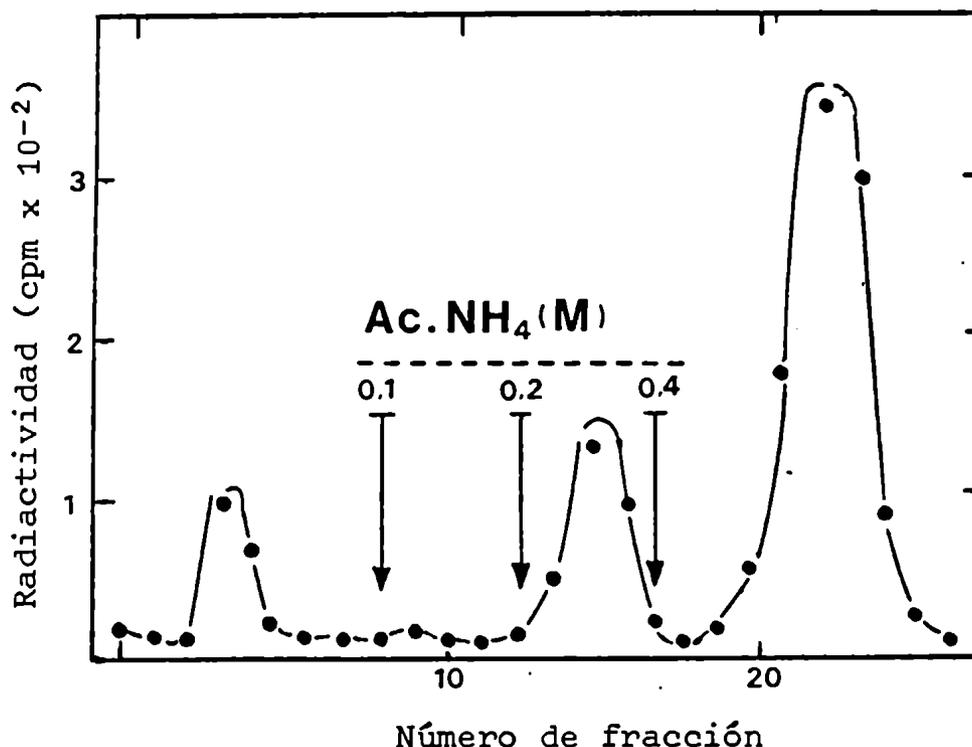
FIGURA 61. Cromatografía en papel de (^{14}C)glucolípidos.

Los glucolípidos fueron purificados por columna de DEAE-celulosa y cromatografiados en papel con solvente I. A: Glucolípido I; B: Glucolípido II; C: Glucolípido III. Glc-1,2-P: glucosa-1,2-fosfato cíclica.

3. Glucolípido III

La figura 61C muestra que la cromatografía en papel del glucolípido II en solvente alcalino I produce un pico radiactivo (R_f : 0,55) con una movilidad menor que la glucosa-1,2-fosfato cíclica (R_f : 0,66). Este compuesto fue eluido y tratado con ácido (pH 2,0,

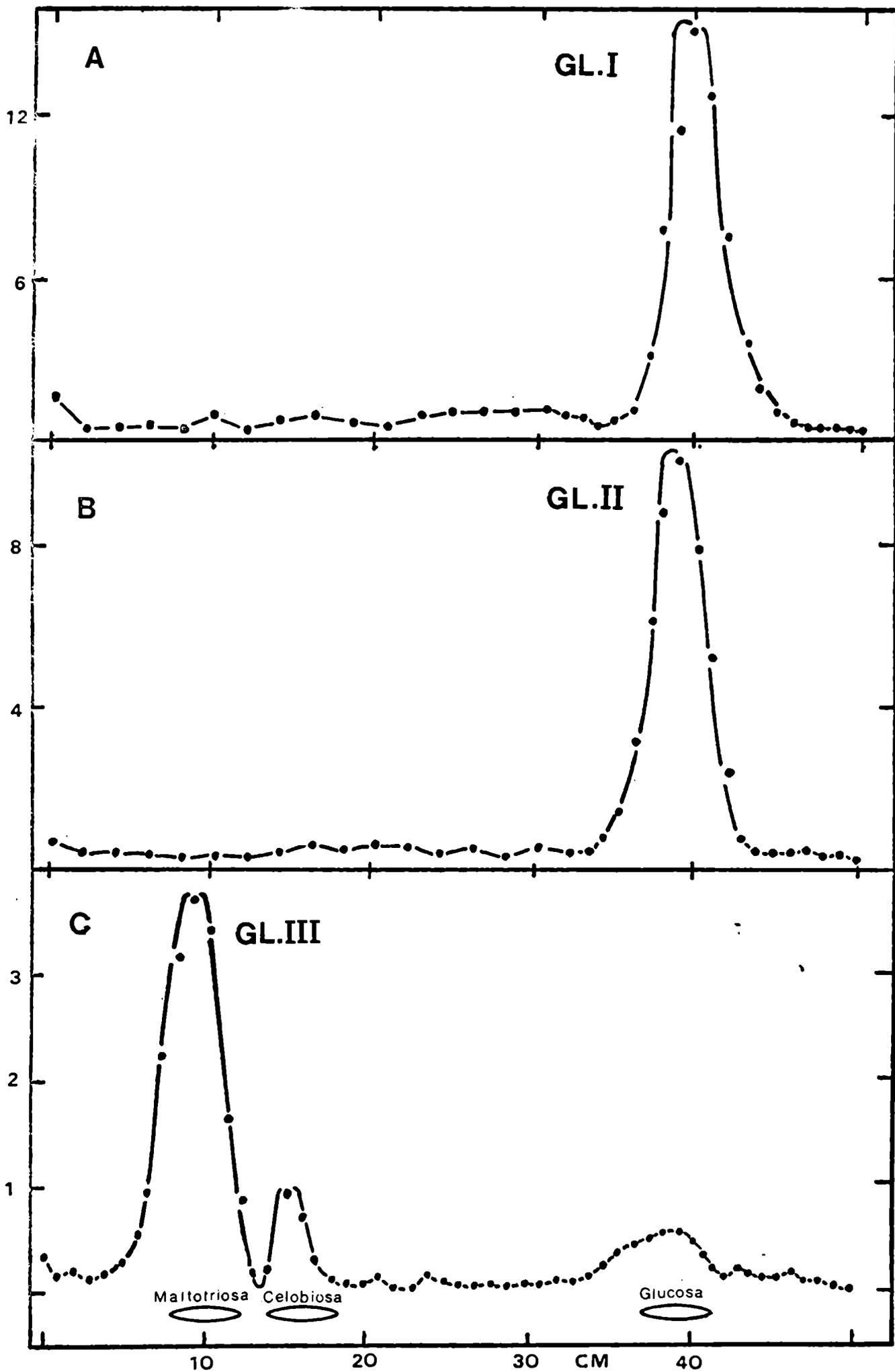
FIGURA 62. Identidad de la porción lipídica.



(³H)Dol-P biosintetizado a partir de (³H)MVA y mitocondrias de alga y purificado por columna de Sephadex LH-20, fue incubado con enzima P₁₀₀ y 0,1 M UDP-Glc no radiactiva por 120 min. a 0°C en la mezcla tipo. En estas condiciones se ve favorecida la formación de glucolípido II. El extracto butanólico fue cromatografiado en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con 99% metanol y eluída con un gradiente discontinuo de acetato de amonio en el mismo solvente. Se colectaron fracciones de 0,5 ml, las cuales fueron contadas íntegramente.

100°C, 10 min.) y luego con fosfatasa alcalina. El producto resultante al ser cromatografiado con solvente A, tiene una movilidad similar (pero no igual) a la maltotriosa. Un resultado similar se obtuvo cuando el glucolípido III fue hidrolizado en condiciones de acidez suave (fig. 63C).

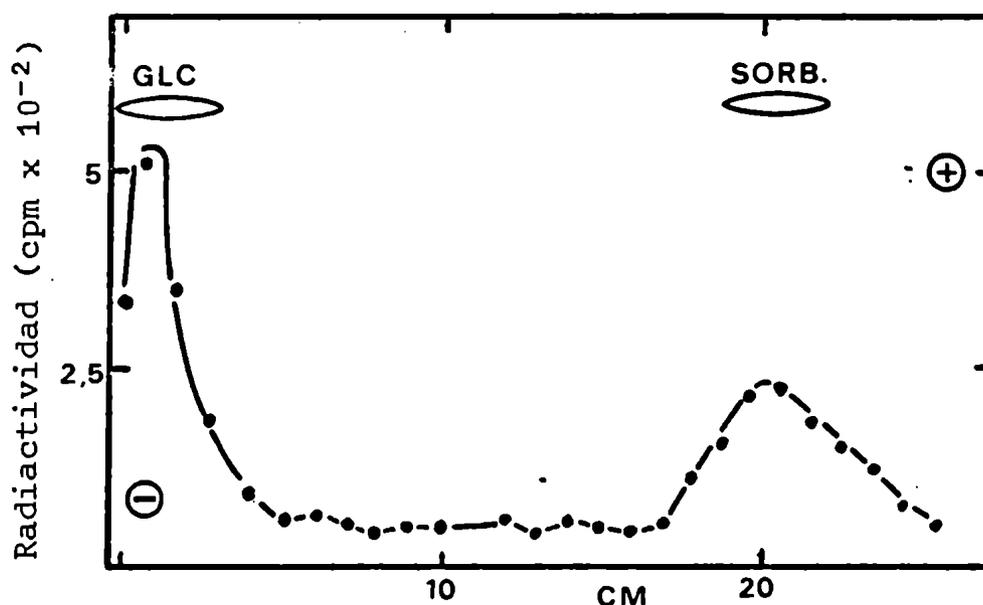
FIGURA 63. Cromatografía en papel de los azúcares liberados por hidrólisis ácida de los glucolípidos.



Los glucolípidos purificados por columna de DEAE-celulosa fueron sometidos a hidrólisis ácida suave (0,01 N HCl, 100°C, 10 min.) y la fase acuosa resultante cromatografiada en papel con solvente A. A: glucolípido I; B: glucolípido II; C: glucolípido III.

El trisacárido fue sometido a hidrólisis ácida fuerte (1 M H₂SO₄, 100°C por 3 hs) y luego a cromatografía en papel con solvente A. Únicamente se obtuvo glucosa radiactiva. A fin de confirmar que el trisacárido estaba compuesto exclusivamente por glucosas, fue sometido a reducción con borohidruro de sodio seguida de hidrólisis ácida fuerte. Los productos fueron separados por electroforesis en papel con buffer Q (fig. 64). Se encontró que (¹⁴C)sorbitol y (¹⁴C)glucosa se hallaban en una relación molar de 1/2,2. Estos resultados indican que el trisacárido está formado solamente por glucosas.

FIGURA 64. Electroforesis en papel del trisacárido reducido e hidrolizado.



El trisacárido obtenido por hidrólisis ácida suave del glucolípido III fue reducido con NaBH₄ y posteriormente hidrolizado (1 M H₂SO₄, 100°C, 3 hs) para ser sometido a electroforesis con buffer Q por espacio de 3 hs. Sorb: sorbitol.

A fin de determinar el tipo de unión de las glucosas en el trisacárido se procedió a realizar una oxidación con periodato. La cromatografía en papel con solvente E permitió comprobar que únicamente se formaron eritritol y glicerol, lo que indica que los azúcares están unidos en 1+4. La configuración en que están unidos los azúcares fue determinada por hidrólisis enzimática. La tabla XXIII muestra que el 90% de la radiactividad fue hidrolizada por acción de la β -glucosidasa, en cambio solo un 8% lo hizo con la α -glucosidasa. Estos resultados nos indican claramente que el trisacárido es celotriosa. El trisacárido, además, cocromatografía con celotriosa en electroforesis con buffers Q y R.

TABLA XXIII. Hidrólisis enzimática del trisacárido.

| Enzima | Trisacárido cpm | Mono y disacáridos cpm | Porcentaje de hidrólisis |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|-----------------------------|
| α -glucosidasa | 2.775 | 202 | 8 |
| β -glucosidasa | 314 | 2.826 | 90 |

El trisacárido fue obtenido por elución de cromatogramas en papel con solvente A e incubado con α y β glucosidasas, como se indica en Materiales y Métodos. La fase acuosa se cromatografió en papel con solvente A y las zonas del cromatograma asociadas a glucosa, di y trisacárido fueron cortadas y contadas en líquido de centelleo.

4. Efecto de la temperatura en la formación de glucolípidos

En otros sistemas, como ser plantas superiores (Romero y Pont Lezica, 1977) y bacterias (Dankert y col., 1972), la temperatura de incubación afecta diferencialmente la formación de derivados mono y

pirofosfóricos de poliprenoles. La figura 65 muestra los resultados obtenidos en algas. La formación de glucolípido I (identificado como Dol-P-Glc) fue fuertemente inhibida por la baja temperatura (0°C). Otro tanto ocurrió con los glucolípidos neutros. Por el contrario, el glucolípido II (Dol-P-Glc), un derivado pirofosfórico, fue aparentemente estimulado.

5. Lípido-oligosacáridos

a) Análisis de fracciones lipídicas extraídas con cloroformo-metanol

Cuando las incubaciones de membranas con UDP-(¹⁴C)Glc fueron extraídas por el método B (ver Materiales y Métodos) se observó incorporación de radiactividad en las distintas fracciones.

La fracción que se extrae con cloroformo-metanol (2:1, v/v) fue sometida a hidrólisis ácida suave. El 85% de la radiactividad no fue afectada por el tratamiento y fue considerada como perteneciente a glucolípidos neutros. Cuando el 15% restante (ácido labil) fue cromatografiado en papel con solvente C (fig. 66A), el 80% de la radiactividad migró como glucosa, un 3% como celobiosa y un 17% en forma cercana a la maltotriosa, de lo cual se concluye que el cloroformo-metanol extrae los glucolípidos ya analizados.

FIGURA 65. Cromatografía en DEAE-celulosa de glucolípidos formados a distintas temperaturas.

Las incubaciones fueron llevadas a cabo a 25°C por 30 minutos y a 0°C por 120 minutos. Los extractos butanólicos de varias incubaciones en esas condiciones se reunieron y cromatografiaron en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con 99% metanol y eluída con un gradiente lineal de acetato de amonio (0-0,4 M) en el mismo solvente. Se colectaron fracciones de 3 ml contándose alícuotas de 1 ml por fracción. GL I: glucolípido I; GL II: glucolípido II.

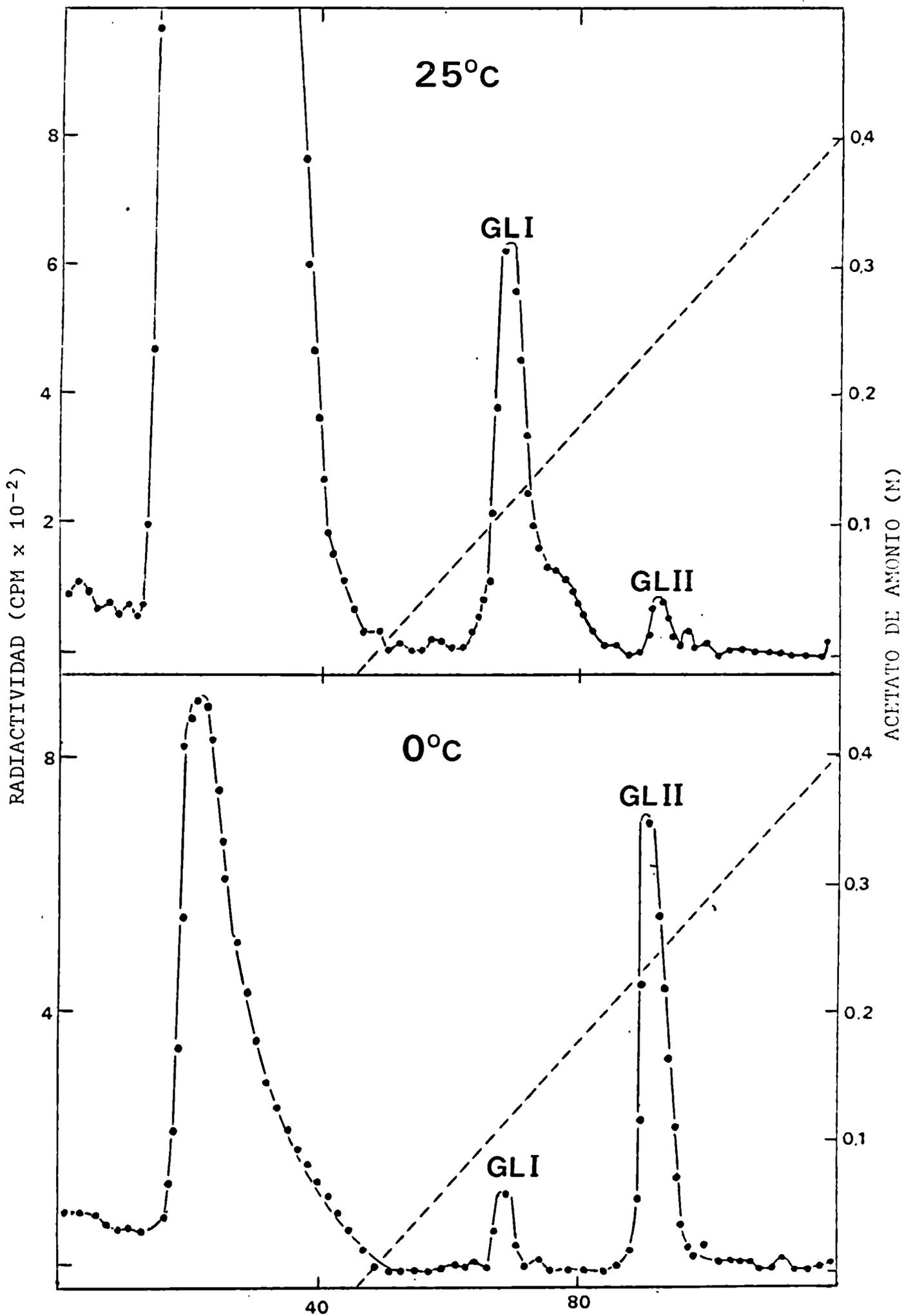
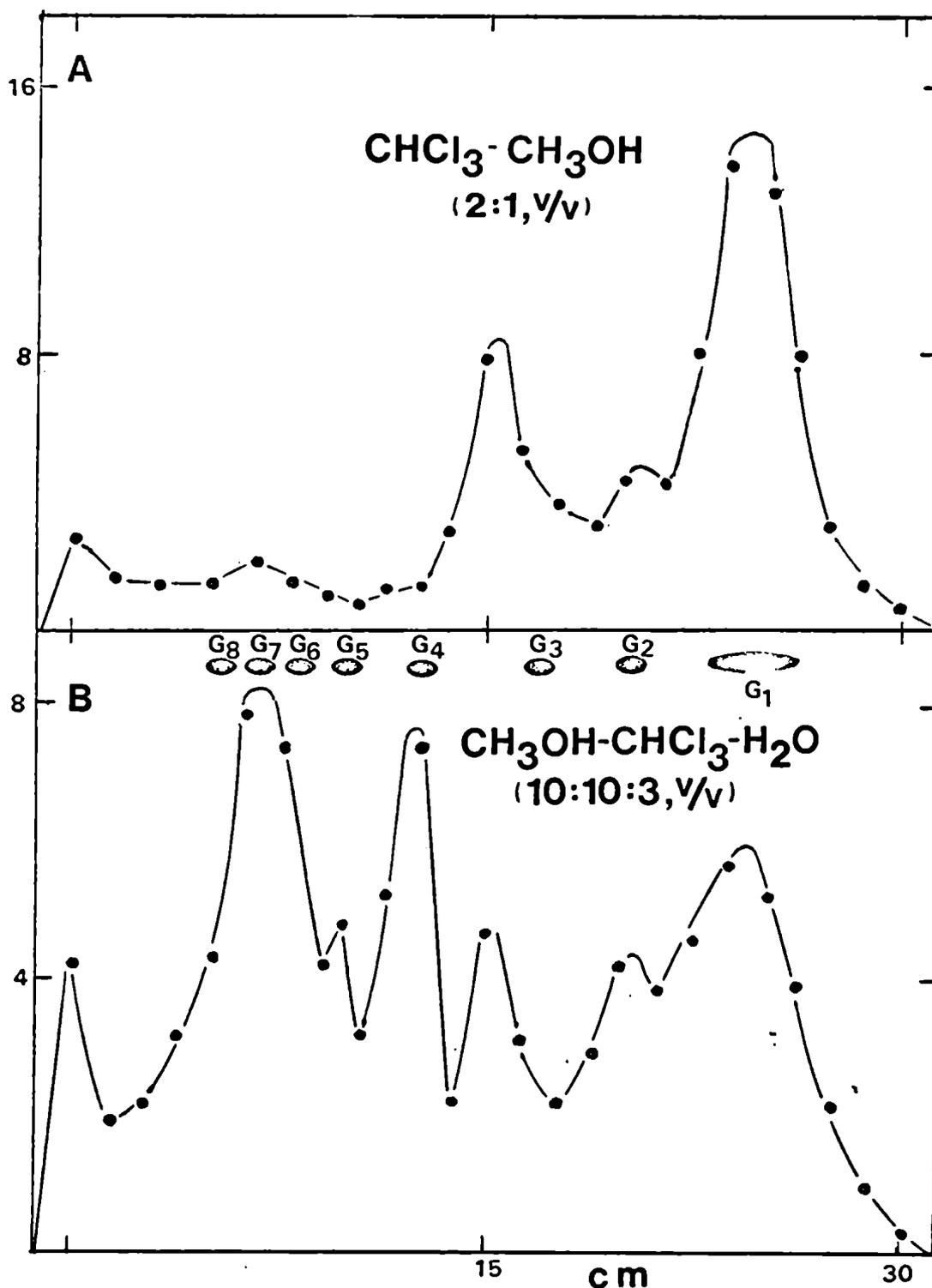


FIGURA 66. Cromatografía en papel de los azúcares extraídos con cloroformo-metanol y cloroformo-metanol-agua.



Los extractos lipídicos en cloroformo-metanol (2:1, v/v) en el caso A, y cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v) en el caso B, fueron sometidos a hidrólisis ácida suave (pH 2, 100°C, 10 min.) y los azúcares así liberados sometidos a cromatografía en papel con solvente C. G_1 - G_8 : hidrolizado de almidón.

b) Análisis de glucolípidos extraídos con cloroformo-metanol-agua

El 1,5% de la radiactividad total pudo ser recuperada en la fracción extraída con cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v). Este método de extracción permite el aislamiento específico de lípido-oligosacáridos. El material así obtenido es lábil (90%) a condiciones ácidas suaves, liberando oligosacáridos que fueron analizados por cromatografía en papel con solventes C (fig. 66B), F (fig. 70B) y J. Los cromatogramas indican que se trata de una familia conteniendo 1 a, aproximadamente, 7 hexosas en su composición molecular. Con el objeto de tener una idea más precisa del largo promedio de la cadena de oligosacáridos se realizó una reducción con borohidruro de sodio, seguida por hidrólisis ácida fuerte y electroforesis como se indicó para el caso del glucolípidos III en la figura 64. La relación glucosa/sorbitol así obtenida fue de 5 a 1, indicando un largo promedio de 6 hexosas. A fin de obtener información respecto al tipo de unión interglucosídica, los oligosacáridos más largos fueron eluidos de cromatogramas en papel y sometidos a oxidación con periodato y a hidrólisis enzimática con celulasa.

Los resultados del tratamiento con periodato se muestran en la tabla XXIV. Los únicos productos formados fueron eritritol y glicerol en una relación 3,2 a 1. Esto nos indica que los oligosacáridos se encuentran unidos en 1+4 y que el largo promedio del material tratado fue de 8 hexosas.

La hidrólisis enzimática con celulasa produjo, fundamentalmente, la formación de glucosa y celobiosa a juzgar por el comportamiento de los productos en electroforesis con buffers Q y R (fig. 67), lo cual es indicación de que la unión es de tipo β . Con el objeto de confirmar que el glucano está unido al lípido mediante una unión pirofosfato, el extracto fue sometido a cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo-metanol-agua (10:10:3) y eluida con un gradiente lineal de acetato de amonio en el mismo solvente. La figura 68 muestra la aparición de un pico en una posición

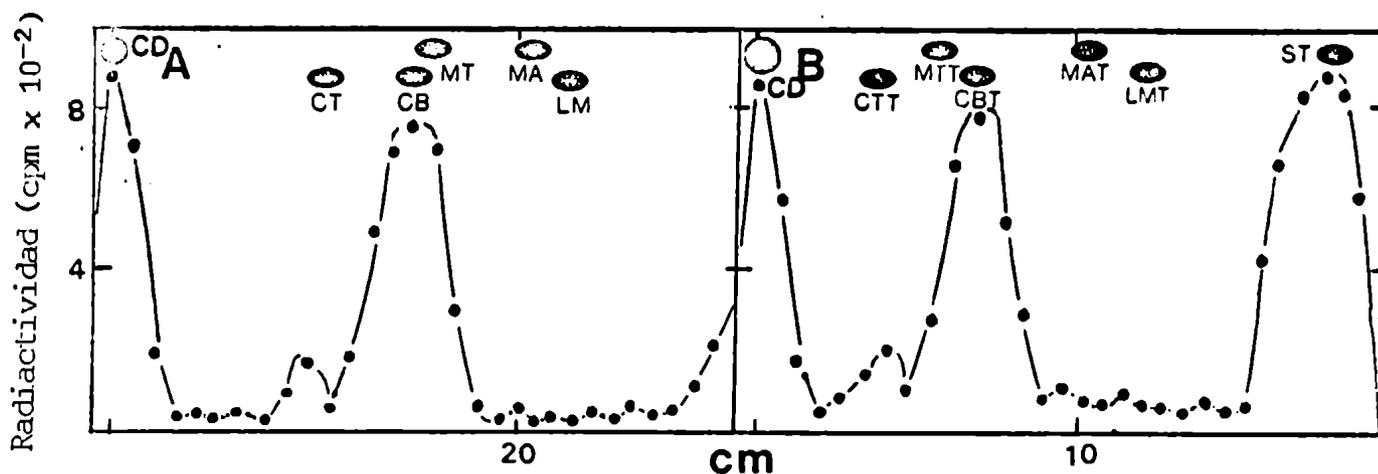
TABLA XXIV. Degradación de Smith de oligosacáridos.

| Productos | Cpm | Cpm corregidas para número de C |
|-----------------------------|------|---------------------------------|
| Glicerol | 288 | 576 |
| Eritritol | 1225 | 1837 |
| Sorbitol | ND | - |
| Relación eritritol:glicerol | | 3,2:1 |

El material soluble en cloroformo-metanol-agua (10:10:3) fue hidrolizado (pH 2, 100°C, 10 min.) y los oligosacáridos liberados cromatografiados en papel con solvente C. Los oligosacáridos de más largo de cadena fueron eluidos y oxidados con metaperiodato de sodio. Los productos fueron separados por cromatografía en papel con solvente E y las zonas del cromatograma correspondientes a los patrones de glicerol, eritritol y sorbitol, cortadas y contadas. ND: no detectado.

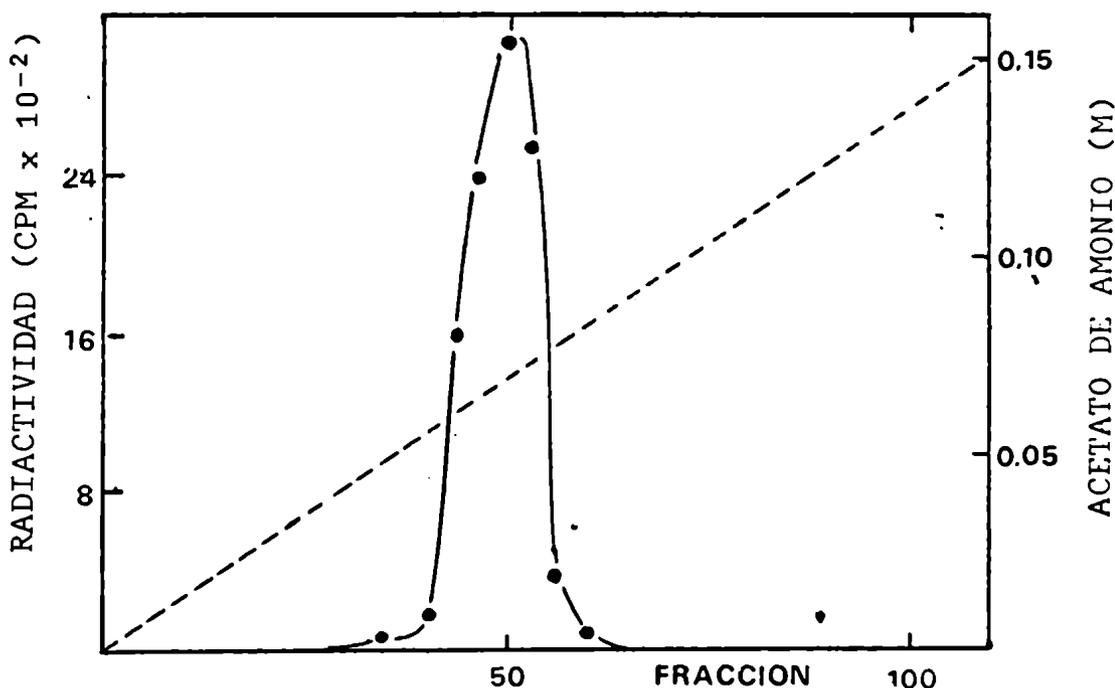
coherente con la de un lípido azúcar pirofosfato (Behrens y col., 1973). Cuando este pico fue sometido a cromatografía en papel con el solvente alcalino I, no se observó radiactividad alguna asociada con el frente de solvente (que es el caso de los lípidos monofosfóricos como el Dol-P-Glc). En cambio, se observó radiactividad asociada a una familia de compuestos (de 1 a más de 4 hexosas). Esto indica la presencia de una familia de azúcares unidos a lípido que fue hidrolizada por efecto del solvente alcalino en que se realizó la cromatografía, dando lugar a los respectivos ésteres cíclicos de fosfato de movilidad menor que el Dol-P-Glc (fig. 69).

FIGURA 67. Electroforesis de oligosacáridos hidrolizados con celulasa.



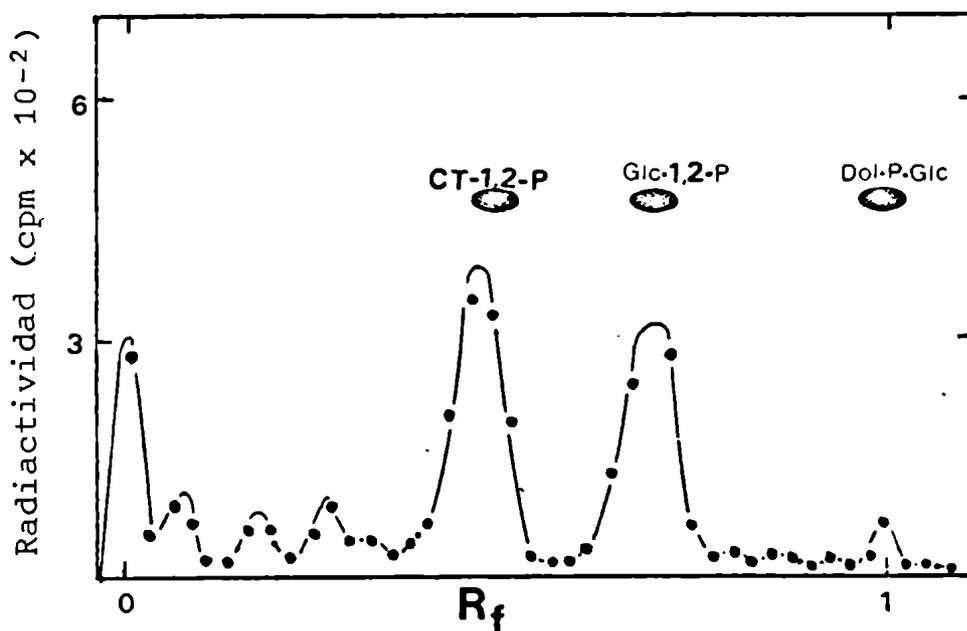
Los oligosacáridos de cadena larga (de más de 4 hexosas) fueron eluidos de cromatogramas como el de la figura 66B, e incubados por 72 hs con celulasa. Los productos del tratamiento fueron sometidos a electroforesis con buffer R en el caso A, y buffer Q en el caso B. CD: celodextrina; CB: celobiososa; CT: celotriosa; MA: maltosa; MT: maltrososa; LM: laminaribiososa; CBT: celobitol; CTT: celotriitol; MTT: maltotriitol; MAT: maltitol; LMT: laminaribitol.

FIGURA 68. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de lípido-oligosacáridos.



El extracto clorofórmico conteniendo los lípido-oligosacáridos, fue cromatografiado en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo-metanol-agua (10:10:3) y eluida con un gradiente lineal de acetato de amonio (0-0,15 M) en el mismo solvente. Se colectaron fracciones de 3 μ l contándose alícuotas de 0,5 ml por fracción.

FIGURA 69. Cromatografía en papel con solvente alcalino de lípido-oligosacáridos.



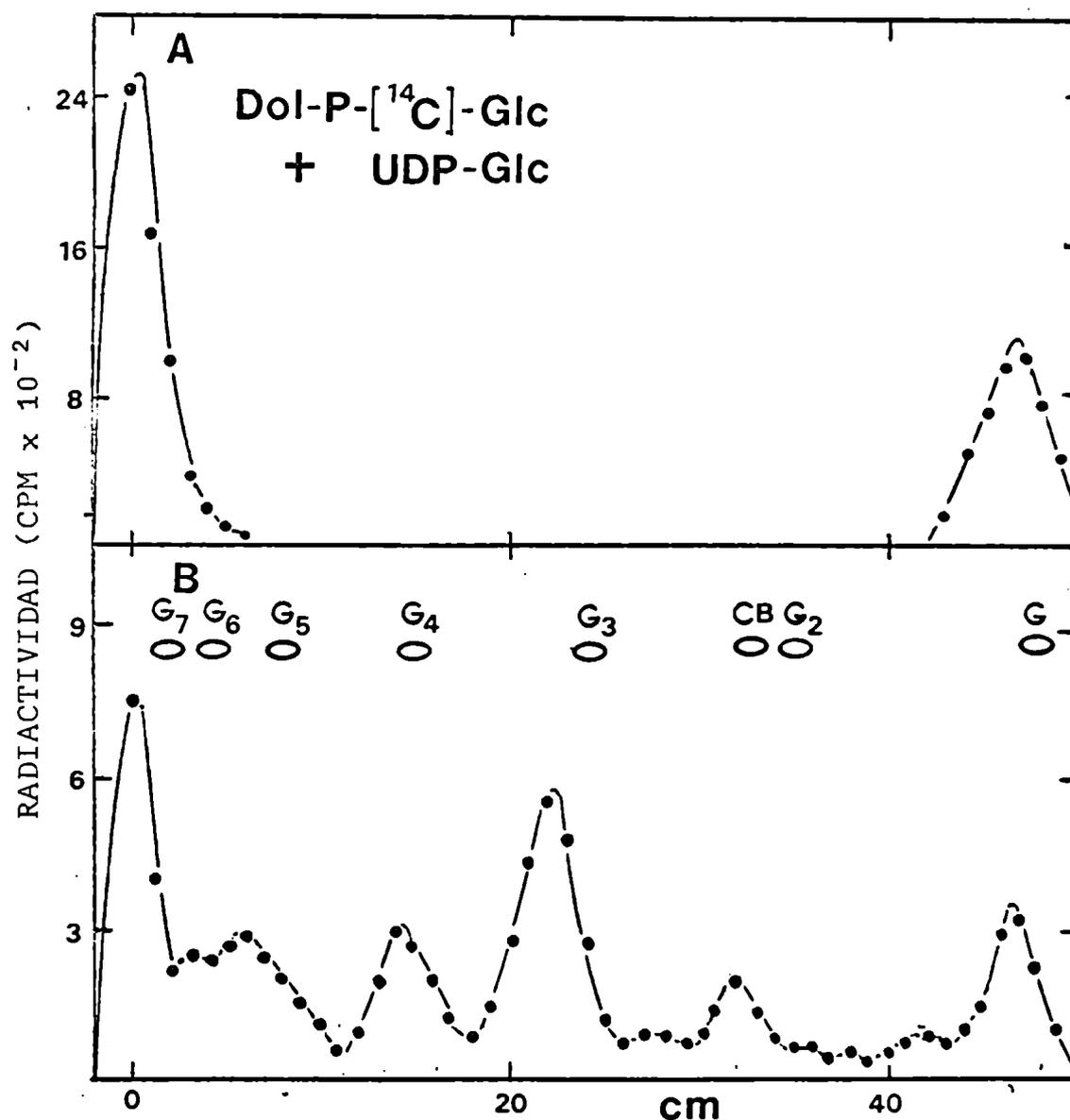
Los lípidos oligosacáridos purificados por columna de DEAE-celulosa, como indica la figura anterior, fueron cromatografiados en papel con solvente I. Glc-1,2-P: glucosa-1,2-fosfato cíclico; CT-1,2-P: celotriosa-1,2-fosfato cíclico.

6. Papel del Dol-P-Glc

Con el objeto de obtener información sobre el papel metabólico del Dol-P-Glc, se realizaron incubaciones con fracciones particuladas y Dol-P-(^{14}C)Glc. La figura 70A muestra que la glucosa es transferida al lípido oligosacárido cuando ya este posee un largo de cadena de por lo menos 5 hexosas.

Con el objeto de investigar si el Dol-P-Glc actúa como intermediario en la formación de glicanos complejos, se llevó a cabo

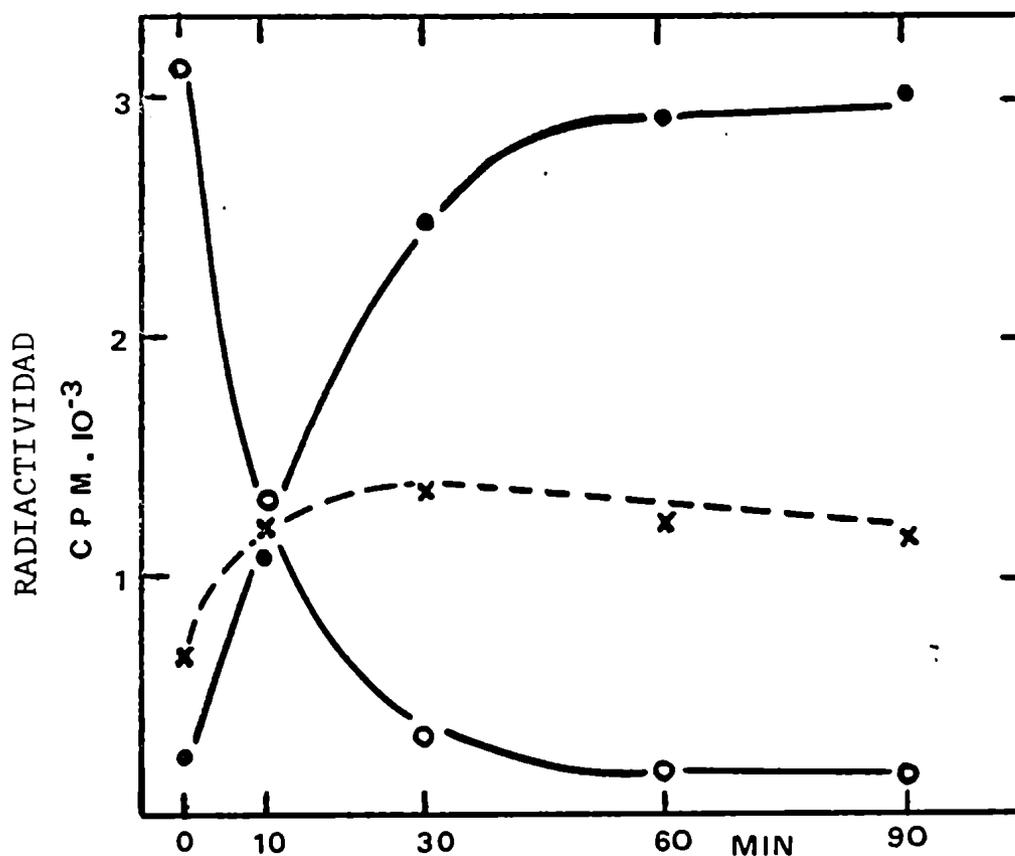
FIGURA 70. Cromatografía de oligosacáridos obtenidos a partir de Dol-P-(^{14}C)Glc.



Extractos de cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v) hidrolizados en condiciones de acidez suave y cromatografiados en papel con solvente F, procedentes de A) Incubación de enzima P₁₀₀ con Dol-P-(^{14}C)Glc y 0,1 mM UDP-Glc. El medio de incubación contiene, además, 0,05% Triton X-100; B) Incubación en las condiciones tipo con UDP-(^{14}C)Glc. G: glucosa; G₂ - G₇: hidrolizado de almidón; CB: celobiosa.

otro experimento en el tiempo incubando con Dol-P-(^{14}C)Glc y UDP-Glc no radiactivo. Los resultados se muestran en la figura 71 e indican que el decrecimiento en la radiactividad asociada a butanol se ve acompañada por un incremento en la radiactividad hidrosoluble y, en menor medida, en el precipitado insoluble en los solventes de extracción empleados. El análisis de la fracción acuosa denotó que

FIGURA 71. Transferencia de (^{14}C)Glc a partir de Dol-P-(^{14}C)Glc en el tiempo.



Las incubaciones se realizaron con 5000 cpm de Dol-P-(^{14}C)Glc y 0,1 nM UDP-Glc no radiactiva en presencia de 0,1% Triton X-100 y demás componentes de la mezcla de incubación. A distintos tiempos la reacción fue detenida con butanol, y extraída con el mismo solvente. ●—●, radiactividad soluble en butanol; ○—○, radiactividad soluble en agua; x---x, radiactividad insoluble en butanol y en agua.

el 80% de la radiactividad estaba asociada a glucosa, a juzgar por su movilidad en cromatografía en papel con solvente J, probablemente liberada por acción de glucosidasas endógenas. El 20% restante, en cambio, permaneció en el origen, lo que hace pensar que se trata de un polímero de alto peso molecular, similar al encontrado en las incubaciones con UDP-(¹⁴C)Glc.

El precipitado insoluble no fue analizado en más detalle, pero es probable que, al menos parte del mismo, sea lípido-oligosacáridos solubles en cloroformo-metanol-agua (10:10:3) pero insolubles en butanol.

IV. FORMACION DE POLIMEROS

1. Caracterización del polímero soluble en agua

En la tabla VI observamos que al incubar UDP-(^{14}C)Glc con membranas de alga, aproximadamente el 0,81% de la radiactividad total se incorpora a un compuesto hidrosoluble que permanece en el origen al ser cromatografiado en papel con solvente J. Este comportamiento nos indicaría la presencia de un polímero soluble en agua (PSA) de peso molecular relativamente alto. Esta suposición fue confirmada por cromatografía en columna de Sephadex G-50 dado que el compuesto se excluyó de la misma, eluyendo con el volumen muerto.

La naturaleza química del PSA fue deducida por tratamiento con una variedad de enzimas hidrolíticas que se resumen en la tabla XXV.

TABLA XXV. Hidrólisis enzimática y β -eliminación del (^{14}C)PSA.

| Tratamiento enzimático | PSA no hidrolizado cpm | PSA hidrolizado cpm | Hidrólisis % |
|------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|
| Pronasa | 8.520 | 8.680 | 50 |
| Dextranasa | 16.508 | 1.886 | 10 |
| α -glucosidasa | 12.728 | 3.430 | 21 |
| β -glucosidasa | 1.295 | 25.308 | 95 |
| α -amilasa | 15.406 | 1.800 | 10 |
| Celulasa | 600 | 25.450 | 97 |
| β -eliminación | 9.318 | 227 | 3 |

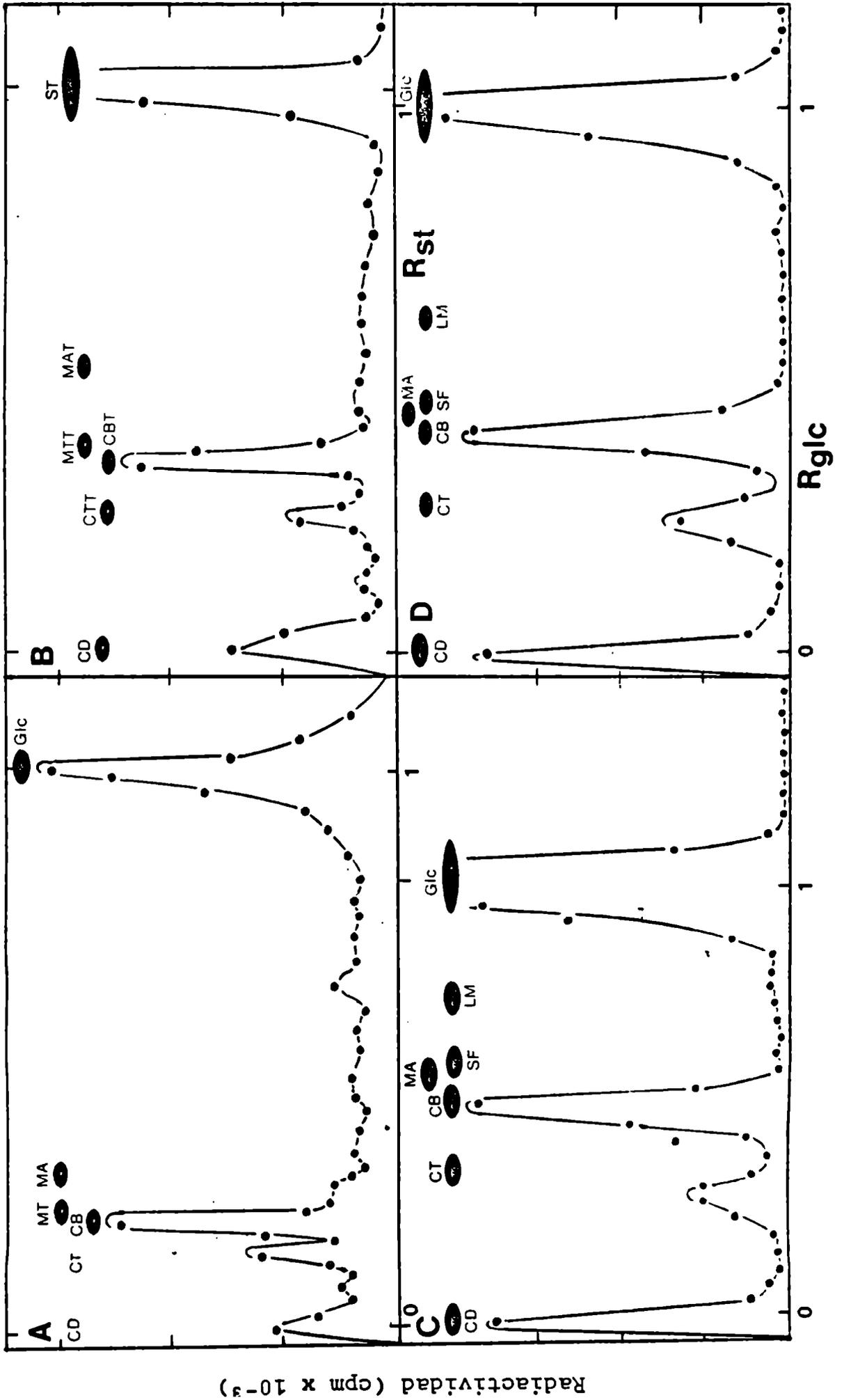
Muestras de PSA fueron tratadas con diferentes enzimas así como a condiciones alcalinas, como se describe en Materiales y Métodos. Después de incubación, las muestras fueron cromatografiadas en columnas de Sephadex G-50 o G-25. La radiactividad que eluyó con el V_0 fue considerada como PSA no hidrolizado, y la marca que se incluyó en la columna como PSA hidrolizado.

Tanto en el tratamiento con una combinación de enzimas proteolíticas, como con pronasa, se obtiene una substancial hidrólisis (60 y 50% respectivamente) del PSA. El análisis del producto hidrolizado con pronasa por cromatografía en papel con solvente J indica que el 80% del mismo era de alto peso molecular (permanece en el origen), lo cual descarta la posibilidad de que hubiese sido hidrolizado por glucosidasas contaminantes. La porción glicosídica solo pudo ser hidrolizada con β -glucosidasa y celulasa (95 y 97% de hidrólisis, respectivamente), de lo cual se concluye que el oligosacárido está formado por hexosas unidas en configuración β . La figura 72 muestra los resultados que se obtienen cuando el hidrolizado se sometió a cromatografía y electroforesis en cuatro sistemas distintos. Los productos principales fueron glucosa, celobiosa y celotriosa, por lo que se concluye que el PSA es una proteína "celulósica".

A fin de confirmar estos datos, se sometió al PSA a degradación de Smith. Los resultados se resumen en la tabla XXVI e indican que los productos formados fueron eritritol y glicerol, en una relación molecular de 8,3 a 1. Se concluye de este experimento que el oligosacárido está formado por glucosas unidas en 1 \rightarrow 4 y que el largo promedio de la cadena glicosídica es de 9-10 hexosas.

FIGURA 72. Cromatografía en papel y electroforesis del hidrolizado de PSA.

Muestras de PSA fueron hidrolizadas con celulasa y cromatografiadas en una columna de Sephadex G-25; el material que se incluyó en la columna fue cromatografiado en papel con solventes B (C) y G (D). El mismo material se sometió a electroforesis con buffer R (A) y después de reducción con borohidruro a electroforesis con buffer Q (B). CD: celodextrina; CT: celotriosa; CB: celobiosa; SF: soforosa; MA: maltosa; MT: maltotriosa; LM: laminaribiosa; CTT: celotriitol; CBT: celobiitol; MTT: maltotriitol; MAT: maltitol. En A, C y D se representa el $R_{glucosa}$, y en B el $R_{sorbitol}$.



Radiactividad (cpm x 10⁻³)

TABLA XXVI. Degradación de Smith del PSA.

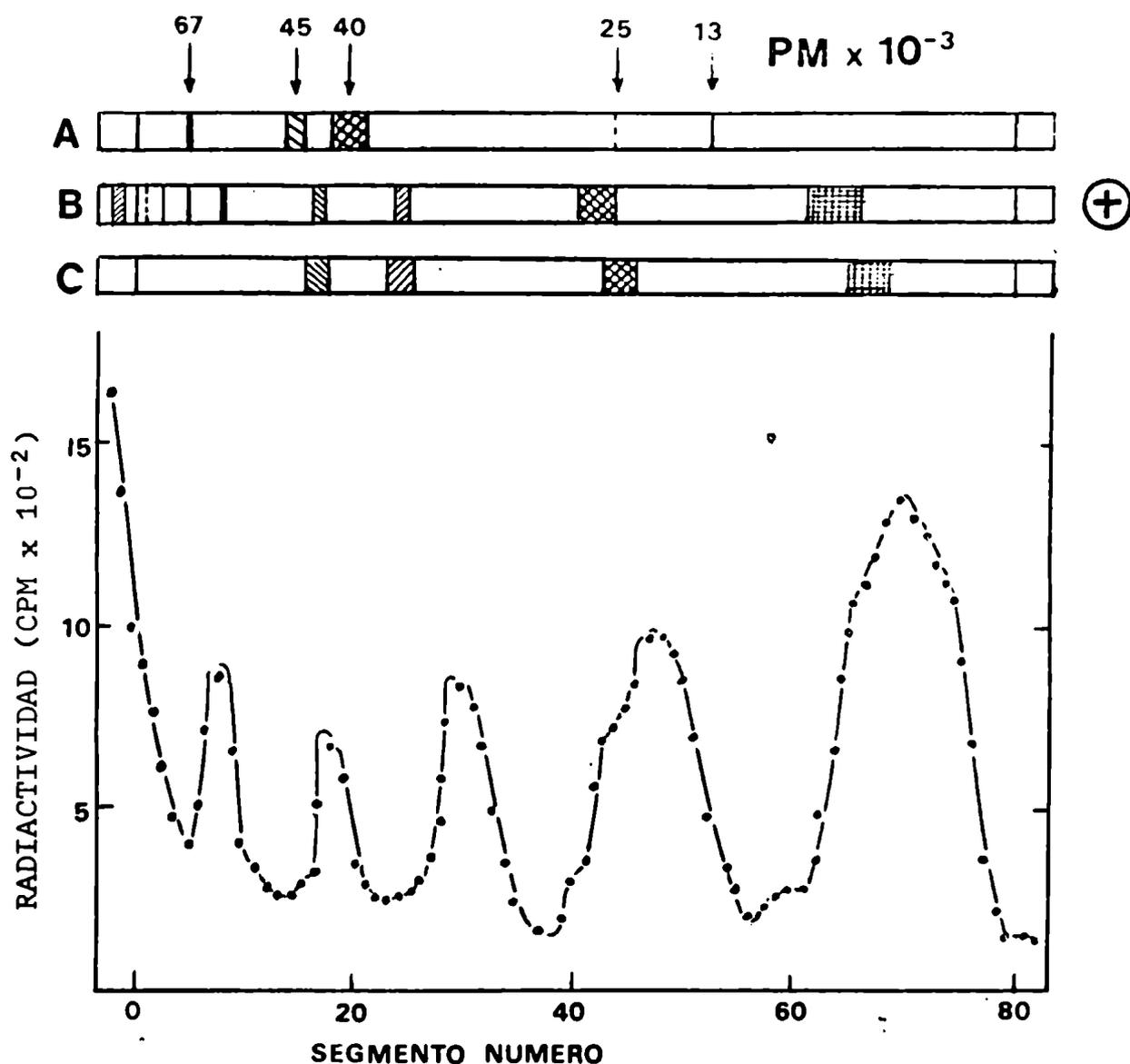
| Productos | Cpm | Cpm corregidos para el número de C |
|-----------------------------|-------|------------------------------------|
| Glicerol | 341 | 682 |
| Eritritol | 3.771 | 5.656 |
| Sorbitol | ND | - |
| Relación eritritol:glicerol | | 8,3:1 |

La muestra radiactiva fue oxidada con metaperiodato de sodio y reducida posteriormente con NaBH_4 e hidrolizada con H_2SO_4 para separar los productos por cromatografía en papel con solvente E. Las zonas del cromatograma correspondientes a los alditoles que se muestran en la tabla fueron cortadas para ser contadas en líquido de centelleo. ND: no detectado.

La naturaleza glucoproteica fue confirmada por electroforesis en gel de poliacrilamida. La figura 73 muestra la aparición de bandas de radiactividad que se corresponden con bandas de similar movilidad, que se tiñen tanto con colorantes específicos de proteínas, como de hidratos de carbono, con pesos moleculares de aproximadamente 58.000, 44.000, 27.000, 16.000 y 9.000.

A fin de investigar el sitio de unión del oligosacárido a la porción proteica, el PSA se sometió a una β -eliminación. En caso de producirse hidrólisis, es de esperarse que el glucano, debido a su tamaño (10 hexosas), se incluya en la columna de Sephadex G-50. En la tabla XXV puede observarse que prácticamente toda la radiactividad eluyó con el volumen muerto, concluyéndose que no se produjo hidrólisis y que por lo tanto el oligosacárido no se halla unido a serina ni a treonina.

FIGURA 73. Electroforesis en gel de poliacrilamida del PSA.



Se realizaron incubaciones en gran escala de membranas de alga y UDP-Glc radiactiva y no radiactiva, en condiciones tipo. Después de extracción con butanol, las fases acuosas fueron concentradas y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describe en Materiales y Métodos. El gel donde se sembró (^{14}C)PSA, se cortó en segmentos de 1 mm, incubó con H_2O_2 y contó en líquido de centelleo. El gel que se representa en B, fue teñido con Amido-Schwarz, y el que se representa en C con reactivo de Schiff (específico de hidratos de carbono). El gel representado en A contiene enzimas de pesos moleculares conocidos que se insertaron en la figura.

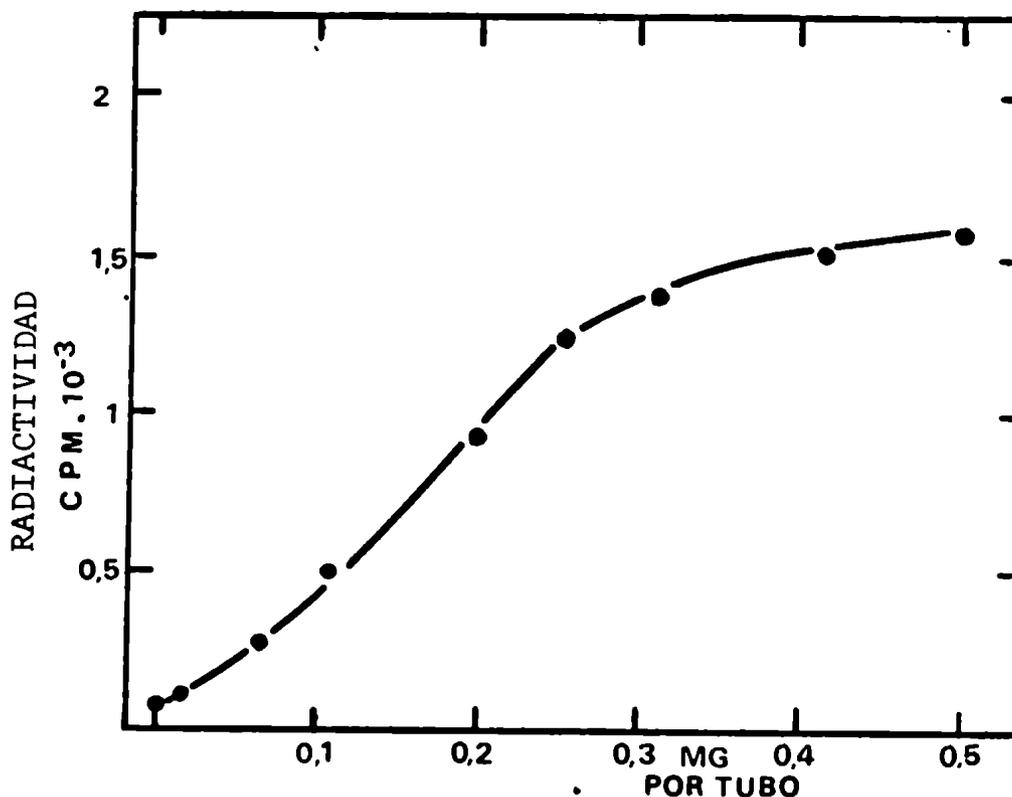
2. Condiciones de formación del PSA

Se estudiaron las condiciones en que se forma el PSA en presencia de UDP-Glc y membranas.

a) Proteínas

En la figura 74 puede observarse que la incorporación de glucosa a PSA es linealmente dependiente de la cantidad de proteínas hasta una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{tubo}$.

FIGURA 74. Efecto de la concentración de proteínas.

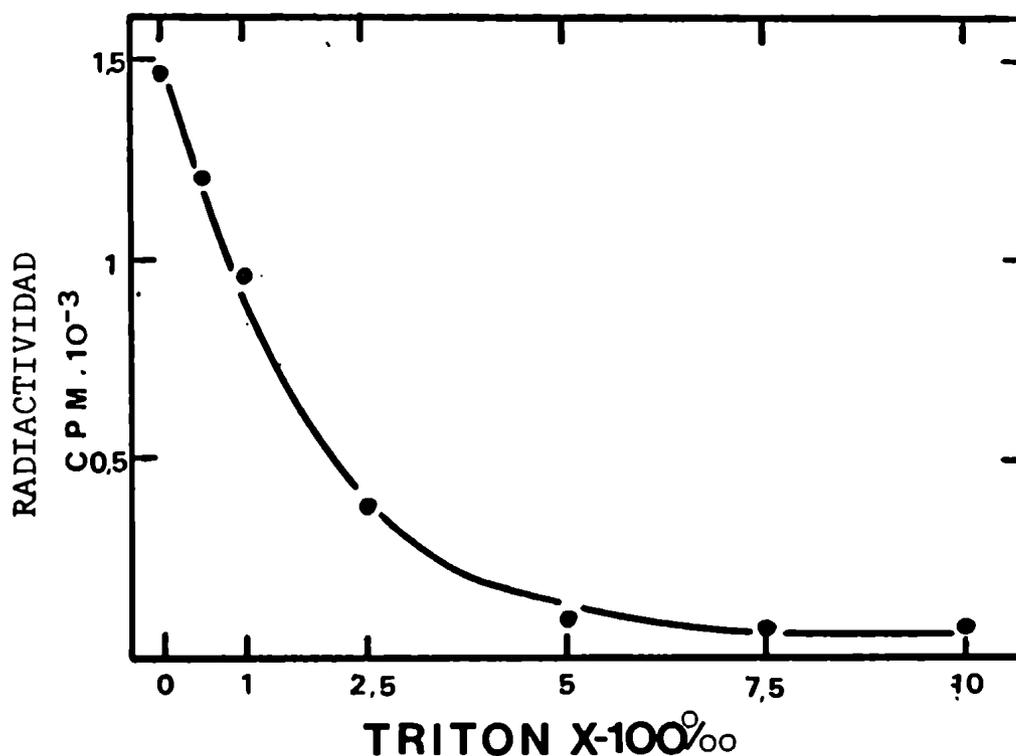


Las incubaciones se realizaron en las condiciones tipo y en presencia de UDP-(¹⁴C)Glc excepto por la concentración de proteínas y los productos extraídos con butanol. La fase acuosa fue cromatografiada con solvente J. La radiactividad remanente en el origen fue considerada PSA.

b) Detergente

A diferencia de lo observado con los glucolípidos (fig. 35 y 56) el Triton X-100 inhibe fuertemente la transferencia de glucosa a PSA. Una concentración de 0,5% de Triton X-100 es suficiente para producir una inhibición del 95% en la formación de PSA (fig. 75).

FIGURA 75. Efecto del Triton X-100.



Las incubaciones se llevaron a cabo en las condiciones habituales excepto por el agregado de Triton X-100. El análisis de productos se realizó como en la figura anterior. Proteínas: 210 µg/tubo.

c) Cationes, pH y concentración de UDP-Glc

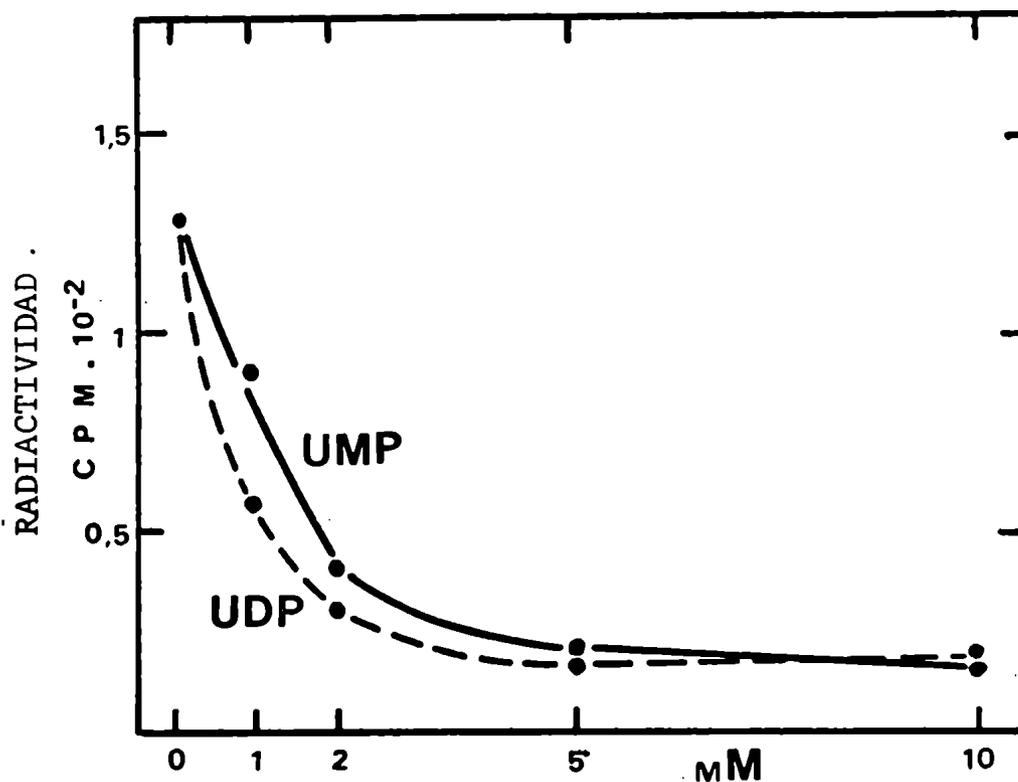
Cuando se analizó el efecto de cationes, pH y concentración de UDP-Glc, se notó un comportamiento similar al observado para la formación de glucolípidos polares. El catión de mayor efecto estimula-

dor es el Mg^{++} en una concentración de 10 mM; el pH óptimo es de 7,5 y la reacción es linealmente dependiente de la concentración de UDP-Glc hasta un valor de 2×10^{-5} M.

d) Efecto de UDP y UMP

La figura 76 muestra el efecto que tienen UMP y UDP en la incorporación al ser agregados a la mezcla tipo de incubación. Es singular el hecho de que ambos inhiban en forma similar la formación de PSA, puesto que implica la participación de un sistema mixto en su génesis.

FIGURA 76. Inhibición por UMP y UDP.



Las incubaciones se realizaron en la forma habitual excepto por el agregado de UMP o UDP, y el análisis de productos como en la figura 74. Proteínas: 210 μ g/tubo.

Los poliprenil fosfato azúcares son conocidos intermediarios en la síntesis de glicanos complejos en otros sistemas y es interés de este trabajo encontrar evidencias respecto al aceptor final de restos glucosídicos en algas. El efecto del UMP en el sistema indica que una reacción que implica la transferencia de glucosa-fosfato a partir de UDP-Glc es necesaria para la síntesis del PSA, que bien pudiera ser la formación de Dol-PP-Glc.

3. Transferencia de (¹⁴C)azúcares a polímeros

a) Incorporación en el tiempo

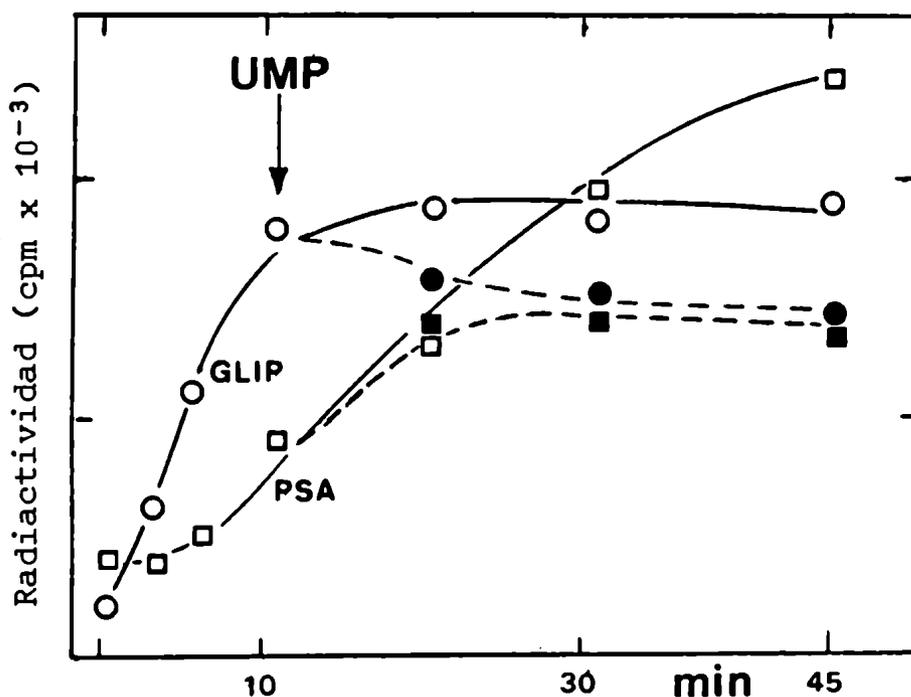
Las fracciones particuladas de P. zopfii incorporan radiactividad a glucolípidos y polímeros. La figura 77 muestra la incorporación de radiactividad en estas fracciones, a distintos tiempos. La aparición de marca en las mismas está de acuerdo con una posible relación sustrato a producto. Cuando se agregó UMP a los 10 min. de incubación, la formación de glucolípidos se detuvo de inmediato. En cambio, la formación de polímeros siguió por, aproximadamente, 10 min. más, luego se inhibió. Este período de 10 min. puede ser debido a la presencia de precursores que deben ser consumidos antes de que la inhibición tenga efecto.

b) Efecto de poliprenil fosfatos exógenos

Se demostró en este trabajo que el agregado de poliprenil fosfatos exógenos estimula la incorporación de glucosa a lípidos. Si la incorporación de glucosa a polímeros fuera mediada por lípidos, debería esperarse un aumento en la formación de polímeros por agregado de poliprenil fosfatos.

La tabla XXVII muestra los resultados de este experimento y en el cual la concentración de detergente fue 0,1%. Se observó que el Triton X-100 inhibe la formación de polímeros (fig. 75). Sin

FIGURA 77. Incorporación de glucosa a lípidos y PSA en el tiempo.



Las incubaciones se realizaron en los períodos de tiempo indicados en las condiciones tipo. o—o: GLIP: glucolípidos polares; □—□: PSA; ●---●: GLIP + UMP (5 mM); ■---■: PSA + UMP (5 mM). El agregado de UMP a las mezclas de incubación se indica con una flecha.

embargo, a una concentración del 0,1% solo se obtiene una inhibición del 20%, lo que permite usarlo pues el detergente es necesario para la solubilización del Fic-P.

c) Transferencia de radiactividad de glucolípidos a polímeros.

Con el objeto de tener evidencias adicionales de la relación entre glucolípidos y PSA, y del papel de cada uno de los glucolípidos descriptos, se realizaron experimentos en dos tiempos.

TABLA XXVII. Efecto de Fic-P en la formación de glucolípidos y PSA

| Agregados | Glucolípidos cpm | PSA cpm |
|---|---------------------|------------|
| Ninguno | 1325 | 1088 |
| Triton X-100 (0,1%) | 1850 | 876 |
| Fic-P (0,1 nmol) + Triton X-100 (0,1%) | 2106 | 976 |
| Fic-P (1 nmol) + Triton X-100 (0,1%) | 3247 | 2434 |

Se llevaron a cabo incubaciones a 0°C por 2 horas con UDP-Glc radiactivo o no radiactivo (tabla XXVIII A y B). En estas condiciones (fig. 66) se forma preponderantemente Dol-PP-Glc. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron centrifugadas y lavadas tres veces con cien veces el volumen de incubación. Los precipitados así lavados fueron reincubados por 1 hora a 25°C en distintas condiciones que se detallan en la tabla. Los precipitados lavados estaban libres de UDP-Glc y PSA, pero los glucolípidos fueron retenidos por las membranas. Cuando no se agregaron reactivos, no se observó incorporación a Dol-PP-(Glc)₃, lípido-oligosacáridos o PSA. Lo mismo ocurrió cuando se agregó Dol-P-(¹⁴C)Glc a la mezcla de incubación. Sin embargo, cuando el agregado de Dol-P-(¹⁴C)Glc se acompañó con UDP-Glc no radiactivo, se notó transferencia de radiactividad a lípido-oligosacáridos y a PSA, lo cual confirma lo observado en las figuras 70 y 71. Pero por otro lado, no se notó incorporación a Dol-PP-(Glc)₃, lo cual indica que el Dol-P-Glc no interviene en su formación. Las incubaciones con UDP-Glc tanto radiactiva como no radiactiva; indican que probablemente se forma por transferencia de glucosas de UDP-Glc a Dol-PP-Glc.

Este último glucolípido parece ser el aceptor de azúcares que da lugar al lípido-oligosacárido (tabla XXVIII) el cual transfiere la cadena hidrocarbonada al PSA.

TABLA XXVIII. Interrelaciones metabólicas entre glucolípidos y proteínas.

| Adiciones a la segunda incubación | Dol-P-Glc + Dol-PP-Glc cpm | Dol-PP-(Glc) ₃ cpm | LOS cpm | PSA cpm |
|---|----------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| A Ninguna | 4.954 | 116 | 95 | 239 |
| A UDP-Glc(0,1 mM) | 2.807 | 928 | 750 | 1.096 |
| B Dol-P-(¹⁴ C)Glc | 158.000 | 95 | 600 | 227 |
| B UDP-(¹⁴ C)Glc | 8.791 | 983 | 3.264 | 6.351 |
| B Dol-P-(¹⁴ C)Glc + UDP-Glc (0,1 mM) | 149.000 | 88 | 7.588 | 2.366 |

La primera incubación se llevó a cabo a 0°C en condiciones tipo por 2 horas. En A con UDP-(¹⁴C)Glc y en B con 0,1 mM UDP-Glc no radiactiva. Después de la incubación, la mezcla de reacción fue centrifugada para eliminar la UDP-Glc remanente. Los precipitados fueron lavados con buffer 3 veces (con 100 veces el volumen de incubación) y reincubados a 25°C por 60 min. con las adiciones indicadas y 0,05% Triton X-100. Al finalizar la segunda incubación, los glucolípidos fueron extraídos, sometidos a hidrólisis ácida y los mono, tri y oligosacáridos identificados por cromatografía en papel con solvente A. LOS: lípido-oligosacáridos.

4. Presencia de celulosa en la pared celular de *P. zopfii*

La composición química de los oligosacáridos unidos a lípido y proteína investigados en este trabajo hizo muy sugestiva la hipótesis de que los mismos pudieran ser intermediarios en la síntesis de celulosa en *P. zopfii*. Dado que la composición química de la

pared de este alga no fue exhaustivamente estudiada, teniendo únicamente datos sobre las hexosas que forman su estructura (glucosa manosa y glucosamina; Lloyd y Turner, 1968), se procedió a aislar y caracterizar los polisacáridos álcali-insolubles de la misma. Los polisacáridos fueron sometidos a acetólisis por 100 horas y los productos, previa deacetilación, analizados por cromatografía en papel con solventes B y G, y electroforesis en papel con buffers Q y R. Los resultados indican la formación de celobiosa y celotriosa, confirmando la existencia de celulosa en la pared celular de P. zopfii.

5. Síntesis de celulosa

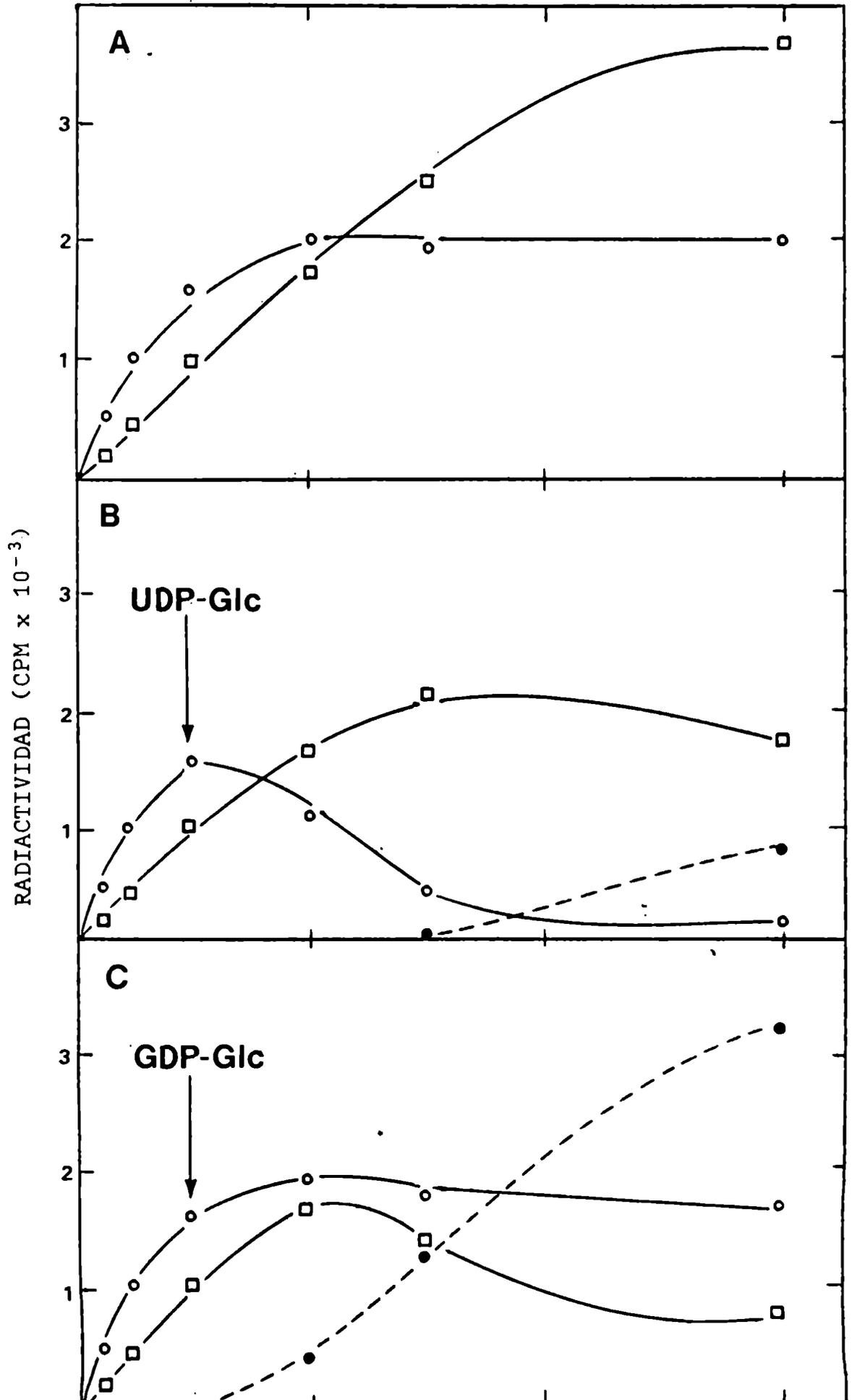
a) Experimentos en el tiempo

Se realizaron experimentos en el tiempo, incubando una combinación de precipitados de 20.000 y 100.000g con UDP-(^{14}C)Glc a 20°C. Después de 10 minutos de incubación se agregaron distintos glucosil nucleótidos. La figura 78A muestra la incorporación de radiactividad a glucolípidos y PSA en el control (sólo UDP-Glc radiactiva). Cuando se agregó ADP-Glc no se detectaron cambios y las curvas fueron las mismas que en el experimento control. En cambio, cuando se agregó UDP-Glc (fig. 78B), la radiactividad tanto en glucolípidos como en PSA sufrió una disminución, como es de esperarse por una dilución isotópica de los productos. Algo de radiactividad se transfirió a un polímero insoluble.

Cuando el pulso se realizó con GDP-Glc (fig. 78C), la radiactividad se transfirió de glucolípidos y PSA a un polímero insoluble. Este último producto es resistente a extracción con álcali caliente como lo es la celulosa.

Las incubaciones se realizaron con UDP-(^{14}C)Glc como precursor radiactivo. En los tiempos indicados (flechas) se agregaron diferentes glucosil nucleótidos (0,1 mM). En A se representa el control sin agregados. Cuando se adicionó ADP-Glc, las curvas fueron similares al caso A. o—o: glucolípidos polares; □—□: PSA; ●---●: polímero insoluble.

FIGURA 78. Efecto de glucosil nucleótidos en la formación de polímeros.



b) Papel de la GDP-Glc

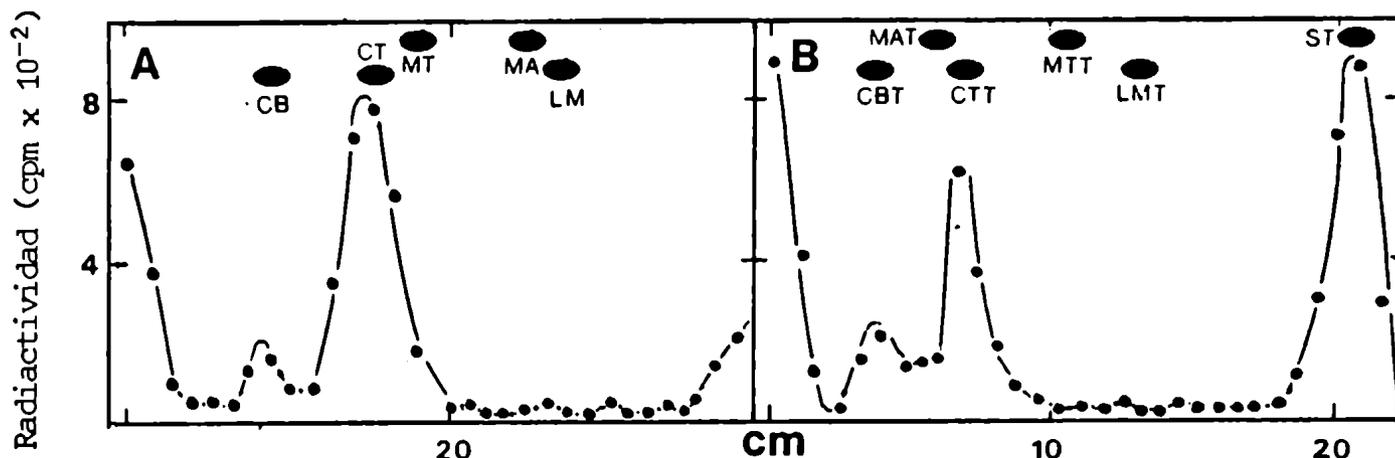
Cuando las incubaciones se llevaron a cabo usando GDP-(^{14}C)Glc y UDP-(^3H)Glc como sustratos (tabla XXIX), se observó la incorporación de glucosa tritiada a todas las fracciones extraídas. En cambio, (^{14}C)glucosa solo pudo ser detectada, en forma significativa, en el precipitado insoluble en álcali caliente. Este precipitado fue sometido a hidrólisis con celulasa y los productos fueron separados por electroforesis en buffer R, y después de reducción con NaBH_4 , a electroforesis en buffer Q (fig. 79). De esta manera pudo detectarse la presencia de celobiosa y celobitol, doblemente marcados, confirmando la naturaleza celulósica del precipitado.

TABLA XXIX. Incorporación de (^{14}C) y (^3H)glucosa en diferentes fracciones.

| Fracciones | (^{14}C)glucosa pmol | (^3H)glucosa pmol |
|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Glucolípidos | 0,00 | 3,49 |
| Lípido-oligosacáridos | 0,00 | 0,48 |
| PSA | 0,07 | 3,70 |
| Precipitado insoluble en álcali | 23,72 | 19,66 |

Las incubaciones se realizaron utilizando GDP-(^{14}C)Glc (590 pmol) y UDP-(^3H)Glc (107 pmol) como sustratos. Al finalizar el período de incubación (30 min.), las fracciones fueron extraídas por el método del cloroformo-metanol. En glucolípidos se incluye la radiactividad soluble en cloroformo-metanol (2:1, v/v) lábil a condiciones ácidas suaves; en lípido-oligosacáridos la marca soluble en cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v) y en PSA la radiactividad que eluye con el V_0 de una columna de Sephadex G-50.

FIGURA 79. Electroforesis en papel del hidrolizado de polímero insoluble.

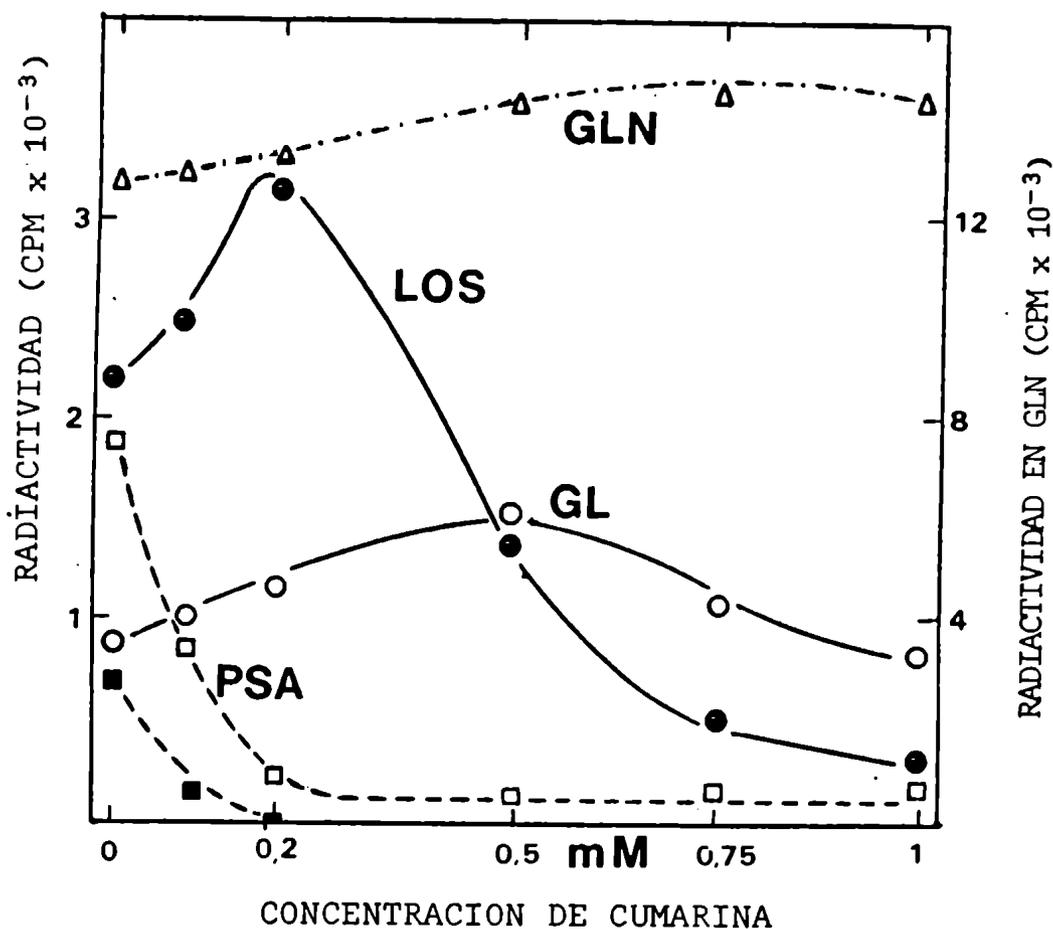


El polímero insoluble en álcali caliente obtenido como se muestra en la tabla XXX, se sometió a electroforesis en buffer R y, después de reducción con NaBH₄, en buffer Q. Las iniciales de los azúcares patrones son las mismas que en la figura 72.

6. Efecto de la cumarina

La cumarina es un compuesto que inhibe específicamente la síntesis de celulosa (Hara y col., 1973; Satoh y col., 1976; Burgess y Linstead, 1977). Con el objeto de estudiar su sitio de acción se incluyó cumarina a distintas concentraciones en el medio de incubación habitual. La figura 80 esquematiza su efecto en las distintas fracciones. Resulta evidente que tiene una acción inhibitoria en la síntesis del PSA y del polímero insoluble que se forma normalmente en estas condiciones. Su efecto en las otras fracciones no es tan drástico. Produce un aumento en la concentración de lípido-oligosacáridos, paso metabólico anterior a la formación de PSA, a una concentración de 0,2 mM, pero resulta inhibitor a concentraciones mayores de 0,5 mM. Los cambios en la formación de Dol-P-Glc y Dol-PP-Glc no son muy importantes.

FIGURA 80. Efecto de la cumarina.



Las incubaciones se hicieron en la forma habitual excepto por el agregado de concentraciones crecientes de cumarina. La extracción se realizó con cloroformo-metanol. Productos solubles en cloroformo-metanol (2:1, v/v): ácido resistentes (glucolípidos neutros) GLN: Δ --- Δ , y ácido lábiles (glucolípidos polares) GL: o—o. Productos solubles en cloroformo-metanol-agua (10:10:3, v/v) (lípidoligosacáridos) LOS: ●—●; PSA: □---□ y polímero insoluble: ■---■. Proteínas: 650 μ g/tubo.

A fin de confirmar el sitio específico de acción se realizaron experimentos en el tiempo. La figura 81A representa el control sin cumarina. En la figura 81B se observa que la acción inhibitoria en la formación de PSA es inmediata, no resultando afectados los glucolípidos. Finalmente, al agregar GDP-Glc, además de cumarina, se ob-

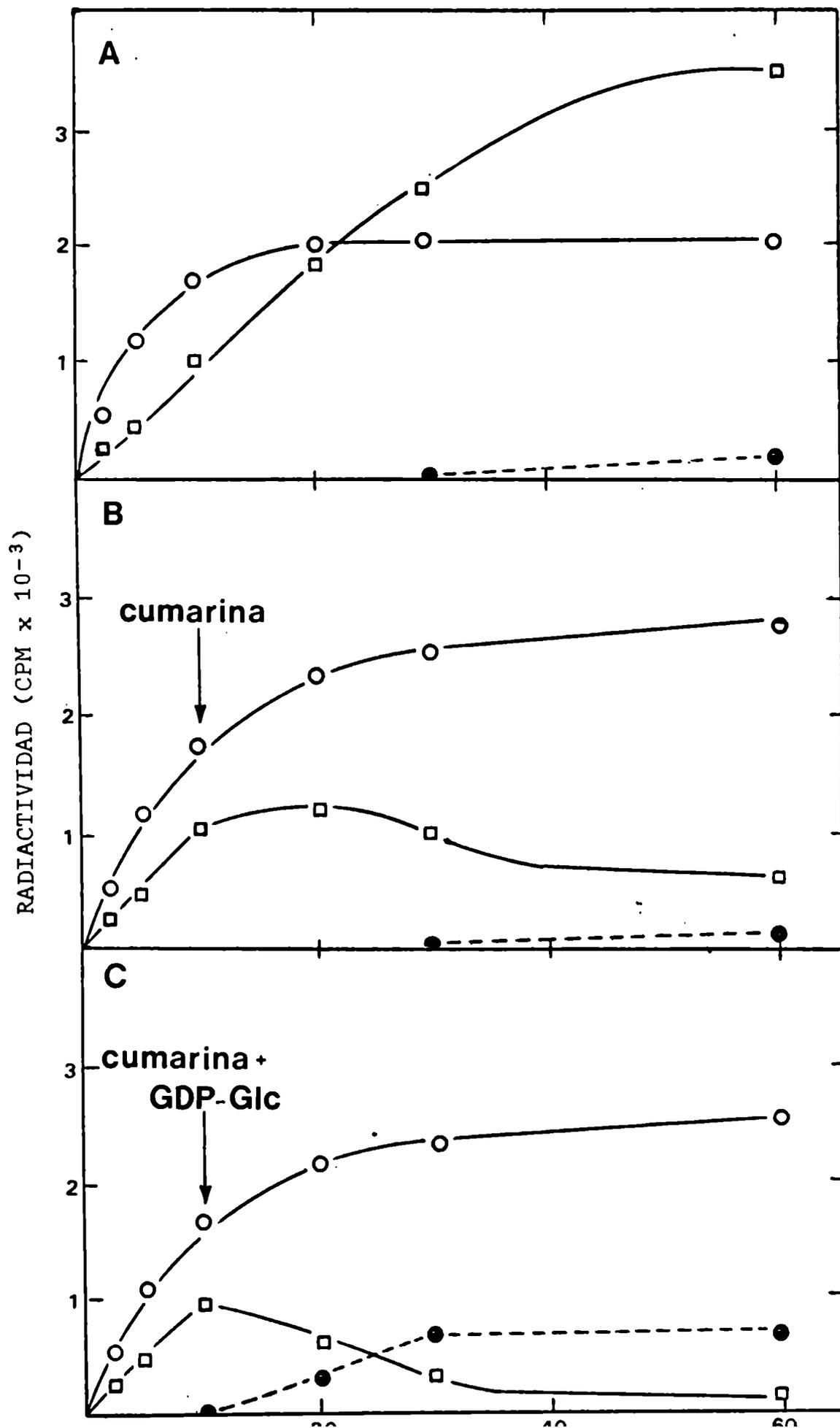
serva (fig. 81C) que la GDP-Glc:glucan sintetasa no resulta afectada por el tratamiento.

Se investigó también el efecto que tiene la cumarina en el crecimiento de P. zopfii. Se cultivaron células en la forma habitual excepto por el agregado de concentraciones crecientes de cumarina al medio nutritivo. Una concentración de 100 mg/l fue suficiente para inhibir el crecimiento del alga. Es posible que su efecto en la reproducción sea análogo al de la penicilina en bacterias, aunque su sitio de acción difiera del de ésta última.

FIGURA 81. Sitio de acción de la cumarina.

Las incubaciones se realizaron como en la figura 79, La cumarina se agregó en una concentración de 0,2 mM y la GDP-Glc de 0,1 mM. Proteínas: 650 µg/tubo.

FIGURA 81. Sitio de acción de la cumarina.



D I S C U S I O N

GLUCOLIPIDOS NEUTROS

Fracciones enzimáticas, preparadas por centrifugación diferencial, catalizaron la transferencia de glucosa de UDP-(¹⁴C)Glc a lípidos. Una gran parte (aproximadamente 80%) se transfirió a glucolípidos neutros. Estos glucolípidos neutros liberan glucosa como único producto al ser hidrolizados con ácido fuerte y tienen el comportamiento cromatográfico de los esteril glucósidos al ser sometidos a cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Por otra parte, su comportamiento en CCD y su reacción al test de Liebermann-Burchard indican que son una mezcla de EG y AEG. Los segundos al ser saponificados, se transforman rápidamente en los primeros.

La existencia de EG se conoce desde bastante tiempo atrás (Power y Sallaway, 1913), y hace poco más de 13 años se descubrieron sus derivados acilados (Lèpage, 1964). Desde entonces los EG, tanto en su forma libre como acilada, fueron encontrados en una gran variedad de plantas superiores y, probablemente, estén presentes en todas ellas (Grünwald, 1975).

Respecto a las algas, no abundan los trabajos en el tema. Existen tan solo una referencia (Heilbron y col., 1935) en la que se presume su existencia en Oedogonium basado en el punto de fusión de la sustancia purificada. Droop (1974) postula que la presencia de EG es una característica que distingue las plantas superiores de las algas. El presente trabajo demuestra que, al menos para la Chlorophyta P. zopfii, esta suposición no es válida y constituye la primera comprobación de la síntesis de estos compuestos en algas.

La identidad del grupo esterilo fue estudiada por cromatografía de gases. Por lo menos tres picos, con características que hacen pensar en esteroides, se evidenciaron de este modo. El primero tiene un tiempo de retención similar al del colesterol y el tercero al del estigmasterol o del 3 β -colestanol. El segundo, en cambio, no coincide con ninguno de los patrones utilizados, y probablemente corresponda al ergosterol, descrito por Lloyd (1966) como el esteroide libre más abundante en este organismo. Lo que parece claro es que β -sitosterol, el esteroide más común en plantas superiores, no está presente en este sistema.

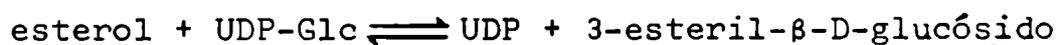
La posición del grupo acilo fue investigada por oxidación con periodato del AEG purificado. Los resultados indican que la posición 6 de la glucosa es el más probable sitio de acilación, aunque la posición 2 no puede ser del todo descartada. Este dato concuerda con los resultados obtenidos en la mayoría de las plantas superiores y hongos (Grünwald, 1975; McMorris y White, 1977).

La composición química del grupo acilo fue estudiada en hongos y plantas superiores e indican que los grupos más frecuentes son el oleato y el palmitato, aunque los mismos varían en gran medida según el desarrollo y condiciones ambientales en que se mantiene al organismo (Galliard, 1968; Lèpage, 1964; Kiribuchi y col., 1966; Bush y Grünwald, 1972; Singh y Privett, 1970; Nordby y Nagy, 1971). Tratamientos enzimáticos con α y β -glucosidasas, así como la formación de 1,6-anhidroglucosano en condiciones alcalinas indican que la unión esteroide-glucosa es de tipo β , lo cual concuerda con lo hallado en plantas superiores (Grünwald, 1975).

La biosíntesis de EG fue primeramente demostrada con fracciones enzimáticas particuladas de soja (Hou y col., 1967) y confirmada con preparaciones de Phaseolus aureus, arveja, coliflor, espinaca, trigo, tabaco y algodón (Kauss, 1968; Péaud-Lenoël y Axelos, 1971; Bush y Grünwald, 1974; Forsee y col., 1974; Pont Lezica y col., 1976). La UDP-Glc:esteroide glucosiltransferasa, enzima responsable de la síntesis de EG, es una enzima de membrana, y como tal requiere un medio hidrofóbico para su actividad. Por sus características

no es fácil purificar enzimas de membrana, pero pareció de interés encarar el aislamiento y purificación parcial de la misma. Se obtuvo un aumento de 34 veces la actividad específica respecto al extracto crudo de membranas. La transferencia se mostró totalmente dependiente del agregado de esteroides, como es de esperar para una enzima parcialmente purificada. La actividad enzimática no mostró requerimiento de cationes, lo cual concuerda con la glucosiltransferasa de algodón (Forsee y col., 1974), tuvo un pH óptimo de 6,0, como la enzima de Phaseolus aureus (Bowles y col., 1977) y fue linealmente dependiente de la concentración de proteínas y de UDP-Glc hasta 2×10^{-5} M, tal como la glucosiltransferasa de Pisum sativum (Pont Lezica y col., 1976) y fue estimulada por agregado de Triton X-100 al sistema.

Al estudiar la especificidad de sustrato se notó una alta afinidad hacia UDP-Glc, lo cual también se encontró en plantas superiores (Eichemberg y Grob, 1968; Forsee y col., 1974; Pont Lezica y col., 1976). En cambio, la afinidad por el esteroide no fue tan neta, pudiendo servir como sustrato todos los esteroides ensayados. Sin embargo, en bases equimoleculares, el extracto de esteroides endógenos fue el más eficaz. Esta característica fue encontrada también en fibras de algodón (Forsee y col., 1974). La reacción fue altamente inhibida por UDP y muy poco afectada por UMP. Los resultados indican que se produce la siguiente reacción:



La biosíntesis de los AEG ha sido tema de debate en los últimos años, proponiéndose dos vías metabólicas para su formación. La primera postula la siguiente secuencia de reacciones: esteroide libre \rightarrow EG \rightarrow AEG (Kauss, 1968; Forsee y col., 1974; Péaud-Lenoël y Axelos, 1972; Eichemberger y Newman, 1968; Eichemberger y Grob, 1970). La segunda propone la formación de AEG a través de un componente esteroideo no identificado, o de un acilglucósido intermediario (Bush y Grünwald, 1974; Frasch y Grünwald, 1976).

La mayoría de los experimentos "in vitro" apoyan la primera de las teorías, en cambio la segunda está basada en experimentos "in vivo"; se inyectó (^{14}C)colesteril glucósido sintético en Nicotiana tabacum recuperándose solo parte de la radiactividad como AEG, mientras que más del doble de esa marca apareció como esterol libre (Bush y Grünwald, 1974). Sin embargo, las dos propuestas no son excluyentes y bien pueden coexistir ambas vías metabólicas de formación de AEG. Nuestros experimentos, basados en la formación de EG y AEG en el tiempo, apoyan la teoría de una acilación de los EG que da lugar a los AEG, por lo menos en el caso de las algas, no encontrándose, además, evidencias de la presencia de glucosas aciladas.

Poco se sabe del dador de acilos. Axelos y Péaud-Lenoël (1971) propusieron a la fosfatidil etanolamina como candidata para esta función. Por otro lado, Forsee y col. (1974) notaron que extractos crudos de lecitina estimulaban la actividad glucosilante. En nuestros experimentos notamos que la lecitina cruda de soja tenía un efecto similar al observado por Forsee y col. (1974). Al aislar los componentes del extracto se observó que la única fracción activa fue la correspondiente a la fosfatidil etanolamina, lo cual confirma lo supuesto por Péaud-Lenoël (1971). Al estudiar el sitio de activación se notó que es específico de la formación de AEG a partir de EG. Como conclusión puede postularse la siguiente reacción:



La distribución subcelular de las glucosiltransferasas ha sido un tema también muy estudiado en plantas superiores. Ongun y Mudd (1970) comunicaron que el sitio de síntesis de EG es en los cloroplastos y mitocondrias. Axelos y Péaud-Lenoël (1971) mediante gradientes de sacarosa localizan esta actividad en los microsomas del retículo endoplásmico. Finalmente, Lercher y Wojciechowski (1976) y Bowles y col. (1977) encuentran que el sitio específico se localiza en el aparato de Golgi. Nuestros resultados mediante un método de fraccionamiento diferente, concuerdan con los de Lercher y Woj-

ciechowski (1976) y Bowles y col. (1977) indicando al aparato de Golgi como sitio específico de síntesis de esteril glucósidos en algas.

GLUCOLIPIDOS POLARES

Preparaciones particuladas de alga incorporaron radiactividad de UDP-(^{14}C)Glc a lípidos polares. Los glucolípidos polares son extremadamente lábiles a condiciones ácidas, liberando fundamentalmente glucosa. Esta labilidad es característica de los poliprenil fosfato azúcares. La estimulación en la formación de glucolípidos por adición de poliprenil fosfatos exógenos, tales como Fic-P o Dol-P apoyan esta hipótesis. El agregado de Fic-P o Dol-P a la mezcla de incubación no afectó la incorporación a glucolípidos neutros, indicando que no existe relación entre la síntesis de esteril glucósidos y de glucolípidos acídicos.

Los lípidos que actúan como aceptores de glucosa fueron aislados y fraccionados por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. El patrón de elución coincidente tanto con Dol-P usado como testigo, como con los perfiles observados con lípidos de otros sistemas (Pont Lezica y col., 1975), así como sus propiedades acídicas, sugieren la presencia de un poliprenil fosfato. La estabilidad del aceptor a condiciones de saponificación descarta la posibilidad de ésteres de ácidos grasos.

El lípido glucosilado tiene un perfil de elución en columna de DEAE-celulosa (0,125 M acetato de amonio) que está de acuerdo con los resultados de poliprenil fosfato azúcares en otros sistemas (García y col., 1974; Pont Lezica y col., 1975; 1976). Las propiedades cromatográficas del lípido glucosilado fueron similares a las del Dol-P-Glc en tres sistemas cromatográficos distintos. El lípido aceptor resultó estable a tratamiento ácido suave, tal como el Dol-P, mientras que en contraste el Fic-P perdió su capacidad aceptor. Esto sugiere la ausencia de un enlace alílico. Mayor evi-

dencia apoyando la saturación de la unidad isoprénica α fue proporcionada por la estabilidad de los aceptores glucosilados a hidrólisis con fenol e hidrogenación catalítica.

En ambos casos el Fic-P-Glc, como otros poliprenil fosfatos alílicos glucosilados (Wright, 1971) fue hidrolizado, mientras que tanto Dol-P-Glc como el aceptor endógeno glucosilado fueron estables. Todas estas evidencias sugieren que el aceptor de alga es un poliprenil fosfato α -saturado, tal como el Dol-P. La similitud cromatográfica del aceptor glucosilado y el Dol-P-Glc en dos sistemas, así como el patrón cromatográfico del alcohol libre en CCD en fase invertida (coincidente con el del Dol) sugieren que el largo de cadena del aceptor es similar al del dolicol de hígado.

BIOSINTESIS DEL LIPIDO

Las preparaciones de algas fueron capaces de sintetizar diferentes prenoles a partir de un precursor específico, el MVA: a) prenoles de cadena corta, liberados como alcoholes libres por acción de fosfatasa endógenas; b) poliprenil fosfatos de largos variables con características alílicas, y c) poliprenil fosfatos resistentes a hidrólisis ácida (α -saturados) que pudieron ser parcialmente hidrolizados con fosfatasa alcalina. Se sabe que los poliprenil fosfatos de cadena larga son muy malos sustratos para la fosfatasa alcalina (Kurokawa y col., 1971). Sin embargo, los alcoholes liberados por este tratamiento mostraron un comportamiento cromatográfico similar al Dol.

El perfil de elución en columna de Sephadex LH-20 muestra coincidencia con el patrón de Dol-P. A su vez cocromatografía con el aceptor endógeno y Dol-P en columna de DEAE-celulosa. La hidrólisis enzimática del lípido purificado con fosfatasa alcalina, confirmó la presencia de un fosfato y liberó los alcoholes libres. La CCD en fase invertida de estos alcoholes indicó la existencia de una

mezcla de compuestos con largos de cadena variables entre C₉₀ y C₁₀₅, siendo los más abundantes los de C₉₅ y C₁₀₀. Tratamientos alcalinos fuertes del lípido biosintético confirmaron estos resultados.

La capacidad aceptora del lípido biosintético fue confirmada incubando el poliprenil fosfato con UDP-Glc no radiactiva. El lípido radiactivo glucosilado resultante presentó las mismas propiedades cromatográficas que el Dol-P-Glc de hígado y el aceptor endógeno glucosilado. Estos resultados confirmaron la naturaleza poliprenílica del aceptor endógeno y su similitud con el dolicol de hígado tanto en largo de cadena como en la α -saturación. Lo que no se sabe actualmente es si el número y posición de los doble enlaces cis y trans es coincidente.

Esté trabajo constituye la primera comunicación, no solo de la presencia de dolicol en algas, sino también de la formación de sus derivados glucosilados en este sistema, tal como se demostró para levaduras, plantas superiores, insectos y mamíferos (Hemming, 1974; Pont Lezica y col., 1975; Quesada Allué y col., 1975; Daleo y Pont Lezica, 1977). Estos resultados sugieren también que la presencia de poliprenil fosfatos α -saturados, tal como el dolicol es una regla general en los organismos eucarióticos, dado que así fueron hallados en levaduras (Dunphy y col., 1967; Jung y Tanner, 1973), mamíferos (Evans y Hemming, 1973; Martin y Thorne, 1974), insectos (Quesada Allué y col., 1975) y plantas superiores (Pont Lezica y col., 1975; Daleo y Pont Lezica, 1977; Delmer y col., 1977). En contraste, los aceptores de azúcares característicos de los organismos procarióticos son de tipo alílico, como el undecaprenol (Higashi y col., 1967; Wright y col., 1967; Lahav y col., 1969; Troy y col., 1971; Takayama y Goldman, 1970). Desde el punto de vista evolutivo, el hecho de que las algas verdes, consideradas taxonómicamente entre los organismos eucarióticos más primitivos, tengan dolicol fosfato como lípido aceptor, es de considerable interés. Es probable que el cambio en los transportadores lipídicos se remonte al momento en que los eucariotas se diferenciaron de los procariotas.

Localización subcelular

Al estudiar el sitio de síntesis del dolicol fosfato en las fracciones subcelulares de alga se observó que se realiza principalmente en mitocondrias y aparato de Golgi. Este dato fue confirmado en células de hígado donde se determinó que en las mitocondrias, la membrana externa es la responsable de la síntesis (Daleo y col., 1977).

El descubrimiento de que la síntesis de Dol-P se produce en las mitocondrias es de considerable interés, dado que otro poliprenol es sintetizado en estas organelas: la cadena lateral de la ubiquinona (Momose y Rudney, 1972). Este poliprenol tiene todos sus doble enlaces en trans y las enzimas que intervienen en su síntesis a partir de IPP están localizadas en la membrana interna de la mitocondria; a diferencia del dolicol que tiene ambas configuraciones (cis y trans) y se sintetiza en la membrana externa. Esta distribución está de acuerdo con la hipótesis de que las mitocondrias en eucariotas tienen como origen una incorporación simbiótica de un procarionta, ya que los mismos tienen la facultad de sintetizar ubiquinona en sus membranas. Por otro lado, el hecho de que el Dol-P sea sintetizado en la membrana externa de la mitocondria, cuyas enzimas son codificadas por el genoma nuclear, está de acuerdo con la distribución de los poliprenil fosfatos responsables de la síntesis de glicanos: undecaprenol fosfato en procariontas y dolicol fosfato en eucariotas.

PROPIEDADES DE LA GLUCOSILTRANSFERASA

El fraccionamiento subcelular de P. zopfii demostró que la fracción microsomal (retículo endoplásmico) tiene la mayor actividad glucosilante de poliprenol fosfatos. Esto contrasta con la localización del sitio de síntesis de los aceptores (mitocondrias y aparato de Golgi), y el transporte de los lípidos desde su sitio

de síntesis hasta el sitio en que son funcionalmente activos como intermediarios, es un problema aun por resolver. En sistemas distintos, como el caso de los mamíferos, las UDP-Glc:poliprenil fosfato glucosiltransferasas están también presentes en microsomas lisos y rugosos (Dallner y col., 1972).

Los requerimientos catiónicos, particularmente el de Mg^{++} , están de acuerdo con lo publicado para bacterias y mamíferos (Hemmin 1974). El pH óptimo fue de 7,5 tal como el de arveja (Pont Lezica y col., 1976) y fibras de algodón (Forsee y Elbein, 1973). La enzima es altamente específica hacia el nucleótido azúcar y solo la UDP-Glc tiene capacidad de funcionar como sustrato para la enzima; pero parece inespecífica para el largo de cadena o la α -saturación del poliprenil fosfato, aunque demuestra una afinidad mayor para con los α -saturados de cadena larga como el Dol-P. La falta de especificidad hacia el tipo de poliprenil fosfato se observa también en otros sistemas, como la manosiltransferasa de Phaseolus aureus, donde tanto el betulaprenol fosfato como el Dol-P causan un aumento significativo de la transferencia de manosa a lípidos (Alam y Hemming, 1973), la enzima de hígado de rata (Parodi y col. 1972b) y la glucosiltransferasa de arveja (Pont Lezica y col., 1976). La afinidad diferencial de la enzima hacia Dol-P o Fic-P confirma la naturaleza del poliprenil fosfato endógeno. En los microsomas de hígado de rata, los poliprenil fosfatos parcialmente hidrogenados también fueron mejores sustratos que los insaturados (Mankowski y col., 1975). Esto indica que aunque la glucosiltransferasa es capaz de catalizar la transferencia de glucosa a un poliprenil fosfato alílico, el sustrato natural (dolicol fosfato) resulta un mejor aceptor.

IDENTIDAD DE LOS GLUCOLIPIDOS

La cromatografía en columna de DEAE-celulosa de extractos butanólicos de incubaciones a 20°C demuestra la heterogeneidad molecular presente en los mismos. El glucolípido I tiene propiedades

cromatográficas que están de acuerdo con las del Dol-P-Glc, y la formación de 1,6-anhidroglucosano en condiciones alcalinas indica que la glucosa se encuentra unida en una configuración β . Esto indica que la estereoquímica de la glucosiltransferasa de P. zopfii es similar a la de hígado de rata (Behrens y Leloir, 1970), a la de enzimas bacterianas (Nikaido y Nikaido, 1971; Wright, 1971), a la de la manosiltransferasa de pancreas de ternero (Herscovics y col., 1975), a la de la galactosiltransferasa de Acetobacter xylinum (García y col., 1974) y a la de la glucosiltransferasa de arvejas (Pont Lezica y col., 1976). Los glucolípidos II y III forman ésteres cíclicos de fosfato en condiciones alcalinas; lo cual, junto con el perfil de elución en columna de DEAE-celulosa, indica que se trata de derivados pirofosfóricos. La liberación de glucosa y de celotriosa (caracterizada por tratamiento enzimático, oxidación con periodato y comportamiento cromatográfico en tres sistemas) respectivamente en condiciones de acidez suave y la inhibición parcial de la glucosilación producida por UMP a 20°C, apoyan la caracterización de estos compuestos como lípido-PP-Glc y lípido-PP-celotriosa.

La naturaleza poliprenílica del lípido fue demostrada en otros sistemas. La N-acetilglucosamina fue descrita unida a dolicol vía un puente pirofosfato (Lucas y Waechter, 1976) en varios sistemas. La adición de una nueva molécula de N-acetilglucosamina lleva a la formación de dolicol pirofosfato quitobiosa. Existen evidencias de que este glicolípido sirve como precursor en la formación de un lípido oligosacárido conteniendo N-acetilglucosamina y manosa, siendo luego el oligosacárido transferido a un aceptor proteico como en el caso de la ovoalbúmina (Hemming, 1974; Lennarz, 1975; Lucas y Waechter, 1976; Waechter y Lennarz, 1976; Struck y Lennarz, 1977). La formación de poliprenil pirofosfato glucosa parece ser el primer escalón en la síntesis de un lípido oligosacárido, siendo el lípido-PP-celotriosa un intermediario del proceso.

La confirmación de la naturaleza dolicolica del lípido se obtuvo por incubación de (^3H)Dol-P y UDP-Glc no radiactivo con membranas de alga a 0°C. En estas condiciones se formó (^3H)Dol-PP-Glc.

Al utilizar un sistema distinto de extracción (Behrens y col., 1971) se hizo evidente la presencia de lípido-oligosacáridos con un promedio de 6 glucosas y un largo aproximado de 10 hexosas. Las glucosas se hallan unidas en configuración β (1 \rightarrow 4) por los resultados que se desprenden de los tratamientos enzimáticos y oxidación con periodato. La presencia de un puente pirofosfato se hizo evidente por su comportamiento en cromatografía en columna de DEAE-celulosa y su hidrólisis (probablemente formando un compuesto cíclico de fosfato) en condiciones alcalinas. Un lípido oligosacárido de naturaleza similar fue descrito en Pisum sativum (Brett y Northcote, 1975), si bien no fue exhaustivamente caracterizado, ni determinada su función metabólica.

La inhibición a 20°C producida por UMP y UDP apoya la existencia de las reacciones 1, 2 y 3 de la figura 82. Al agregar UMP, la reacción 1 (formación de Dol-PP-Glc) fue inhibida, pero la reacción 3 (formación de Dol-P-Glc) no, resultando una inhibición del 50% en la formación de lípidos. El agregado de UDP probablemente inhiba la reacción 3 (aunque también la reacción 2 que lleva a la formación de Dol-PP-(Glc)₃). Esto haría pensar en una muy alta inhibición de la glucosilación, pero no en una inhibición total. El alto grado en que la transferencia es afectada (95%) es debida, probablemente a la presencia de UMP por hidrólisis de UDP mediante fosfodiesterasas endógenas presentes en las preparaciones. La baja temperatura no inhibe la reacción 1, pero sí a las reacciones 2 y 3 y la polimerización (reacción 4). Este resultado está de acuerdo con lo observado en Acetobacter xylinum (Dankert y col., 1972) y Pisum sativum (Romero y Pont Lezica, 1977). Este efecto de la temperatura permitió la realización de incubaciones en dos pasos (primero 0°C y luego a 25°C). Las membranas lavadas retuvieron al Dol-PP-Glc (tabla XXVIII) que pudo servir como precursor en la segunda incubación al Dol-PP-(Glc)₃, lípido-oligosacárido y PSA. Los resultados que se muestran en la misma tabla indican que la UDP-Glc es la dadora de glucosas para la formación del lípido trisacárido (reacción 2) y que el Dol-P-Glc contribuye como dador glucosídico

en la formación del lípido-oligosacárido y PSA. Resulta clara, además, la no participación de los glucolípidos neutros en todo este proceso.

GLUCOSILACION DE PROTEINAS

Las membranas de P. zopfii al ser incubadas con UDP-Glc, o Dol-P-Glc con UDP-Glc, mostraron transferencia de glucosa a un polímero soluble (PSA). Este PSA fue identificado como una glucoproteína conteniendo aproximadamente 10 glucosas unidas en configuración β (1 \rightarrow 4) en base a tratamientos enzimáticos, electroforesis en gel de poliacrilamida y oxidación con periodato. La existencia de glucoproteínas con estas características fue descrita en muchos organismos y sistemas, como en las inclusiones de Pleurochrysis sherffellii (Herth y col., 1972), Acetobacter xylinum (Kjosbakken y Colvin, 1975), Pisum sativum (Brett y Northcote, 1975), Phaseolus aureus (Sato y col., 1976). Estos compuestos fueron postulados como formas iniciales de celulosa (Sato y col., 1976) en plantas superiores.

Las evidencias de la participación de los glucolípidos descritos en la formación del PSA provienen de diversos experimentos. La inhibición de la formación de PSA por UMP (90%) es muy sugestiva. Se conoce que en sistemas bacterianos y animales un poliprenil pirofosfato oligosacárido generalmente transfiere el oligosacárido al aceptor final (Hemming, 1974; Waechter y Lennarz, 1975). Si UMP inhibe el primer paso (reacción 1 de la fig. 82) de la formación de lípido-oligosacárido, todas las reacciones siguientes deben ser inhibidas, incluyendo la formación de PSA. Por otro lado, la incorporación en el tiempo de (^{14}C)glucosa a glucolípidos y PSA, como así también la inhibición secuencial de la formación de glucolípidos y PSA por UMP, sugieren una relación glucolípidos/PSA. La estimulación de la formación de PSA por adición de poliprenil fosfatos exógenos es un nuevo apoyo para la intervención de compuestos

poliprenólicos en la formación de PSA. Finalmente, la transferencia de (^{14}C)glucosa de Dol-PP-(^{14}C)Glc, Dol-P-(^{14}C)Glc y otros glucolípidos al PSA permiten postular un esquema como el que se muestra en la figura 82. La similitud entre los productos formados por degradación de Smith de lípido-oligosacáridos y PSA también sugieren que el oligosacárido unido a lípido es transferido en bloque al PSA.

SINTESIS DE CELULOSA

Se ha postulado en forma repetida (Herth y col., 1972; Kjosbakke y Colvin, 1975; Brett y Northcote, 1975; Satoh y col., 1976) la intervención de glucolípidos y glucoproteínas como intermediarios en la síntesis de celulosa.

Los experimentos realizados en P. zopfii indican que cuando se agrega GDP-Glc y el precipitado de 20.000g a la mezcla de incubación, se observa la aparición de un polímero insoluble en álcali caliente. Este polímero, al ser sometido a hidrólisis con celulasa, produjo celobiosa, demostrando su carácter celulósico. El PSA puede funcionar, en estas condiciones, como precursor de este polímero insoluble (reacción 5). El esquema que se presenta en la figura 82 concuerda con los datos conocidos, indicando que la GDP-Glc es la dadora específica de glucosilos para la celulosa sintetasa (Barber y col., 1964; Elbein y col., 1964) y que UDP-Glc, cuando está presente en bajas concentraciones (10^{-5} M) puede ser dadora en la síntesis de un $\beta(1\rightarrow4)$ glucano (Tsai y Hassid, 1974).

Los precursores de otros polisacáridos como el glucógeno (Krisman, 1972; Krisman y Barengo, 1975) y almidón (Lavintman y Cardini, 1970; Lavintman y col., 1974), también son glucoproteínas. Sin embargo, no parecen intervenir lípidos intermediarios en su síntesis, posiblemente por tratarse de polisacáridos intracelulares. En el caso de la celulosa, parece que el mecanismo es distinto, debido a que la glucoproteína celulósica debe ser secretada al exterior, junto a la pared celular, lo que haría necesaria la intervención de lípidos intermediarios.

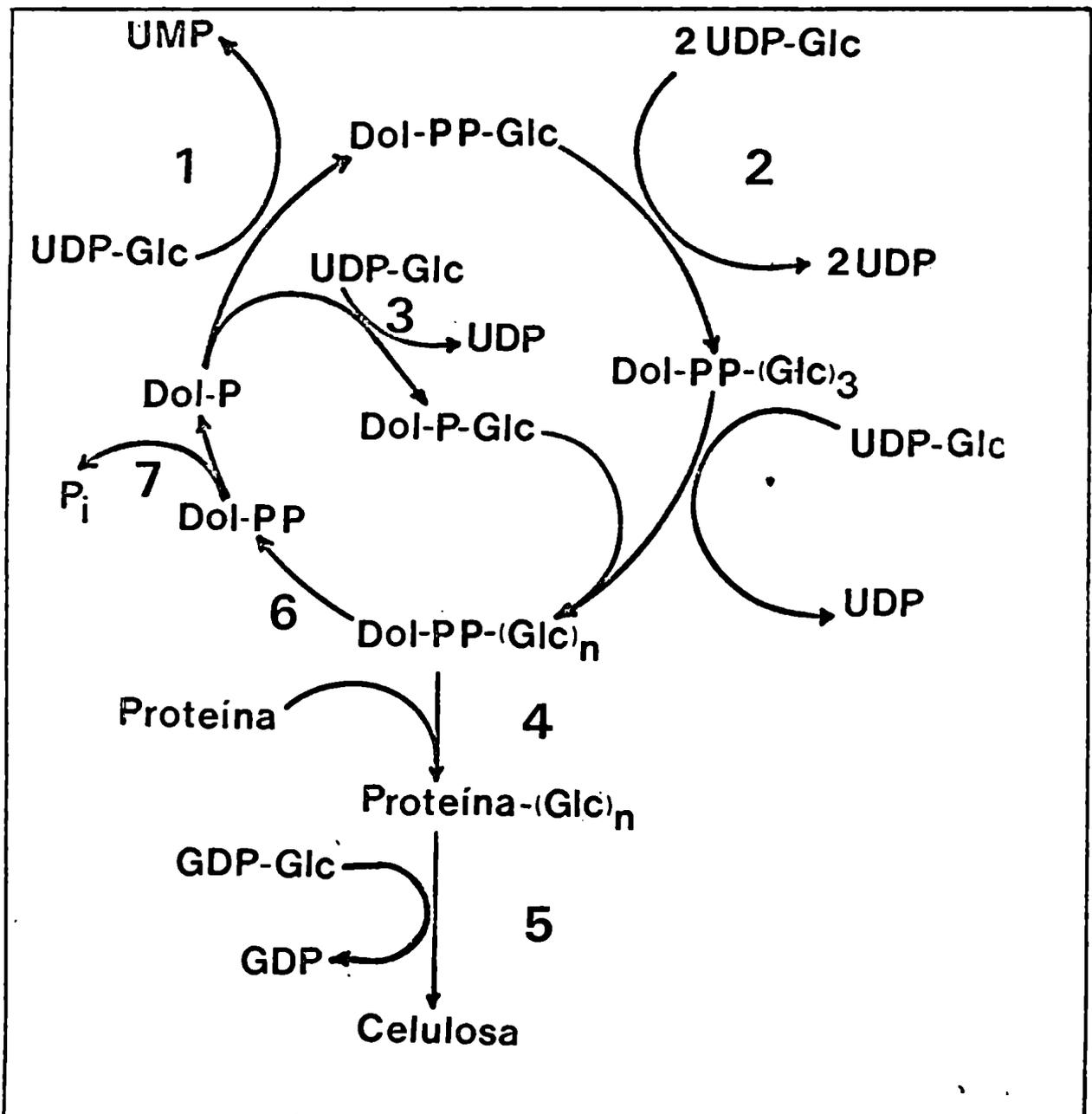


FIGURA 82. Esquema propuesto para la síntesis de glucoproteínas y celulosa en algas. Las reacciones 6 y 7 representan pasos que probablemente ocurren pero que no fueron detectados.

En ninguna de las teorías predominantes sobre el sitio de síntesis de celulosa (aparato de Golgi o membrana celular) se explica como el necesario nucleótido azúcar atraviesa la membrana para funcionar como dador de glucosilos. En este contexto, la intermediación de lípidos transportadores en la membrana permite la explicación de un aspecto que no se tiene en cuenta en las hipótesis. Este trabajo no constituye solamente la primera demostración de la participación de lípidos intermediarios en la síntesis de celulosa, sino también en la de homopolisacáridos.

Efecto de la cumarina

Desde tiempo atrás se conoce una serie de inhibidores del crecimiento vegetal entre los que se encuentran la cumarina y sus derivados (Nutile, 1945; Audus y Quastel, 1947; Audus, 1948; Goodwin y Taves, 1950; Pollok y col., 1954; Hara y col., 1975; Burgess y Linstead, 1977). Hara y col. (1975) demuestran que tiene una acción específica en la formación de celulosa, no siendo afectada la síntesis de otros polisacáridos de pared como las hemicelulosas o sustancias pécticas.

Sin embargo, la forma y el sitio específico en que la cumarina inhibe la síntesis de celulosa no están claros hasta el presente. Thimann y Bonner (1949), así como Svensson (1971) postulan un efecto reactivo con los grupos -SH por parte de la cumarina, lo cual afectaría las enzimas responsables de la síntesis. Sin embargo, el agregado de ácido p-cloromercuribenzoico, conocido por su acción en ese sentido, no mostró los efectos específicos que posee la cumarina (Hogetsu y col., 1974). Otro grupo de investigadores (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1961; Stenlid y Saddik, 1962; Dedonder y Van Sumere, 1971) proponen que la cumarina y sus derivados son desacoplantes de la fosforilación oxidativa teniendo, por lo tanto, un efecto indirecto en la síntesis de celulosa. Pero Hogetsu y col. (1974) demuestran que no es esta la acción de la cumarina, puesto que el 2,4-dinitrofenol (desacoplante de fosforilación oxidativa) tampoco

muestra los efectos que tiene la cumarina. Finalmente, un tercer grupo de investigadores (Hara y col., 1975; Hogetsu y col., 1974; Satoh y col., 1976) considera que la cumarina tiene un efecto específico en la cadena biosintética de la celulosa, pero no se aclara el punto metabólico en el que la inhibición tiene lugar. Todo esto llevó a investigar este punto en el sistema de P. zopfii.

Los experimentos "in vitro" indican que se produce un bloqueo del 97% en la reacción 4 (fig. 81) a una concentración de 0,2mM. Si bien a esa misma concentración la formación de lípido-oligosacáridos fue aparentemente estimulada, un aumento en la concentración de cumarina inhibe también a estos compuestos, aunque en menor medida que al PSA. Las demás reacciones no fueron mayormente afectadas. Un dato interesante es que la actividad de la celulosa sintetasa dependiente de GDP-Glc (GDP-Glc: β (1 \rightarrow 4)glucan sintetasa) no resulta afectada por la cumarina, lo cual también resultó cierto en sistemas libres de células en plantas superiores (Hopp y col., 1977c). Se demostró (Burguess y Linstead, 1977) que la cumarina inhibe específicamente la formación de microfibrillas en células cultivadas de Nicotiana tabacum. Dado que en plantas superiores está ampliamente documentada la síntesis de celulosa a partir de GDP-Glc, se concluye que es necesaria la formación de un precursor (del tipo PSA) que es inhibido por la cumarina y que sirve de sustrato junto a la GDP-Glc para el crecimiento de las microfibrillas celulósicas.

Los experimentos "in vivo" indican que una concentración de cumarina de 100 mg/l es suficiente para detener todo crecimiento del alga. En cambio, concentraciones iguales o menores que 75 mg/l no parecen tener efecto alguno en el desarrollo del crecimiento. Este efecto de tipo "todo o nada" fue observado también en otros sistemas (Svensson, 1971; Burgess y Linstead, 1977). Por microscopía óptica, no se pudo detectar en modo alguno la formación de protoplastos, de lo que se concluye que la división celular es inhibida. Es posible que la cumarina tenga un efecto análogo (aunque su sitio de acción difiera) al que tiene la penicilina en sistemas bacterianos.

CONCLUSIONES GENERALES

En bacterias, levaduras, animales y plantas superiores se han descrito poliprenoles que actúan como lípidos intermediarios en la síntesis de glicanos complejos. Se ha encontrado una clara diferencia entre los poliprenoles de procariotas (undecaprenol) y de eucariotas (dolicol). Se eligió un organismo (Prototheca zopfii) eucariota perteneciente a un taxón (Chlorophyta) considerado como relativamente primitivo entre los eucariotas, para estudiar el tipo de poliprenoles que tiene y los derivados glicosilados que forma.

Preparaciones crudas de membrana de P. zopfii catalizan la incorporación de glucosa de UDP-(^{14}C)Glc a glucolípidos ácido lábil. Las propiedades del lípido aceptor endógeno purificado concuerdan con las de un poliprenol α -saturado. La naturaleza isoprenica del aceptor fue confirmada por biosíntesis a partir de (^{14}C)-MVA, dando una serie de poliprenoles con largo de cadena variable entre C_{90} y C_{105} , como el dolicol.

A partir de UDP-Glc y dolicol fosfato endógeno se han sintetizado y purificado parcialmente varios glucolípidos. Las reacciones que dan origen a estos glucolípidos se esquematizan en la figura 82. Estos glucolípidos al ser incubados en distintas condiciones, son capaces de transferir su cadena de oligosacáridos a un polímero hidrosoluble. Este polímero es hidrolizado por pronasa, celulasas y β -glucosidasa. Sometido a degradación de Smith produce solamente eritritol y glicerol en una proporción de 8,2:1. Estos datos nos indican que estamos en presencia de una glicoproteína cuya porción glicosídica está formada por glucanos unidos en $\beta(1\rightarrow4)$.

Cuando se incubaba UDP-(^{14}C)Glc más GDP-Glc, el polímero hidrosoluble muestra una transferencia de radiactividad a un polímero insoluble en álcali caliente que se ha identificado como celulosa.

Se estudió el sitio de acción de la cumarina (inhibidor específico de la síntesis de celulosa) determinándose que produce un bloqueo de la transglucosilación de lípidos a proteínas, lo cual confirma que los mismos son intermediarios en la síntesis de celulosa.

Además, se ha demostrado por primera vez la biosíntesis de esteril glucósidos en algas a partir de UDP-(¹⁴C)Glc y fracciones enzimáticas de P. zopfii, detectándose las siguientes reacciones:



La UDP-Glc:esterol glucosiltransferasa fue parcialmente purificada con un aumento de 34 veces en la actividad específica y el sitio intracelular de síntesis identificado con las membranas del aparato de Golgi.



H.E. HOPP



ING. AGR. R. PONT LEICA

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Rafael Pont Lezica por su constante apoyo, sentido crítico y conocimientos brindados en todo momento desde mi ingreso a su laboratorio.

A Clara Fernández, Pedro Romero y Gustavo Daleo por su apoyo y estímulo durante la realización de este trabajo.

A todos los que integraron el Departamento de Biología de la Fundación Bariloche por su cooperación y críticas vertidas en numerosas discusiones.

A los Dres. Luis F. Leloir, Marcelo A. Dankert y Horacio G. Pontis por la lectura crítica de manuscritos que sirvieron como base para la elaboración de esta tesis.

A la Sra. Elişe Schad por su dedicación tanto en la redacción como en la transcripción de esta tesis.

A la Dra. Ana M. Brunengo y a la Lic. María E. Ranalli de Cinto cuyas recomendaciones me permitieron ingresar a este laboratorio, y por su importante aporte en mi formación universitaria.

Al Dr. Accorinti por guiar mi plan de materias en la carrera de doctorado.

A la Fundación Bariloche por haber financiado este trabajo y por su decidido apoyo en permitir su finalización en momentos de difícil situación financiera.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por su generosa contribución en productos químicos y materiales radiactivos y a la Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries por la financiación parcial de este trabajo.

RESUMEN

- Se demostró la presencia de lípidos intermediarios en el alga Prototheca zopfii. Estos lípidos tienen características similares al dolicol de hígado, tanto en largo de cadena como en saturación del extremo α .
- Se llevó a cabo su biosíntesis a partir de MVA y se ubicó subcelularmente este proceso en las mitocondrias y aparato de Golgi.
- Las preparaciones particuladas de alga catalizaron la incorporación de glucosa de UDP-(^{14}C)Glc a una serie de glucolípidos que fueron caracterizados como Dol-P- β -Glc, Dol-PP- α -Glc, Dol-PP-celotriosa y Dol-PP- β (1+4)oligoglucanos. Los oligoglucanos unidos a lípido son una serie que va desde un disacárido hasta aproximadamente, un decaacárido.
- Los glucolípidos descritos tienen características de intermediarios en la síntesis de un polímero caracterizado como una glucoproteína "celulósica". Se observó que la cumarina inhibe específicamente la transferencia de oligosacáridos de los lípidos a la proteína aceptora.
- Cuando se agregó GDP-Glc al sistema, el polímero marcado se tornó insoluble en álcali caliente con las propiedades que caracterizan a la celulosa. Se propone un esquema (fig. 82) con las reacciones que implican la síntesis de precursores de la celulosa.
- Fracciones de membrana de alga catalizaron, además, la transferencia de glucosa de UDP-Glc a aceptores esteroideos endógenos y su posterior esterificación con ácidos grasos a partir de un dador endógeno de acilos en la siguiente forma:



- La glucosiltransferasa fue solubilizada con detergente y purificada 34 veces obteniendo una enzima que depende del agregado de esteroides exógenos para su actividad. Su ubicación intracelular es, fundamentalmente, en el aparato de Golgi.

- Esta es la primera comunicación, no sólo de la presencia de poliprenil fosfatos y de su sitio subcelular de síntesis, sino también de la formación de sus derivados glucosilados en algas. Este trabajo es, además, la primera demostración fehaciente de la participación de lípidos intermediarios en la síntesis de celulosa.

Finalmente, las evidencias presentadas indican que los esteril glucósidos y sus derivados acilados son sintetizados en algas.

BIBLIOGRAFIA

- ABDUL-BAKI, A.A. y P.M. RAY, 1971. Regulation by auxin of carbohydrate metabolism involved in cell wall synthesis by pea stem tissue. *Plant Physiol.* 47: 437-444.
- ALAM, S.S., R.M. BARR, J.B. RICHARDS y F.W. HEMMING, 1971. Prenol phosphates and mannosyltransferases. *Biochem. J.* 121: 19P.
- ALAM, S.S. y F.W. HEMMING, 1971. Betulaprenol phosphate as an acceptor of mannose from GDP-mannose in *Phaseolus aureus* preparations. *FEBS Lett.* 19:60-62.
- ALAM, S.S. y F.W. HEMMING, 1973. Polyprenol phosphates and mannosyltransferases in *Phaseolus aureus*. *Phytochemistry* 12:1641-1649.
- ANDERSON, J.S., M.MATSUHASHI, M.A. HASKIN y J.L. STROMINGER, 1965. Lipid-phosphoacetylmuramyl-pentapeptide and lipid-phosphodisaccharide-pentapeptide: presumed membrane transport intermediates in cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:881-889.
- ANDERSON, J.S., P.M. MEADOW, M.A. HASKIN y J.L. STROMINGER, 1966. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. I. Utilization of uridine diphosphate acetylmuramyl pentapeptide and uridine diphosphate acetylglucosamine for peptidoglycan synthesis by particulate enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus lysodeikticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 116:487-515.
- ANDERSON, J.S., M. MATSUHASHI, M.A. HASKIN y J.L. STROMINGER, 1967. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. II. Phospholipid carriers in the reaction sequence. *J. Biol. Chem.* 242:3180-3190.
- ANDERSON, J.S. y J.L. STROMINGER, 1965. Isolation and utilization of phospholipid intermediates in cell wall glycopeptide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21:516-521.
- AUDUS, L.J., 1948. Studies on the phytostatic action of 2:4-dichlorophenoxyacetic acid and coumarin. The reversibility of rod growth inhibitors. *New Phytol.* 47:196-219.
- AUDUS, L.J. y J.H. QUASTEL, 1947. Coumarin as a selective phytocidal agent. *Nature* 159:320-324.
- AVERS, C.J. y R.H. GOODWIN, 1956. Studies on roots. IV. Effects of coumarin and scopoletin on the standard root growth pattern on *Phleum pratense*. *Am. J. Bot.* 43:612-620.
- BABCZINSKI, P. y W. TANNER, 1973. Involvement of dolicholmonophosphate in the formation of specific mannosyl-linkages in yeast glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54:1119-1124.

- BADDILEY, J., 1972. Isoprenoid intermediates in the biosynthesis of bacterial walls. En "Biochemistry of the Glycosidic Linkage" (R. Piras y H.G. Pontis, eds.) pp. 337-343. Academic Press, New York.
- BAENZIGER, J. y S. KORNFELD, 1974. Structure of the carbohydrate units of IgA₁ immunoglobulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. J. Biol. Chem. 249:7270-7281.
- BAKER, J.R.J. y L.V. EVANS, 1973. The shipfouling alga *Ectocarpus*. I. Ultrastructure and cytochemistry of plurilocular reproductive stages. *Protoplasma* 77:1-13.
- BARBER, G.A., A.D. ELBEIN y W.Z. HASSID, 1964. The synthesis of cellulose by enzyme systems from higher plants. J. Biol. Chem. 239:4056-4061.
- BARBER, G.A. y W.Z. HASSID, 1965. Synthesis of cellulose by enzyme preparations from the developing cotton boll. *Nature* 207:295-296.
- BAYNES, J.W., A.F. HSU y E.C. HEATH, 1973. The role of mannosyl-phosphoryl-dihydro-polyisoprenol in the synthesis of mammalian glycoproteins. J. Biol. Chem. 248:5693-5704.
- BEHRENS, N.H., 1974. Polyprenol sugars and glycoprotein synthesis. En "Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces" (E.Y.C. Lee y E.E. Smith, eds.) pp. 159-178. Academic Press, New York.
- BEHRENS, N.H., H. CARMINATTI, R.J. STANELONI, L.F. LELOIR y A.I. CANTARELLA, 1973. Formation of lipid-bound oligosaccharides containing mannose. Their role in glycoprotein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:3390-3394.
- BEHRENS, N.H. y L.F. LELOIR, 1970. Dolichol monophosphate glucose: an intermediate in glucose transfer in liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66:153-159.
- BEHRENS, N.H., A.J. PARODI, L.F. LELOIR y C.R. KRISMAN, 1971a. The role of dolichol monophosphate in sugar transfer. Arch. Biochem. Biophys. 143:375-383.
- BEHRENS, N.H., A.J. PARODI y L.F. LELOIR, 1971b. Glucose transfer from dolichol monophosphate glucose: The product formed with endogenous microsomal acceptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:2857-2860.
- BITTMAN, R. y L. BLAU, 1972. The phospholipid-cholesterol interaction. Kinetics of water permeability in liposomes. *Biochemistry* 11:4831-4839.
- BONNER, J., 1965. En "Plant Biochemistry" (J. Bonner y J.E. Varner, eds.), pp. 665-692. Academic Press, New York.
- BOWLES, D.J., L. LEHLE y H. KAUSS, 1977. Glucosylation of sterols and polyprenol-phosphate in the Golgi apparatus of *Phaseolus aureus*. *Planta* 134: 177-181.
- BRETT, C.T. y D.H. NORTHCOTE, 1975. The formation of oligoglucans linked to lipid during synthesis of β -glucan by characterized membrane fractions isolated from peas. *Biochem. J.* 148:107-117.

- BRETTAUER, R.K., S. Wu y W.E. Irwin, 1973. Enzymatic transfer of mannose from guanosine diphosphate mannose to dolichol phosphate in yeast (Hansenula holstii). A possible step in mannan synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 304:736-747.
- BROWN, R.M., W.W. FRANKE, H. KLEINIG, H. FALK y P. SITTE, 1970. Scale formation : chrysophycean algae. I. Cellulosic and non-cellulosic wall components made by the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 45:246-271.
- BRUMMOND, D.O. y A.P. GIBBONS, 1965. Enzymatic cellulose synthesis from UDP(¹⁴C)-glucose by Lupinus albus. *Biochem. Z.* 342:308-318.
- BUMSTED, R.M., J.L. DAHL, D. SOLL y J.L. STROMINGER (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* 243:779-782.
- BURGOS, J., F.W. HEMMING, J.F. PURNOCK y R.A. MORTON, 1963. Dolichol: a naturally occurring C₁₀₀ isoprenoid alcohol. *Biochem. J.* 88:470-482.
- BURGUESS, J. y P.J. LINSTED, 1977. Coumarin inhibition of microfibril formation at the surface of cultured protoplasts. *Planta* 133:267-273.
- BUSH, P.B. y C. GRUNWALD, 1972. Sterol changes during germination of Nicotiana tabacum seeds. *Plant Physiol.* 50:69-72.
- BUSH, P.B. y C. GRUNWALD, 1974. Steryl glycoside formation in seedlings of Nicotiana tabacum L. *Plant Physiol.* 53:131-135.
- BUSH, P.B., C. GRUNWALD y D.L. DAVIS, 1971. Changes in sterol composition during greening of etiolated barley shoots. *Plant Physiol.* 47:745-749.
- BUTTERWORTH, P.H.W. y F.W. HEMMING, 1968. Intracellular distribution of the free and esterified forms of dolichol in pig liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 128:503-50
- CAPUTTO, R., L.F. LELOIR, C.E. CARDINI y A. PALADINI, 1950. Isolation of the co-enzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem* 184:333-350.
- COLLINS, D.C., D.G. WILLIAMSON y D.S. LAYNE, 1970. Steroid glucosides enzymatic synthesis by a partially purified transferase from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 245:873-876.
- COOK, R.P., 1961. Reaction of steroids with acetic anhydride and sulphuric acid (the Liebermann-Burchard test). *Analyst* 86:373-381.
- COURTOIS, J.E. y F. PERCHERON, 1970. En "The Carbohydrates", 2° ed. (W. Pigman y D. Horton, eds.), Vol. IIA, p. 213. Academic Press, New York.
- CHAMBERLAIN, A.H.L. y L.V. EVANS, 1973. Aspects of spore production in the red alga Ceramium. *Protoplasma* 76:139-159.
- CHEN, W.W., W.J. LENNARZ, A.L. TARENTINO y F. MALEY, 1975. A lipid-linked oligosaccharide intermediate in glycoprotein synthesis in oviduct. Structural studies on the oligosaccharide chain. *J. Biol. Chem.* 250:7006-7013.

- CHIRVA, V.J., P.K. KINTJA y G.V. LAZUR'EVSKIJ, 1969. Triterpenovye glikozidy Saponaria officinalis. Khim. Prir. Soedin. SSR 5:59-60.
- DALEO, G.R., H.E. HOPP, P.A. ROMERO y R. PONT LEZICA, 1977. Biosynthesis of dolichol phosphate by subcellular fractions from liver. FEBS Lett. 81:411-414.
- DALEO, G.R. y R. PONT LEZICA, 1977. Synthesis of dolichol phosphate by a cell-free extract from pea. FEBS Lett. 74:247-250.
- DALLNER, G., N. BEHRENS, A.J. PARODI y L.F. LELOIR, 1972. Subcellular distribution of dolichol phosphate. FEBS Lett. 24:315-317.
- DANKERT, M., R. GARCIA y E. RECONDO, 1972. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of polysaccharides in Acetobacter xylinum. En "Biochemistry of the Glycosidic Linkage" (R. Piras y H.G. Pontis, eds.), pp. 199-206. Academic Press, New York.
- DANKERT, M., A. WRIGHT, W.S. KELLEY y P.W. ROBBINS, 1966. Isolation, purification and properties of the lipid-linked intermediates of O-antigen biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 116:425-435.
- DAVIS, B.D., R. DULBECCO, H.N. EISEN, H.S. GINSBERG y W.B. WOOD, 1967. En "Principles of Microbiology and Immunology" (J. Weatherhill, ed.), pp. 141-144. Harper & Row, New York.
- DAWSON, R.M.C., 1954. The measurement of ^{32}P labelling of individual kephalins and lecithin in a small sample of tissue. Biochim. Biophys. Acta 14:374-379.
- DEDONDER, A. y C.F. VAN SUMERE, 1971. The effect of phenolics and related compounds on the growth and the respiration of Chlorella vulgaris. Z. Pflanzenphysiol. 65:70-80.
- DELMER, D.P., M.C. ERICSON y C. KULOW, 1977. Structure of a mannelipid intermediate in plant glycoprotein synthesis. Plant Physiol. 59:5-67.
- DOYLE, P.J., G.W. PATTERSON, S.R. DUTKY y C.F. COHEN, 1971. 14α -methyl- 5α -ergost-8-en- 3β -ol and 14α -methyl- 5α -ergosta-8,24(28)-dien- 3β -ol from triparanol-treated Chlorella emersonii. Phytochemistry 10:2093-2098.
- DROOP, M.R., 1974. Heterotrophy of carbon. En "Algal Physiology and Biochemistry" (W.D.P. Stewart, ed.), pp. 86-123. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- DUNPHY, P.J., J.D. KERR, J.F. PENNOCK, K.J. WHITTLE y J. FEENEY, 1967. The plurality of long-chain isoprenoid alcohols (polyprenols) from natural sources. Biochim. Biophys. Acta 136:136-147.
- DURR, I.F. y M.Z. HABBAL, 1972. The biosynthesis of C_{55} polyprenols by a cell-free preparation of Lactobacillus plantarum. Biochem. J. 127:345-349.
- EICHEMBERGER, W. y E.C. GROB, 1969. Zur enzymatischen Bildung von Acyl-Steringlycosid in Pflanzen. Chimia 23:368-369.

- EICHEMBERGER, W. y E.C. GROB, 1970. Enzymatische Acylierung von Sterin- ^{14}C -Glucosid durch ein lösliches Enzym aus Karotten. *Chimia* 24:394-396.
- EICHEMBERGER, W. y D.W. NEWMAN, 1968. Hexose transfer from UDP-hexose in the formation of steryl glycoside and esterified steryl glycoside in leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32:366-374.
- ELBEIN, A.D., G.A. BARBER y W.Z. HASSID, 1964. The synthesis of cellulose by an enzyme system from a higher plant. *J. Amer. Chem. Soc.* 86:309-310.
- ELBEIN, A.D., G.A. BARBER y W.Z. HASSID, 1966. Cellulose synthetase from plants. En S.P. Colowick y N.O. Kaplan: "Methods in Enzymology" (E.F. Neufeld y V. Ginsburg, eds.), Vol. VIII:416-418. Academic Press, New York.
- ERICSON, M.C. y D.P. DELMER, 1977. Glycoprotein synthesis in plants. I. Role of lipid intermediates. *Plant Physiol.* 59:341-347.
- ESDERS, T.W. y R.J. LIGHT, 1972. Occurrence of a uridine diphosphate glucose:stero glucosyltransferase in Candida bogoriensis. *J. Biol. Chem.* 247:7494-7497.
- EVANS, L.V. y M.S. Holligan, 1972. Correlated light and electron microscope studie on brown algae. I. Localisation of alginic acid and sulphated polysaccharides in Dictyota. *New Phytol.* 71:1161-1172.
- EVANS, L.V., M. SIMPSON y M.E. CALLOW, 1973. Sulphated polysaccharide synthesis in brown algae. *Planta* 110:237-252.
- EVANS, P.J. y F.W. HEMMING, 1973. The unambiguous characterization of dolichol phosphate mannose as a product of mannosyl transferase in pig liver endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 31:335-338.
- FEINGOLD, D.S., E.F. NEUFELD y W.Z. HASSID, 1958. Synthesis of a β -1,3-linked glucan by extracts of Phaseolus aureus seedlings. *J. Biol. Chem.* 233:783-788.
- FLEISCHER, S. y KERVINA, M., 1974. Subcellular fractionation of rat liver. En "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.) Vol. XXXI, pp. 130-148. Academic Press, New York.
- FLOWERS, H.M., K.K. BATRA, J. KEMP y W.Z. HASSID, 1968. Biosynthesis of insoluble glucans from uridine-diphosphate-D-glucose with enzyme preparations from Phaseolus aureus and Lupinus albus. *Plant Physiol.* 43:1703-1709.
- FLOWERS, H.M., K.K. BATRA, J. KEMP y W.Z. HASSID, 1969. Biosynthesis of cellulose in vitro from guanosine diphosphate D-glucose with enzymic preparations from Phaseolus aureus and Lupinus albus. *J. Biol. Chem.* 244:4969-4974.
- FOLCH, J., M. LEES y G.H. SLOANE STANLEY, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- FORSEE, W.T. y A.D. ELBEIN, 1972. Biosynthesis of acidic glycolipids in cotton fibers. Possible intermediates in cell wall synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49:930-939.

- FORSEE, W.T. y A.D. ELBEIN, 1973. Biosynthesis of mannosyl- and glucosyl-phosphoryl-polyprenols in cotton fibers. *J. Biol. Chem.* 248:2858-2867.
- FORSEE, W.T. y A.D. ELBEIN, 1975. Glycoprotein biosynthesis in plants. Demonstration of lipid-linked oligosaccharides of mannose and N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 250:9283-9293.
- FORSEE, W.T., R.A. LAINE y A.D. ELBEIN, 1974. Solubilization of a particulate UDP-glucose:sterol β -glucosyltransferase in developing cotton fibers and seeds and characterization of steryl 6-acyl-D-glucosides. *Arch. Biochem. Biophys.* 161:248-259.
- FRANKE, W.W., 1970. Central dilations in maturing Golgi cisternae - a common feature among plant cells? *Planta* 90:370-373.
- FRASH, W. y C. GRUNWALD, 1976. Acylated steryl glycoside synthesis in seedlings of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* 58:744-748.
- FRANZ, G. y H. MEIER, 1969. Biosynthesis of cellulose in growing cotton hairs. *Phytochemistry* 8:579-583.
- FRIEDLER, F. y L. GLASSER, 1974a. The synthesis of polyribitol phosphate. I. Purification of polyribitol phosphate polymerase and lipoteichoic carrier. *J. Biol. Chem.* 249:2684-2689.
- FRIEDLER, F. y L. GLASSER, 1974b. The synthesis of polyribitol phosphate. II. On the mechanism of polyribitol phosphate polymerase. *J. Biol. Chem.* 249:2690-2695.
- GALLIARD, T., 1968. Aspects of lipid metabolism in higher plants. I. Identification and quantitative determination of the lipids in potato tubers. *Phytochemistry* 7:1907-1914.
- GARCIA, R.C., E. RECONDO y M.A. DANKERT, 1974. Polysaccharide biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. Enzymatic synthesis of lipid diphosphate and monophosphate sugars. *Eur. J. Biochem.* 43:93-105.
- GHALAMBOR, M.A. y R.W. JEANLOZ, 1974. Biosynthesis of P^1 -2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl- P^2 -dolichyl pyrophosphate. *Federation Proc.* 33:1368.
- GLASER, L. y D.H. BROWN, 1957. The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 228:729-742.
- GOLDMAN, R. y J.L. STROMINGER, 1972. Purification and properties of C_{55} -isoprenylpyrophosphate phosphatase from *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Biol. Chem.* 247:5116-5122.
- GOLDSTEIN, I.J., G.W. HAY, D.A. LEWIS y F. SMITH, 1965. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. En "Methods in Carbohydrate Chemistry" (R.L. Whistler, ed.) Vol. V, pp. 361-370. Academic Press, New York.
- GOODWIN, R.H. y C. TAVES, 1950. The effect of coumarin derivatives on the growth of *Avena* roots. *Amer. J. Bot.* 43:612-620.

- GREEN, J.C. y D.H. JENNINGS, 1967. A physical and chemical investigation of the scales produced by the Golgi apparatus within and found on the surface of the cells of Chrysochromulina chiton Parke et Manton. J. Exp. Bot. 18:359-370.
- GRUNWALD, C., 1971. Effects of free sterols, steryl ester and steryl glycoside on membrane permeability. Plant Physiol. 48:653-655.
- GRUNWALD, C., 1975. Plant sterols. Annu. Rev. Plant Physiol. 26:209-236.
- HARA, M., N. UMETSU, C. MIYAMOTO y K. TAMARI, 1973. Inhibition of the biosynthesis of plant cell wall materials, especially cellulose biosynthesis, by coumarin. Plant & Cell Physiol. 14:11-28.
- HASSID, W.Z., 1969. Biosynthesis of oligosaccharides and polysaccharides in plants. Mechanisms of enzymic synthesis of complex plant carbohydrates are reviewed. Science 165:137-144.
- HASSID, W.Z., 1972. Biosynthesis of polysaccharides from sugar nucleotides in plants. En "Biochemistry of the Glycosidic Linkage. An Integrated View" (R. Piras y H.G. Pontis, eds.), pp. 315-335. Academic Press, New York.
- HERTH, E.C., J.W. BAYNES y A.F. HSU, 1974. The role of mannosyl phosphoryl dehydro-polyisoprenol in the synthesis of mammalian glycoproteins. En "Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces" (E.V.C. Lee y E.E. Smith, eds.) pp. 181-211. Academic Press, New York.
- HEILBRON, I.M., E.G. PARRY y R.F. PHIPERS, 1935. CLXVII. The algae. II. The relationship between certain algal constituents. Biochem. 29:1376-1381.
- HEMMING, F.W., 1970. En "Natural Substances formed Biologically from Mevalonic Acid" (T.W. Goodwin, ed.). Academic Press, New York.
- HEMMING, F.W., 1974. Lipids in glycan biosynthesis. En "MTP International Review of Science, Biochemistry Series One" (T.W. Goodwin, ed.) Vol. 4, pp. 38-97. Butterworths, London y University Park Press, Baltimore.
- HEMMING, F.W., R.A. MORTON y G.F. PENNOCK, 1963. Constituents of the unsaponifiable lipid fraction from the spadix of Arum maculatum. Proc. Roy. Soc. London Ser. B 158:291-310.
- HERSCOVICS, A., C.D. WARREN y R.W. JEANLOZ, 1975. Anomeric configuration of the dolichyl-D-mannosyl phosphate formed in calf pancreas microsomes. J. Biol. Chem. 250:8079-8084.
- HERTH, W., W.W. FRANKE, J.S. STADLER, H. BITTIGER, G. KEILICH y R.M. BROWN, Jr., 1972. Further characterization of the alkali-stable material from the scales of Pleurochrysis scherffellii: a cellulosic protein. Planta 105:79-92.
- HIGASHI, Y., G. SIEWERT y J.L. STROMINGER, 1970. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIX. Isoprenoid alcohol phosphokinase. J. Biol. Chem. 245:3683-3690.

- HIGASHI, Y., J.L. STROMINGER y C.C. SWEELEY, 1967. Structure of a lipid intermediate in cell wall peptidoglycan synthesis: a derivative of a C₅₅ isoprenoid alcohol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:1878-1884.
- HITCHCOCK, C. y B.W. NICHOLS, 1971. The analysis of plant lipids. En "Plant Lipid Biochemistry", pp. 279-305. Academic Press, London.
- HOGETSU, T., H. SHIBAOKA y M. SHIMOKORIYAMA, 1974. Involvement of cellulose synthesis in actions of gibberellin and kinetin on cell expansion. Gibberellin-coumarin and kinetin-coumarin interactions on stem elongation. Plant & Cell Physiol. 15:265-272.
- HOPP, H.E., P.A. ROMERO, G.R. DALEO y R. PONT LEZICA, 1977a. Dolichol-linked sugars in algae. Plant Physiol. 59:S-67.
- HOPP, H.E., P.A. ROMERO, G.R. DALEO y R. PONT LEZICA, 1977b. Biosynthesis of dolichyl phosphate. Characterization and site of synthesis in algae. Plant Physiol. (en prensa).
- HOPP, H.E., P.A. ROMERO, G.R. DALEO y R. PONT LEZICA, 1977c. Efecto de la cumarina en la síntesis de celulosa y glicoproteínas. En preparación.
- HOU, C.T., Y. UNEMURA, M. NAKAMURA y S. FUNAHASHI, 1968. Enzymatic synthesis of steryl glucoside by a particulate preparation from immature soybean seeds. J. Biochem. 63:351-360.
- HSIA, J.C., R.A. LONG, F.E. HRUSKA y H.D. GESSER, 1972. Steroid-phosphatidylcholine interactions in oriented multibilayers. A spin label study. Biochim. Biophys. Acta 290:22-31.
- HSU, A.F., J.W. BAYNES y E.C. HEATH, 1974. The role of a dolichol-oligosaccharide as an intermediate in glycoprotein biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:2391-2395.
- HUSSEY, H. y J. BADDILEY, 1972. Lipid intermediates in the biosynthesis of the wall teichoic acid in Staphylococcus lactis I3. Biochem. J. 127:39-50.
- JAYME, G. y F. LANG, 1963. En "Methods in Carbohydrate Chemistry" (R.L. Whistler, ed.) Vol. III, pp. 75-83. Academic Press, New York.
- JUNG, P. y W. TANNER, 1973. Identification of the lipid intermediate in yeast mannan biosynthesis. Eur. J. Biochem. 37:1-6.
- KAUSS, H., 1968. Enzymatische Glucosylierung von pflanzlichen Sterinen. Z. Naturforsch. 23b:1522-1526.
- KAUSS, H., 1969. A plant mannosyl-lipid acting in reversible transfer of mannose. FEBS Lett. 5:81-84.
- KAWASKI, T., K. SUGAHARA, T. OKAMURA y I. YAMAMOTO, 1974. The presence of a β -mannosidic linkage in a glycopeptide from microsomal membranes of rat liver. J. Biochem. 75:437-439.

- KEENAN, R.W., J.B. FISCHER y M.E. KRUCZEK, 1977. The tissue and subcellular distribution of (³H)dolichol in the rat. Arch. Biochem. Biophys. 179:634-642.
- KEILEY, M.L., G.S. MCKNIGHT y R.T. SCHIMKE, 1976. Studies on the attachment of carbohydrate to ovalbumin nascent chains in hen oviduct. J. Biol. Chem. 251: 5490-5495.
- KENT, J.L. y M.J. OSBORN, 1968. Haptenic O-antigen as a polymeric intermediate of in vivo synthesis of lipopolysaccharide by Salmonella typhimurium. Biochemistry 7:4419-4422.
- KHAN, A.W. y J.R. COLVIN, 1961. Synthesis of bacterial cellulose from labelled precursor. Science 133:2014-2015.
- KIRIBUCHI, T., T. MIZUNAGA y S. FUNAHASHI, 1966. Separation of soybean sterols by florisol chromatography. Agr. Biol. Chem. 30:770-778.
- KJOSBAKKEN, J. y J.R. COLVIN, 1975. New evidence for an intermediate polymer of glucose in cellulose biosynthesis by Acetobacter xylinum. Can. J. Microbiol. 21:111-120
- KORN, E.D., 1974. The isolation of the amoeba plasma membrane and the use of latex beads for the isolation of phagocytic vacuole (phagosome) membranes from amoebae including the culture techniques for amoebae. En "Methods in Enzymology" (S. Fleischer y L. Packer, eds.) Vol. XXXI Part A, pp. 686-698. Academic Press, New York.
- KRISMAN, C.R., 1972. A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46:1206-1212.
- KRISMAN, C.R. y R. BARENGO, 1975. A precursor of glycogen biosynthesis: α -1,4-glucan-protein. Eur. J. Biochem. 52:117-123.
- KUROKAWA, T., K. OGURA y S. SETO, 1971. Formation of polyprenyl phosphates by a cell-free enzyme of Micrococcus lysodeikticus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:251-257.
- LAHAV, M., T.H. CHIU y W.J. LENNARZ, 1969. Studies on the biosynthesis of mannan in Micrococcus lysodeikticus. II. The enzymatic synthesis of mannosyl-1-phosphoryl-undecaprenol. J. Biol. Chem. 244:5890-5898.
- LAINE, R.A. y A.D. ELBEIN, 1971. Steryl glucosides in Phaseolus aureus. Use of gas-liquid chromatography and mass spectrometry for structural identification. Biochemistry 10:2547-2553.
- LAVINTMAN, N. y C.E. CARDINI, 1970. Biosynthesis of a glycolipid in starch grains from sweet corn. Biochim. Biophys. Acta 201:508-510.
- LAVINTMAN, N., J. TANDECARZ, M. CARCELLER, S. MENDIARA y C.E. CARDINI, 1974. Role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of starch: mechanism of formation and enlargement of a glucoprotein acceptor. Eur. J. Biochem. 50:145-155.

- LEE, Y.C. y J.R. SCOCCA, 1972. A common structural unit in asparagine-oligosaccharides of several glycoproteins from different sources. *J. Biol. Chem.* 247: 5753-5758.
- LEHLE, L., F. FARTACZEK, W. TANNER y H. KAUSS, 1976. Formation of polyprenol-linked mono- and oligosaccharides in Phaseolus aureus. *Arch. Biochem. Biophys.* 175:419-426.
- LEHLE, L. y W. TANNER, 1974. Membrane-bound mannosyl transferase in yeast glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 350:225-235.
- LEHLE, L. y W. TANNER, 1975. Formation of lipid-bound oligosaccharides in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 399:364-374.
- LELOIR, L.F., M.A.R. de FEKETE y C.E. CARDINI, 1961. Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *J. Biol. Chem.* 236:636-640.
- LELOIR, L.F., R.J. STANELONI, H. CARMINATTI y N.H. BEHRENS, 1973. The biosynthesis of a N,N'-diacetylchitobiose containing lipid by liver microsomes. A probable dolichol pyrophosphate derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:1285-1292.
- LENNARZ, W.J., 1975. Lipid-linked sugars in glycoprotein synthesis. *Science* 188: 986-991.
- LENNARZ, W.J. y M.G. SCHER, 1972. Metabolism and function of polyprenol sugar intermediates in membrane-associated reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 265:417-441.
- LEPAGE, M., 1964. Isolation and characterization of an esterified form of steryl glucoside. *Lipid Res.* 5:587-592.
- LERCHER, M. y Z.A. WOJCIECHOWSKI, 1976. Localisation of plant UDP-glucose:sterol glucosyltransferase in the Golgi-membranes. *Plant Sci. Lett.* 7:337-340.
- LEVY, J.A., H. CARMINATTI, A.J. CANTARELLA, N.H. BEHRENS, L.F. LELOIR y E. TABORA, 1974. Mannose transfer to lipid-linked di-N-acetylchitobiose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60:118-125.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- LUCAS, J.J. y C.J. WAECHTER, 1976. Polyisoprenoid glycolipids involved in glycoprotein biosynthesis. *Mol. Cell. Biochem.* 11:67-78.
- LUCAS, J.J., C.J. WAECHTER y W.J. LENNARZ, 1975. The participation of lipid-linked oligosaccharide in synthesis of membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 250:1992-2002.
- LLOYD, D., 1966. The isolation of mitochondria from the colourless alga Prototheca zopfii. *Exp. Cell Res.* 45:120-132.
- LLOYD, D. y G. TURNER, 1968. The cell wall of Prototheca zopfii. *J. Gen. Microbiol.* 50:421-427.

- McBRIDE, D.I. y K. COLE, 1971. Electron microscopy observations on the differentiation and release of monospores in the marine red alga Smithora naiadum. *Phycologia* 10:49-61.
- McCULLY, M.C., 1968. Histological studies on the genus *Fucus*. III. Fine structure and possible functions of the epidermal cells of the vegetative thallus. *J. Cell Sci.* 3:1-16.
- McMORRIS, T.C. y R.W. WHITE, 1977. Cholesterol β -D-glucoside-6'-O-palmitate, a metabolite of *Pythium sylvaticum*. *Biochim. Biophys. Acta* 486:308-312.
- MANKOWSKI, T., W. SASAK y T. CHOJNACKI, 1975. Hydrogenated polyprenol phosphates - exogenous lipid acceptors of glucose from UDP-glucose in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65:1292-1297.
- MARKHAM, R. y J.D. SMITH, 1952. The structure of ribonucleic acids. 1. Cyclic nucleotides produced by ribonuclease and by alkaline hydrolysis. *Biochem. J.* 52:552-557.
- MARSHALL, P.G., 1970. En "Rodd's Chemistry of Carbon Compounds", 2° ed., Vol. IIE, p. 1. Elsevier, Amsterdam.
- MARTIN, H.G. y K.J.J. THORNE, 1974. The involvement of endogenous dolichol in the formation of lipid-linked precursors of glycoprotein in rat liver. *Biochem. J.* 138:281-289.
- MATSUHASHI, M., C.P. DIETRICH y J.L. STROMINGER, 1965. Incorporation of glycine into the cell wall glycopeptide in *Staphylococcus aureus*: role of sRNA and lipid intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:587-594.
- MAYER, A.M., 1953. Quantitative aspects of the behaviour of coumarin as a germination inhibitor. *Physiol. Plant.* 6:413-424.
- MAYER, A.M. y A. POLJAKOFF-MAYBER, 1961. Coumarins and their role in growth and germination. En "Plant Growth Regulation", pp. 734-749. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
- MOLNAR, J., H. CHAO y Y. IKEHARA, 1971. Phosphoryl-N-acetylglucosamine transfer to a lipid acceptor of liver microsomal preparations. *Biochim. Biophys. Acta* 239:401-410.
- MOMOSE, K. y H. RUDNEY, 1972. 3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate synthesis in the inner membrane of mitochondria from p-hydroxybenzoate and isopentenylpyrophosphate. A demonstration of isoprenoid synthesis in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 247:3930-3940.
- MONOD, J., 1942. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes*. Hermann, Paris.
- MONTGOMERY, E.M., N.K. RICHTMEYER y C.S. HUDSON, 1943. The alkaline degradation of phenylglycosides: a new method for determining the configuration of glycosides and sugars. *J. Am. Chem. Soc.* 65:3-7.

- MORRÉ, D.J., 1971. Isolation of Golgi apparatus. En S.P. Colowick y N.O. Kaplan: "Methods in Enzymology" (W.B. Jacoby, ed.) Vol. XXII, pp. 138-148. Academic Press, New York.
- NAKAJIMA, T. y C.E. BALLOU, 1974. Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of Saccharomyces cerevisiae mannan. J. Biol. Chem. 249:7685-7694.
- NELSON, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153:375.
- NIKAIDO, K. y H. NIKAIDO, 1971. Glucosylation of lipopolysaccharide in Salmonella: biosynthesis of O-antigen factor 12₂. II. Structure of the lipid intermediate. J. Biol. Chem. 246:3912-3919.
- NIKAIDO, H., K. NIKAIDO, T. NAKAE y P.H. MAKELA, 1971. Glucosylation of lipopolysaccharide in Salmonella: biosynthesis of O-antigen factor 12₂. I. Over-all reaction. J. Biol. Chem. 246:3902-3911.
- NORDBY, H.E. y S. NAGY, 1971. Comparative citrus fatty acid profiles of triglycerides, monogalactosyl diglycerides, steryl esters and esterified steryl glucosides. Lipids 6:554-561.
- NORMAN, A.G., 1937. The Biochemistry of Cellulose, the Polyuronides lignin. Oxford University Press, London.
- NORTHCOTE, D.H., 1971. Organisation of structure, synthesis and transport within the plant during cell division and growth. En "Control Mechanisms of Growth and Differentiation", XXV Symp. S.E.B. (D.D. Davies y M. Balls, eds.) pp. 51-69. Cambridge University Press, Cambridge.
- NUTILE, G.E., 1945. Inducing dormancy in lettuce seeds with coumarin. Plant Physiol. 20:433-442.
- ONGUN, A. y J.B. MUDD, 1970. The biosynthesis of steryl glycosides in plants. Plant Physiol. 45:255-262.
- ORDIN, L. y M.A. HALL, 1967. Studies on cellulose synthesis by a cell-free oat coleoptile enzyme system: inactivation by airborne oxidants. Plant Physiol. 42:205-212.
- ORDIN, L. y M.A. HALL, 1968. Cellulose synthesis in higher plants from UDP-glucose. Plant Physiol. 43:473-476.
- OSBORN, M.J., 1969. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. Ann. Rev. Biochem. 38:501-538.
- OSBORN, M.J. y I.M. WEINER, 1968. Biosynthesis of a bacterial lipopolysaccharide. VI. Mechanism of incorporation of abequose into the O-antigen of Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 243:2631-2639.
- PARODI, A.J., 1977. Comunicación personal.

- PARODI, A.J., N.H. BEHRENS, L.F. LELOIR y M. DANKERT, 1972a. Glucose transfer from dolichol monophosphate glucose. The lipid moiety of the endogenous microsomal acceptor. *Biochim. Biophys. Acta* 270:529-536.
- PARODI, A.J., N.H. BEHRENS, L.F. LELOIR y H. CARMINATTI, 1972b. The role of polyprenol-bound saccharides as intermediates in glycoprotein synthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:3268-3272.
- PÉAUD-LENOËL, C. y M. AXELOS, 1972. D-glucosylation des phytostéroles et acylation des stéryl-D-glucosides en présence d'enzymes de plantes. *Carbohydr. Res.* 24:247-262.
- PLESS, D.D. y W.J. LENNARZ, 1975. A lipid-linked oligosaccharide intermediate in glycoprotein synthesis. Characterization of (Man-¹⁴C)glycoproteins labeled from (Man-¹⁴C)oligosaccharide-lipid and GDP-(¹⁴C)Man. *J. Biol. Chem.* 250:7014-7019.
- POLLOK, B.M., R.H. GOODWIN y S. GREENE, 1954. Studies on roots. II. Effects of coumarin, scopolepin and other substances on growth. *Amer. J. Bot.* 41:521-529.
- PONT LEZICA, R., 1977. Polyisoprenyl phosphates chez les plantes: caractérisation et fonction dans la synthèse des glycoconjugués. Tesis de doctorado.
- PONT LEZICA, R., C.T. BRETT, P.A. ROMERO MARTINEZ y M.A. DANKERT, 1975. A glucose acceptor in plants with the properties of an α -saturated polyprenylmonophosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66:980-987.
- PONT LEZICA, R. y M. DANKERT, 1975. Biosynthesis of acidic glycolipids by pea epicotyls. *Plant Physiol.* 56:S-8.
- PONT LEZICA, R., P.A. ROMERO y M.A. DANKERT, 1976. Membrane-bound UDP-glucose: lipid glucosyltransferases from peas. *Plant Physiol.* 58:675-680.
- POPJÁK, G., J.W. CORNFORTH, R.H. CORNFORTH, R. RYHAGE y D.W. GOODMAN, 1962. Studies on the biosynthesis of cholesterol. XVI. Chemical synthesis of 1-H₂³-2-C¹⁴- and 1-D₂-2-C¹⁴-trans-trans-farnesyl pyrophosphate and their utilization in squalene biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 237:56-61.
- POWER, F.B. y A.H. SALWAY, 1913. The identification of ipuranol and some allied compounds as phytosterol glucosides. *J. Chem. Soc.* 103:399-406.
- PRESTON, R.D. y R.N. GOODMAN, 1968. Structural aspects of cellulose microfibril biosynthesis. *J. R. Microsc. Soc.* 88:513-527.
- QUESADA ALLUÉ, L.A., E. BELOCOPITOW y L.R. MARECHAL, 1975. Glycosyl transfer to an acceptor lipid from insects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66:1201-1208.
- RAY, P.M., T.L. SHININGER y M.M. RAY, 1969. Isolation of β -glucan synthetase particles from plant cells and identification with Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64:605-612.

- RETALLAK, B. y R.D. BUTLER, 1972. Reproduction in Bulbochaete hiloensis (Nordst) Tiffany. I. Structure of the zoospore. Arch. Mikrobiol. 86:265-280.
- RICHARDS, J.D., P.J. EVANS y F.W. HEMMING, 1971. Dolichol phosphates as acceptors of mannose from guanosine diphosphate mannose in liver systems. Biochem. J. 124:957-959.
- RICHARDS, J.D. y F.W. HEMMING, 1972. The transfer of mannose from guanosine diphosphate mannose to dolichol phosphate and protein by pig liver endoplasmic reticulum. Biochem. J. 130:77-93.
- ROBBINS, P.W., D. BRAY, M. DANKERT y A. WRIGHT, 1967. Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. Work on a bacterial polysaccharide suggests that elongation can occur at the "reducing" end of growing chains. Science 158:1536-1542.
- ROBBINS, P.W., A. WRIGHT y M. DANKERT, 1966. Polysaccharide biosynthesis. J. Gen. Physiol. 49:331-346.
- ROBERTS, R.M. y W.E. POLLARD, 1975. The incorporation of D-glucosamine into glycolipids and glycoproteins of membrane preparations from Phaseolus aureus. Plant Physiol. 55:431-436.
- ROMERO, P.A., 1977. En "Función de los poliprenoles en la síntesis de polisacáridos". Tesis de doctorado, pp. 9-16.
- ROMERO, P.A. y R. PONT LEZICA, 1977. Transfer of glucose-1-phosphate from UDP-glucose to lipid acceptors in plants. Acta Physiol. Latinoamer. (en prensa).
- ROSEMAN, S., 1974. Complex carbohydrates and intercellular adhesion. En "Biology and Chemistry of Eukaryotic Cell Surfaces" (E.Y.C. Lee and E.E. Smith, eds.), p. 317. Academic Press, New York.
- SASAKI, T., T. UCHIDA y K. KURAHASHI, 1974. Glucosylation of O-antigen in Salmonella carrying ϵ^{15} and ϵ^{34} phages. J. Biol. Chem. 249:761-772.
- SATO, S., K. MATSUDA y K. TAMARI, 1976. β -1,4-glucan occurring in homogenate of Phaseolus aureus seedlings. Possible nascent stage of cellulose biosynthesis in vivo. Plant & Cell Physiol. 17:1243-1254.
- SCHER, M. y W.J. LENNARZ, 1969. Studies on the biosynthesis of mannan in Micrococcus lysodeikticus. I. Characterization of mannan- ^{14}C formed enzymatically from mannosyl-1-phosphoryl-undecaprenol. J. Biol. Chem. 244:2777-2789.
- SENTANDREU, R. y J.O. LAMPEN, 1971. Participation of a lipid intermediate in the biosynthesis of Saccharomyces cerevisiae LK2612 mannan. FEBS Lett. 14:109-113.
- SHARMA, C.B., P. BABCZINSKI, L. LEHLE y W. TANNER, 1974. The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 46:35-41.
- SIEWERT, G. y J.L. STROMINGER, 1968. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XI. Formation of the isoglutamine amide group in the cell walls of Staphylococcus aureus. J. Biol. Chem. 243:783-790.

- SIWERT, G. y J.L. STROMINGER, 1967. Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:767-773.
- SINGH, H. y O.S. PRIVETT, 1970. Studies on the glycolipids and phospholipids of immature soybeans. *Lipids* 5:692-697.
- SMITH, P.F., 1971. Biosynthesis of cholesteryl glucoside by Mycoplasma gallinarum. *J. Bacteriol.* 108:986-991.
- STENLID, G. y K. SADDIK, 1962. The effect of some growth regulators and uncoupling agents upon oxidative phosphorylation in mitochondria of cucumber hypocotyls. *Physiol. Plant.* 15:369-379.
- STONE, K.J. y J.L. STROMINGER, 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C₅₅-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:3223-3227.
- STONE, K.J., A.R. WELLBURN, F.W. HEMMING y J.F. PENNOCK, 1967. The characterization of ficaprenol-10,-11 and -12 from the leaves of Ficus elastica. *Biochem. J.* 102:325-330.
- STROMINGER, J.L., Y. HIGASHI, H. SANDERMANN, K.J. STONE y W. WILLOUGHBY, 1972. The role of polyisoprenyl alcohols in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls and other complex polysaccharides. En "Biochemistry of the Glycosidic Linkage" (R. Piras y H.G. Pontis, eds.), pp. 135-154. Academic Press, New York.
- STRUCK, D.K. y W.J. LENNARZ, 1977. Evidence for the participation of saccharide-lipids in the synthesis of the oligosaccharide chain of ovalbumin. *J. Biol. Chem.* 252:1007-1013.
- SUKENO, T., A.L. TARENTINO, T.H. PLUMMER, Jr. y F. MALEY, 1971. On the nature of α -mannosidase-resistant linkages in glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45:219-225.
- SVENSSON, S.-B., 1971. The effect of coumarin on root growth and root histology. *Physiol. Plant.* 24:446-470.
- TAKAYAMA, K. y D.S. GOLDMAN, 1970. Enzymatic synthesis of mannosyl-1-phosphoryl-decaprenol by a cell-free system of Mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* 245:6251-6257.
- TARENTINO, A., T.H. PLUMMER, Jr. y F. MALEY, 1970. Studies on the oligosaccharide sequence of ribonuclease B. *J. Biol. Chem.* 245:4150-4157.
- TARENTINO, A., T.H. PLUMMER, Jr. y F. MALEY, 1972. A reevaluation of the oligosaccharide sequence associated with ovalbumin. *J. Biol. Chem.* 247:2629-2631.
- TARENTINO, A.L., T.H. PLUMMER, Jr. y F. MALEY, 1973. A β -mannosidic linkage in the unit A oligosaccharide of bovine thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 248:5547-5548.

- TARENTINO, A.L., T.H. PLUMMER, Jr. y F. MALEY, 1974. The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo- β -N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* 249:818-824.
- TAUSSKY, H.H. y SHORR, E., 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorous. *J. Biol. Chem.* 202:675-685.
- THIÉRY, J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* 6:987-1017.
- THIMANN, K.V. y W.D. BONNER, 1949. Inhibition of plant growth by photoanemonin and coumarin and its prevention by BAL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 35:272-276.
- TREVELYAN, W.E., D.P. PROCTER y S. HARRISON, 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166:444-445.
- TROY, F.A., F.E. FREEMAN y E.C. HEATH, 1971. The biosynthesis of capsular polysaccharide in *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 246:118-136.
- TROY, F.A., I.K. VIJAY y N. TESCHE, 1975. Role of undecaprenyl phosphate in synthesis of polymers containing sialic acid in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 250:156-163.
- TSAI, C.M. y W.Z. HASSID, 1971. Solubilization and separation of uridine diphospho-D-glucose: β (1 \rightarrow 4)glucan and uridine diphospho-D-glucose: β (1 \rightarrow 4)glucan glucosyltransferases from coleoptiles of *Avena sativa*. *Plant Physiol.* 47:740-744.
- VILLEMEZ, C.L., 1970. Characterization of intermediates in plant cell wall biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40:636-641.
- VILLEMEZ, C.L. y A.F. CLARK, 1969. A particle-bound intermediate in the biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36:57-63.
- VILLEMEZ, C.L., Jr., G. FRANZ y W.Z. HASSID, 1967. Biosynthesis of alkali insoluble polysaccharide from UDP-D-glucose with particulate enzyme preparations from *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.* 42:1219-1223.
- WAECHTER, C.J. y W.J. LENNARZ, 1976. The role of poliprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 45:95-112.
- WAECHTER, C.J., J.J. LUCAS y W.J. LENNARZ, 1974. Evidence for xylosyl lipids as intermediates in xylosyl transfers in hen oviduct membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56:343-350.
- WARD, J.B., 1974. The synthesis of peptidoglycan in an autolysin-deficient mutant of *Bacillus licheniformis* N.C.T.C.6346 and the effect of β -lactam antibiotics, bacitracin and vancomycin. *Biochem. J.* 141:227-241.
- WARD, J.B. y H.R. PERKINS, 1973. The direction of glycan synthesis in a bacterial peptidoglycan. *Biochem. J.* 135:721-728.

- WARD, J.B. y H.R. PERKINS, 1974. Peptidoglycan biosynthesis by preparations from Bacillus licheniformis: cross-linking of newly synthesized chains to preformed cell wall. Biochem. J. 139:781-784.
- WARREN, C.D. y R.W. JEANLOZ, 1973. The characterization of glycolipids derived from long-chain polyprenols:chemical synthesis of α -D-mannopyranosyl dolichyl phosphate. FEBS Lett. 31:332-334.
- WEDGWOOD, J.F., C.D. WARREN, R.W. JEANLOZ y J.L. STROMINGER, 1974. Enzymatic utilization of P¹-di-N-acetylchitobiosyl P²-dolichyl pyrophosphate and its chemical synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:5022-5026.
- WEINER, I.M., T. HIGUCHI, L. ROTHFIELD, M. SALTMARSH-ANDREW, M.J. OSBORN y B.L. HORECKER, 1965. Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. V. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of the O-antigen groups of Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54:228-235.
- WELLBURN, A.R. y F.W. HEMMING, 1966a. The occurrence and seasonal distribution of higher isoprenoid alcohols in the plant kingdom. Phytochemistry 5:969-975.
- WELLBURN, A.R. y F.W. HEMMING, 1966b. Polyprenols of wood and leaf tissue of the silver birch, Betula verrucosa. Nature 212:1364-1366.
- WILLOUGHBY, E., Y. HIGASHI y J.L. STROMINGER, 1972. Enzymatic dephosphorylation of C₅₅-isoprenylphosphate. J. Biol. Chem. 247, 5113-5115.
- WOLFROM, M.L. y THOMPSON, A., 1963. En "Methods in Carbohydrate Chemistry" (R.L. Whistler, ed.) Vol. VIII, pp. 143-150. Academic Press, New York.
- WRIGHT, A., 1971. Mechanism of conversion of the Salmonella O-antigen by bacteriophage ϵ^{34} . J. Bacteriol. 105:927-936.
- WRIGHT, A., M. DANKERT, P. FENNESEY y P.W. ROBBINS, 1967. Characterization of a polyisoprenoid compound functional in O-antigen biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:1798-1803.
- WRIGHT, A., M. DANKERT y P.W. ROBBINS, 1965. Evidence for an intermediate stage in the biosynthesis of the Salmonella O-antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 235-241.
- ZAK, B., 1957. Simple rapid microtechnique for serum total cholesterol. Amer. J. Clin. Pathol. 27:583-588.